

**ESTABELECIMENTO DE UMA PLATAFORMA DE
ESTUDOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIS
BASEADOS EM XENOENXERTOS EM ANIMAIS
IMUNODEFICIENTES**

ADRIANO DE OLIVEIRA BESERRA

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Tiago Góss dos Santos

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Beserra, Adriano Oliveira

Estabelecimento de uma plataforma de estudos em carcinoma de células renais baseados em xenoenxertos em animais imunodeficientes / Adriano de Oliveira Beserra - São Paulo, 2019.

79p.

Disertação (Mestrado) - Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Tiago Góss dos Santos

Descritores: 1. Carcinoma de Células Renais/Carcinoma, Renal Cell.
2. Vesículas Extracelulares/Extracellular Vesicles. 3. Plasma/Plasma.
4. Camundongos/Mice. 5. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry.
5. Xenoenxertos/Heterografts.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, por sua capacidade de acreditar em mim. Mãe foi seu cuidado e carinho que me deu em alguns momentos a esperança para seguir em frente e não desistir. Pai sua presença significou segurança e a certeza de que nunca estive sozinho nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

“É difícil agradecer a todas as pessoas que de alguma maneira, fizeram ou fazem parte da minha vida e deste trabalho”

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

Agradeço aos meus pais, **Rosimere de S. Oliveira e Adeildo Ponciano Beserra**, pelo fato de existirem em minha vida, e, sobretudo, por serem fundamentais de todas as formas para a conclusão de mais este trabalho.

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Tiago Góss dos Santos**, pela oportunidade, pela paciência, e pela confiança durante todo o tempo, sobretudo, pelo espírito de liderança e pelos ensinamentos. Afinal, liderar não é impor, mais despertar-nos a vontade de fazer. Agradeço, por todo o aprendizado, e por contribuir de maneira ímpar com a minha formação pessoal e profissional. Hoje, tenho a sensação de continuidade, e agradeço por isso, pois o bom líder é aquele que inspira os outros a seguirem no caminho que um dia ele traçou.

Agradeço a toda à equipe do **Laboratório de Biologia Tumoral e Biomarcadores**, desde os alunos de Iniciação Científica, Mestres, Doutores e Pesquisadores pelo companheirismo, pelo carinho e aprendizado em por todos os momentos. Aproveito e registro aqui também os meus agradecimentos aos funcionários e técnicos do Centro Internacional de Pesquisa, sua ajuda foi fundamental para a conclusão de mais este trabalho.

Agradeço ao **Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center**, em especial a **Dra Stephania Martins Bezerra**, pelo entusiasmo, pela dedicação e companheirismo. Seu apoio foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Também não posso deixar de mencionar a **Maristela Aparecida Barbosa** que durante todo o tempo nos ajudou com as coletas dos tumores e sangue dos pacientes convidados para participar deste projeto.

Agradeço ao **Departamento de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center**, em especial aos cirurgiões: **Dr Stenio de Cassio Zequi** e ao **Dr Walter Henriques da Costa**, pelo apoio neste trabalho, pelas orientações e pela atenção.

Agradeço ao **Laboratório de Genômica e Biologia Molecular**, em especial a **Dra Giovana Tardin Torrezan**, **Dra Dirce Maria Carraro** e **Isabella Tanus Job e Meira** pela parceria durante a caracterização dos nossos casos.

Agradeço ao **Biobank and Immunohistochemistry Facility do A.C.Camargo Cancer Center**, em especial a **Ana Paula Mitsue Suenaga, Louise Danielle de Carvalho, Fernanda de Souza Monteiro, Rafaela Batista da Cruz, Severino da Silva Ferreira e Lais Takata Walter**, pela paciência, contribuição e pontualidade, sua ajuda foi essencial para a conclusão de mais este projeto.

RESUMO

Beserra AO. **Estabelecimento de uma plataforma de estudos em carcinoma de células renais baseados em xenoenxertos em animais imunodeficientes**. São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Os xenoenxertos derivados de pacientes (PDX) emergiram como uma das abordagens mais promissoras para o estudo da biologia do câncer e para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer. O carcinoma de células renais (CCR) representa a forma mais comum de tumor renal, apresenta comportamento agressivo e propensão à disseminação metastática, podendo representar até 90% de todas as neoplasias renais. Estima-se que o CCR seja responsável por mais de 140.000 mortes por ano em todo o mundo, 25% dos pacientes são diagnosticados com doença avançada (invasão local e/ou metástase) e os pacientes com doença metastática são essencialmente incuráveis. Além disso, até 30% dos pacientes com doença localizada submetidos à ressecção completa dos rins irão recidivar. Assim, esta proposta visa estabelecer o desenvolvimento de um recurso CCR PDX para identificar novos biomarcadores para monitoramento de CCR e direcionamento terapêutico. As amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas a partir da ressecção cirúrgica de 73 pacientes do A.C.Camargo Cancer Center. Os fragmentos tumorais foram implantados em camundongos imunodeficientes NOD Scid Gamma (NSG), 27 casos foram implantados ectopicamente (via subcutânea) e 46 casos foram implantados ortotopicamente (cápsula renal). Os animais foram monitorados por palpação e quando os tumores mostraram sinais de crescimento, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado, o tumor foi removido e realizado uma nova passagem (P2). Os fragmentos dos tumores foram criopreservados e submetidos à análise histológica por imunohistoquímica e sequenciamento genômico. Até o momento, dez casos apresentaram

crescimento tumoral, sendo oito casos do subtipo células claras, um caso do tipo papilar I, e um caso do tipo papilar II, todos os PDX foram obtidos a partir de inoculação ortotópica, não foi observado crescimento tumoral renal no implante ectópico. Atualmente, 3 casos foram totalmente caracterizados por sequenciamento e imunohistoquímica. A caracterização por imunohistoquímica indica que PDXs preservam os fenótipos CCR, incluindo a expressão de PAX8, Alpha-methyl CoA racemase (AMCR), Anidrase carbônica IX (CAIX) e Citoceratina 7 (CK7). Na caracterização do sequenciamento, as principais alterações genéticas identificadas foram BAP1, TP53, VHL, ARID1A, PBRM1 e KDM5C. Em conjunto, estes resultados preliminares sugerem que o modelo de xenoenxerto ortotópico do CCR representa uma ferramenta adequada para o estudo da biologia do tumor, uma vez que foi eficaz na preservação das características do tumor primário nos animais.

Descritores: Carcinoma de Células Renais. Vesículas Extracelulares Plasma. Camundongos. Imuno-Histoquímica. Xenoenxertos

SUMMARY

Beserra AO. **[Establishment of a platform for studies on renal cell carcinoma based on xenografts in immunodeficient animals]**. São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

The Patient-Derived Xenografts (PDX) has emerged as one of the most promising approaches to study cancer biology and to develop of new anti-cancer drugs. The renal cell carcinoma (RCC) represents the most common form of renal tumor, presents aggressive behavior, and propensity for metastatic dissemination, and may represent up to 90% of all renal neoplasms. RCC has been estimated to account for more than 140,000 deaths per year worldwide, 25% of patients are diagnosed with advanced disease (local invasion and/or metastasis) and patients with metastatic disease are essentially incurable. Furthermore, up to 30% of patients with localized disease who underwent complete kidney resection will relapse. Thus, this proposal aims to establish the development of a RCC PDX resource to identify novel biomarkers for RCC monitoring and therapeutic targeting. The samples used in the present study were obtained from surgical resection of 73 patients from A.C.Camargo Cancer Center. Tumor fragments were implanted in immunodeficient NOD Scid Gamma (NSG) mice, 27 cases were ectopic implanted (subcutaneously) and 46 cases were orthotopic implanted (renal capsule). The animals were monitored by palpation and when tumors showed signs of growth the animals were anesthetized and blood was collected, tumor was removed and serially passaged (P2). Tumors fragments were cryopreserved and part submitted to histological analysis (immunohistochemistry) and genomic target sequencing. To date, tem cases presented tumor growth, being 8 cases of the Clear Cell subtype, 1 case of the Papillary type I, and 1 case of Papillary type II, all PDX were obtained from orthotopic inoculation, no renal tumor growth was observed in ectopic implantation. Currently, 3 cases were fully characterized. The

characterization by immunohistochemistry indicates that PDXs preserve RCC phenotypes, including the expression of PAX8, Alpha-methyl CoA racemase (AMCR), Carbonic Anhydrase IX (CAIX) and Cytokeratin 7 (CK7). In the sequencing characterization, the main genetic alterations identified were BAP1, TP53, VHL, ARID1A, PBRM1, and KDM5C. Taken together, these preliminary results suggest that the orthotopic xenograft model of RCC represents a suitable tool for the study of tumor biology, since it was effective in preserving the characteristics of the primary tumor in the animals.

Key-words: Carcinoma, Renal Cell. Extracellular Vesicles. Plasma. Mice. Immunohistochemistry. Heterografts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características morfológicas dos diferentes tipos de Carcinoma de Células Renais.	5
Figura 2	Estrutura e composição das Vesículas Extracelulares.....	12
Figura 3	Estrutura e composição das Vesículas Extracelulares.....	16
Figura 4	Fluxograma ilustrando o desenho experimental da plataforma de xenoenxertos tumorais baseados em carcinomas de células renais	22
Figura 5	Evidência de crescimento, ressecção tumoral e análise histológica nos animais que receberam implante ectópico	31
Figura 6	Imunohistoquímica para confirmação de PTLD nos tumores ectópicos	33
Figura 7	Passo a passo da padronização da técnica cirúrgica aplicada no implante ortotópico de carcinoma de células renais.....	34
Figura 8	Estabelecimento do modelo experimental (CCR Papilífero II)	38
Figura 9	Comparação por imunohistoquímica entre xenoenxerto derivado de paciente com Carcinoma de Células Renais do subtipo Papilífero tipo II	39
Figura 10	Participação do gene ARID1A nos complexos de remodelação da cromatina SWI/SNF	41

Figura 11	Estabelecimento do modelo experimental (CCR Células Claras)	43
Figura 12	Comparação por imunohistoquímica em xenoenxerto derivado de paciente com Carcinoma de Células Renais do tipo Células Claras.....	44
Figura 13	Participação do gene PBRM1 nos complexos de remodelação da cromatina SWI/SNF	46
Figura 14	Estabelecimento do modelo experimental (CCR Células Claras).....	48
Figura 15	Comparação por imunohistoquímica em xenoenxerto derivado de paciente com Carcinoma de Células Renais do tipo Células Claras.....	49
Figura 16	Comparação por imunohistoquímica em xenoenxerto derivado de paciente com Carcinoma de Células Renais do tipo Células Claras, utilizando o anticorpo TP53.....	51
Figura 17	Regulação de proteínas mediada por BAP	52
Figura 18	Estabelecimento do modelo experimental (CCR Células Claras de alto grau) com a formação de trombo venoso.....	56
Figura 19	Citometria de fluxo de exossomos derivados de CCR Papilífero tipo II	63
Figura 20	Citometria de fluxo de exossomos derivados de CCR de Células Claras.....	64

Figura 21	Citometria de fluxo de exossomos derivados de CCR de Células Claras.....	65
Figura 22	Citometria de fluxo de exossomos derivados de CCR de Células Claras com mutação no gene MiT	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínico-patológicas dos pacientes recrutados para a padronização do implante ectópico de CCR.	30
Tabela 2	Características clínico-patológicas dos pacientes recrutados para padronização do implante ortotópico de CCR.	35
Tabela 3	Análise da caracterização do CCR do tipo Papilífero II por sequenciamento.	40
Tabela 4	Análise da caracterização do CCR do tipo Células Claras por sequenciamento.	45
Tabela 5	Análise da caracterização do CCR do tipo Células Claras por sequenciamento.	50
Tabela 6	Descrição da viabilidade das amostras armazenadas em solução de vitrificação e solução de congelação.	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACD	Acid Citrate Dextrose
AMACR	Alfa metilacil CoA racemase
AR	Androgen Receptor
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1
BAP1	BRCA1-Associated protein-Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
BHD	Síndrome de Birt-Hogg-Dube
BRAF	Proto-oncogene Serine/threonine-protein kinase B-raf
BRCA1	Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein
CA-IX	Anidrase Carbônica IX
ccCCR	Carcinoma de Células Renais do tipo Células Claras
CCR	Carcinoma de Células Renais
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
chCCR	Carcinoma de Células Renais do tipo Cromóforo
CHPR	Carcinoma de Células Renais Papilar Hereditário
CK7	Citoceratina 7
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FAT1	Atypical Cadherin 1
FH	Fumarate Hydratase
FLCN	Folliculin
HIF	Fator induzível por hipóxia
IL1β	Interleucina 1 beta
ISUP	Sociedade Internacional de Patologia Urológica
kDa	Kilodalton
KDM5C	Lysine-specific demethylase 5C
KDM6A	Lysine-specific demethylase 6A

KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LHCCR	Leiomiomatose Hereditária
MET	Proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
MTOR	Mammalian target of rapamycin serine/threonine-protein kinase
NCI	National Cancer Institute
NF2	Neurofibromin 2
NFE2L2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NSG	NOD (Non-obese Diabetic) Scid Gamma Mouse
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAX8	Paired-box gene 8
PBRM1	Protein polybromo 1
PBS	Phosphate-Buffered Saline
pCCR	Carcinoma de Células Renais do tipo Papilífero
PCF11	Cleavage And Polyadenylation Factor Subunit
PDX	Patient Derived Xenografts
PIK3CA	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTLD	<i>Posttransplant Lymphoproliferative Disease</i>
RGH	Registro Hospitalar
RNA	Ácido Ribonucleico
SETD2	SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase
SMARCA4	ATP-dependent chromatin remodeler
SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
SNC	Sistema Nervoso Central
STAG2	Stromal Antigen 2
TCEB1	Transcription elongation factor B polypeptide 1
TGF β	Fator de Crescimento Transformante beta
TGFα	Fator de Crescimento Transformante alfa
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNFα	Fator de Necrose Tumoral alfa

VEs	Vesículas Extracelulares
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VHL	von Hippel-Lindau
XR	Xeno Rim

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Patient-Derived Xenografts: uma abordagem para a medicina personalizada	1
1.2	Carcinoma de Células Renais	4
1.3	Carcinoma de Células Renais: Contexto Epidemiológico	7
1.4	Carcinoma de Células Renais: Contexto Clínico	8
1.5	Tratamento do Carcinoma de Células Renais	14
1.6	Vesículas Extracelulares como Transportadores de Biomarcadores em Carcinoma de Células Renais	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	METODOLOGIA	20
3.1	Casuística	20
3.2	Modelo experimental de implante ectópico (subcutâneo)	21
3.3	Modelo experimental de implante ortotópico de CCR	22
3.4	Acompanhamento pós operatório	24
3.5	Coleta de sangue e isolamento de exossomos	24
3.6	Criopreservação	25
3.7	Condições de criopreservação	26
3.8	Imunohistoquímica	27
3.9	Extração de DNA de tecido para Sequenciamento	27
3.10	Preparo de bibliotera e Sequenciamento	28
3.11	Citometria	29

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Padronização do Modelo de Implante Ectópico de Carcinoma de Células Renais	30
4.2	Padronização da Técnica Cirúrgica de Implante Ortotópico do Carcinoma de Células Renais	33
4.3	Caracterização do 1ª caso (XR 19) - CCR Papilífero II	36
4.4	Caracterização do 2ª caso (XR 46) - CCR Células Claras	42
4.5	Caracterização do 3ª caso (XR 14) - CCR Células Claras	47
4.6	Crescimento tumoral de Carcinoma de Células Renais com formação de trombo venoso	54
4.7	Padronização da Criopreservação de PDX	57
4.8	Isolamento e caracterização de vesículas extracelulares	61
5	CONCLUSÕES	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, importantes avanços foram alcançados na prática clínica envolvendo o diagnóstico e o tratamento do câncer, em consequência do aperfeiçoamento dos métodos investigativos, melhorias das técnicas cirúrgicas, e do advento de modernas drogas anti-câncer (HIDALGO et al. 2014; INOUE et al. 2017).

Além disso, as sofisticadas tecnologias de manipulação genética permitiram ao longo do tempo a geração de modelos de estudo, cada vez mais eficazes, e capazes de proporcionar um melhor esclarecimento da biologia, complexidade e imprevisibilidade tumoral, entre eles, destacam-se o uso de camundongos geneticamente modificados e xenoenxertos tumorais, atualmente conhecido como *Patient-Derived Xenografts* (PDX) (TENTLER et al. 2012).

1.1 PATIENT-DERIVED XENOGRAFTS: UMA ABORDAGEM PARA A MEDICINA PERSONALIZADA

A produção e comercialização de camundongos geneticamente modificados tornou possível, a geração de modelos amplamente utilizados em todo o mundo, para o estudo de várias doenças humanas, entre elas o câncer (MALANEY et al. 2014).

Alternativamente, a utilização desses animais permite que os tumores cresçam espontaneamente em consequência das modificações genéticas que os animais carregam. No entanto, uma das principais limitações deste modelo é o seu desenvolvimento, e a sua validação, que demandam tempo, além de serem trabalhosos e caros (KERSTEN et al. 2017).

Historicamente, o modelo de PDX começou a ser utilizado no *National Cancer Institute* (NCI), para o rastreio de novas alternativas terapêuticas no por volta dos anos 70 (HIDALGO et al. 2014). Desde então, vários trabalhos caracterizaram e compararam respostas com vários fármacos entre os tumores gerados nesses animais e tumores de pacientes, fomentando a ideia de uma futura incorporação desse modelo pré-clínico em programas de desenvolvimento de novas estratégias de tratamento anti-câncer (SHORTHOUSE et al. 1980; MORTON e HOUGHTON 2007).

No entanto, somente a partir das últimas décadas esses modelos têm ganhando popularidade e destaque, por representarem com maior fidedignidade a individualidade do câncer humano (MALANEY et al. 2014), proporcionando desta forma, uma melhor percepção dos aspectos biológicos de resistência aos quimioterápicos (MONSMA et al. 2012; GARRALDA et al. 2014).

Tecnicamente, a metodologia para geração do modelo PDX varia dependendo do tipo, e da localização do tumor, porém, seja câncer primário ou metastático, o procedimento a ser aplicado já se encontra amplamente descrito na literatura (HIDALGO et al. 2014; GARRALDA et al. 2014; ELLIS e FIDLER 2010).

Resumidamente, esse modelo baseia-se na enxertia de fragmentos de tumor humano em camundongos imunodeficientes, que permitem a implantação e o crescimento do tumor, sem que haja rejeição (MORTON e HOUGHTON 2007).

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

Outra grande vantagem dessa metodologia é a criação exclusiva de bancos de xenoenxertos transplantáveis, que são valiosos para estudos futuros, e, sobretudo, para a comparação molecular entre os enxertos e os tumores humanos. Tais evidências fazem desse modelo um bom preditor de resposta à terapia e também uma fonte para identificar biomarcadores para prognóstico, uma vez que é preservada a maior parte das características de tumores humanos (LJUNGBERG et al. 2011), por estes motivos, vários grupos de pesquisa em todo o mundo estabeleceram painéis de xenoenxertos tumorais diretamente de pacientes (FICHTNER et al. 2004; BERTOTTI et al. 2011; JULIEN et al. 2012).

Diante deste cenário, mais recentemente, com a geração e a disponibilidade de novas linhagens de camundongos imunodeficientes, conhecidos como *NOD scid gamma* (NSG) (SHULTZ et al. 2005), fortaleceu os modelos de xenotransplante, uma vez que esses animais proporcionam taxas de crescimento mais elevadas e rápidas, permitindo estudar suas

características únicas, incluindo a imprevisibilidade da progressão tumoral (APARICIO et al. 2015).

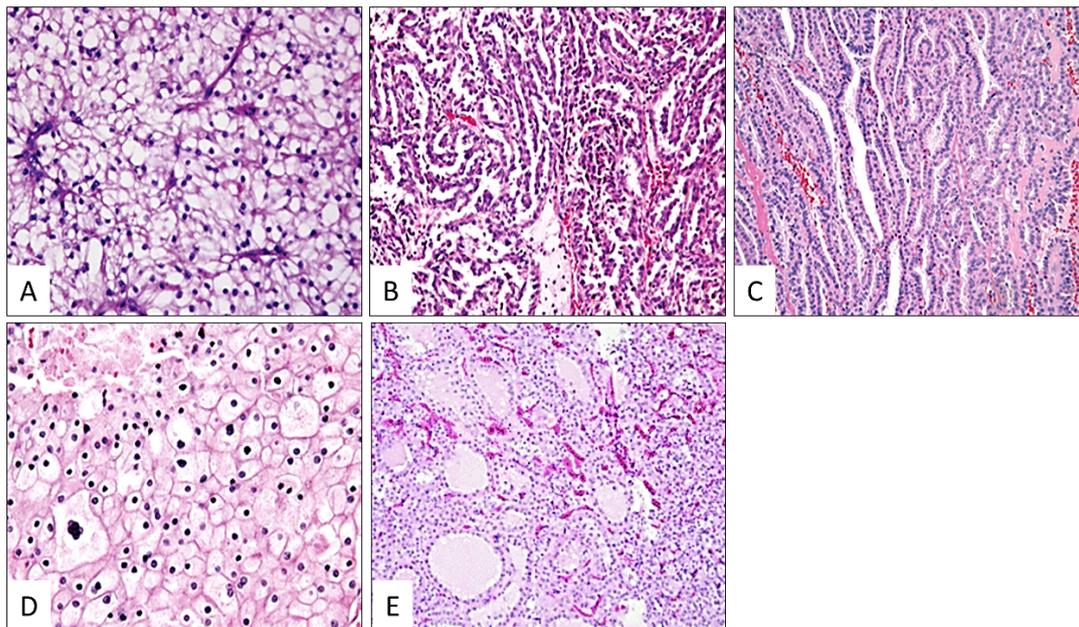
Por este motivo, os PDXs emergem como uma plataforma promissora para a oncologia personalizada, com o potencial de identificar, em tempo real, a melhor droga para o tratamento de pacientes com diversos tipos de câncer (GARRALDA et al. 2014), entre eles o Carcinoma de Células Renais.

1.2 CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

Atualmente o Carcinoma de Células Renais (CCR) representa a forma mais comum de tumor renal, exibindo comportamento agressivo, e propensão para a disseminação metastática, surge no parênquima renal, podendo representar até 90% de todas as neoplasias renais (LJUNGBERG et al. 2011).

Classicamente, o CCR representa um grupo de tumores histopatologicamente e molecularmente heterogêneos, cuja classificação foi recentemente revisada e publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016 (HUMPHREY et al. 2016).

A classificação do CCR inclui vários subtipos histológicos (Figura 1), entre os quais: Carcinoma de Células Renais do tipo Células Claras (*ccCCR*), e os Carcinoma de Células Renais do tipo Papilíferos I e II (*pCCR*) são os mais comuns, enquanto que o Carcinoma de Células Renais do tipo Cromóforo (*chCCR*) e Oncocitoma renal ocorrem em menor frequência (DAGHER et al. 2017).



Fonte: Adaptado de RINI et al. (2009); LÜDERS (2016).

Figura 1 - Características morfológicas dos diferentes tipos de Carcinomas de Células Renais. **(A)** Carcinoma renal de células claras. **(B)** Carcinoma renal papilífero I. **(C)** Carcinoma renal papilífero II. **(D)** Carcinoma renal do tipo cromófoco. **(E)** Carcinoma renal do tipo oncocitoma.

O ccCCR, é o subtipo histológico mais frequente, presente em cerca de 70%-75% dos pacientes com CCR, apresenta um padrão de crescimento alveolar sólido composto de células claras grandes com citoplasma abundante e rico em glicogênio e lipídios (Figura 1A) (RINI et al. 2009).

Macroscopicamente, aparece tipicamente amarelado, com evidência de necrose e hemorragia, além de ser altamente vascular. Atualmente ccCCR é o responsável pela maioria das mortes entre os pacientes com CCR (Cancer Genome Atlas Research Network 2013).

Na rotina clínica, através da imunohistoquímica, ccCCR caracteristicamente co-expressam pan-citoceratina e vimentina e são positivos para anidrase carbônica IX (CA-IX), e PAX8 (marcador de tecido

renal), mas geralmente são negativos para Citoceratina 7 (CK7) (SRIGLEY et al. 2013).

O pCCR representa o segundo subtipo mais comum de CCR sendo responsável por aproximadamente 10%-15% dos casos. Macroscopicamente apresentam evidência de necrose e hemorragia. Microscopicamente, podem ser classificados em (pCCR tipo 1) composto por células de formato cuboide, com citoplasma escasso e basofílico, e núcleos pequenos e cuboide (Figura 1B), representando cerca de 10% dos casos de CCR. Eles também podem mostrar um crescimento sólido, com estruturas papilares muito compactas. Na imunohistoquímica, esses tumores apresentam expressão forte de CK7 e alfa-metilacil-CoA racemase (AMACR) e na maioria das expressões focais de CA-IX (WILLIAMSON et al. 2017; YOUNG et al. 2017).

E (pCCR tipo 2) que é um subtipo menos frequente, presente em cerca de 5% dos casos de CCR, cujas células apresentam-se colunares e pseudoestratificadas alinhadas com citoplasma abundante e eosinofílico, e com núcleos grandes, esféricos e nucléolos proeminentes (Figura 1C) (CAPITANIO, MONTORSI 2016). Basicamente, os tumores têm um perfil típico em imunohistoquímica, incluindo perda de CK7 e expressão forte de alfa-metilacil-CoA racemase (AMACR) (FLIPPOT et al. 2018)

O CCR do tipo Cromóforo (*chCCR*), é pouco frequente, presente em cerca de 5% dos pacientes com CCR. Macroscopicamente, possui uma coloração acastanhada, caracterizando-se pela presença de necrose. Microscopicamente, suas células possuem membranas celulares

proeminentes, núcleos irregulares com halos perinucleares, com citoplasma abundante e eosinofílico (Figura 1D) (NOVICK 2007). Na imunohistoquímica, os tumores cromófobos apresentam marcação forte e difusa para CK7 (WILLIAMSON et al. 2017).

O oncocitoma renal representa uma forma rara tumor epitelial benigno que surge no parênquima renal. Macroscopicamente, é composto por uma superfície acastanhada, geralmente semelhante ao parênquima renal normal, já a aparência histológica clássica do oncocitoma renal é composta por estruturas tubulares associadas com células de citoplasma granuloso e de padrão eosinofílico, com núcleos geralmente redondos e regulares (Figura 1E) (WOBKER e WILLIAMSON 2017). Na imunohistoquímica, os oncocitomas renais apresentam marcação focalmente positiva para CK7 (WILLIAMSON et al. 2017).

1.3 CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS: CONTEXTO EPIDEMIOLÓGICO

A incidência do CCR varia em todo o mundo, sendo mais elevada nos países desenvolvidos do que nos países em desenvolvimento. Entre os tumores urológicos, o CCR se apresenta com a maior taxa de mortalidade específica do câncer, e a taxa de sobrevivência em até 5 anos, é de apenas 12% para pacientes com doença metastática (GUO et al. 2015).

Atualmente, o CCR é responsável por 2-3% de todas as neoplasias malignas em adultos, com incidência anual crescente, nos países mais

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

Em todo o mundo o CCR está entre as 10 neoplasias malignas mais comuns. Atualmente, estima-se que aproximadamente 350.000 pessoas sejam diagnosticadas por ano com CCR, além disso, este tipo de câncer está associado com cerca de 140.000 mortes ao ano em todo o mundo (HSIEH et al. 2017). Somente nos Estados Unidos, estima-se que em 2016, tenham sido registrados 62.700 novos casos de CCR, associados a 14.240 mortes (DEY et al. 2017; BINDAYI et al. 2018).

No Brasil, segundo informações do Instituto Nacional do Câncer (INCA), somente no ano passado, foram registrados aproximadamente 6.270 casos, sendo cerca de 3.700 pacientes do sexo masculino, e aproximadamente 2.500 do sexo feminino (Ministério da Saúde 2019a).

1.4 CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS: CONTEXTO CLÍNICO

Atualmente, a popularização dos métodos de diagnósticos por imagem permitiu o aumento do diagnóstico incidental do CCR. Diante desse cenário, a maioria das massas renais são inicialmente limitadas a um órgão, no entanto, apesar da melhora significativa nas técnicas cirúrgicas e do aperfeiçoamento na ressecção curativa, a disseminação hematogênica é responsável por promover a doença metastática, presente em aproximadamente 30% dos pacientes, mesmo em estágios iniciais da doença (RINI et al. 2009). Os locais mais frequentemente acometidos por

metástases à distância são pulmões, ossos e cérebro, embora as glândulas suprarrenais, rim contralateral, e fígado podem possam ser acometidos (BIANCHI et al. 2012). Metástases linfonodais ocorrem em 4% das nefrectomias e podem estar presentes concomitantemente com disseminação hematogênica. Embora pouco comum, CCR também tem potencial de metástase em locais atípicos como seios paranasais (RALLI et al. 2017).

Além disso, em aproximadamente 4%-25% dos pacientes com CCR, o tumor primário se dissemina infiltrando a veia renal e veia cava inferior podendo se estender até o átrio direito do coração, geralmente sob formação de um grande coágulo sanguíneo, geralmente associados a mal prognóstico entre os pacientes (WARSOW et al. 2018). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre a patogênese associada com a formação do trombo venoso em CCR.

Clinicamente, parâmetros patológicos avaliados em biópsias e amostras de ressecção têm um papel central no diagnóstico, prognóstico e manejo de pacientes com CCR. O sistema de classificação de Fuhrman, avaliando características nucleares e nucleolares, tem sido usado internacionalmente há muitos anos (FUHRMAN et al. 1982). No entanto, embora tenha utilidade prognóstica comprovada, a sua reprodutibilidade tem sido problemática, devido às dificuldades em aplicar consistentemente os quatro graus descritos morfológicamente para o CCR.

Um novo sistema de classificação proposto pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) em 2012 e é recomendado para uso pela OMS (DELAHUNT 2009). Este também é um sistema de quatro

graus, com o grau de proeminência nucleolar avaliado para determinar os graus 1-3 e a presença de células pleomórficas altamente atípicas e/ou morfologia sarcomatoide ou rabdoide definindo o grau 4 (ZHANG et al. 2015). A presença de células sarcomatoide e/ou rabdoide, está associada a mal prognóstico e sobrevida baixa entre os pacientes, geralmente, em torno de 15%-22% em 5 anos (DELAHUNT et al. 2013). Clinicamente, a graduação histológica do CCR é atribuído de acordo com as células de maior grau presentes, em vez de as mais predominantes (DELAHUNT et al. 2011). De acordo com a presença e/ou ausência de hereditariedade familiar o CCR pode ser classificado em: *Hereditário* e *Esporádico*. No entanto, a grande maioria dos casos clínicos diagnosticados são de pacientes com CCR esporádico, representando até 96% dos casos (LATIF et al. 1993).

O CCR hereditário pode ser definido como um tipo de câncer de rim, menos frequente, com alterações genéticas específicas, podendo representar até 4% de todos os cânceres renais. Alternativamente, pacientes portadores de síndromes hereditárias tais como: doença de *Hippel-Lindau Von* (VHL), CCR Papilar Hereditário (CHPR), Síndrome de *Birt-Hogg-Dube* (BHD) e *Leiomiomatose Hereditária* (LHCCR) normalmente desenvolvem CCR por volta da quarta década de vida, e/ou até mesmo mais jovens do que pacientes portadores de CCR esporádicos. Nesse cenário, o CCR apresenta-se com frequência sob a forma de lesões renais múltiplas e/ou bilaterais (KAWASHIMA et al. 2016).

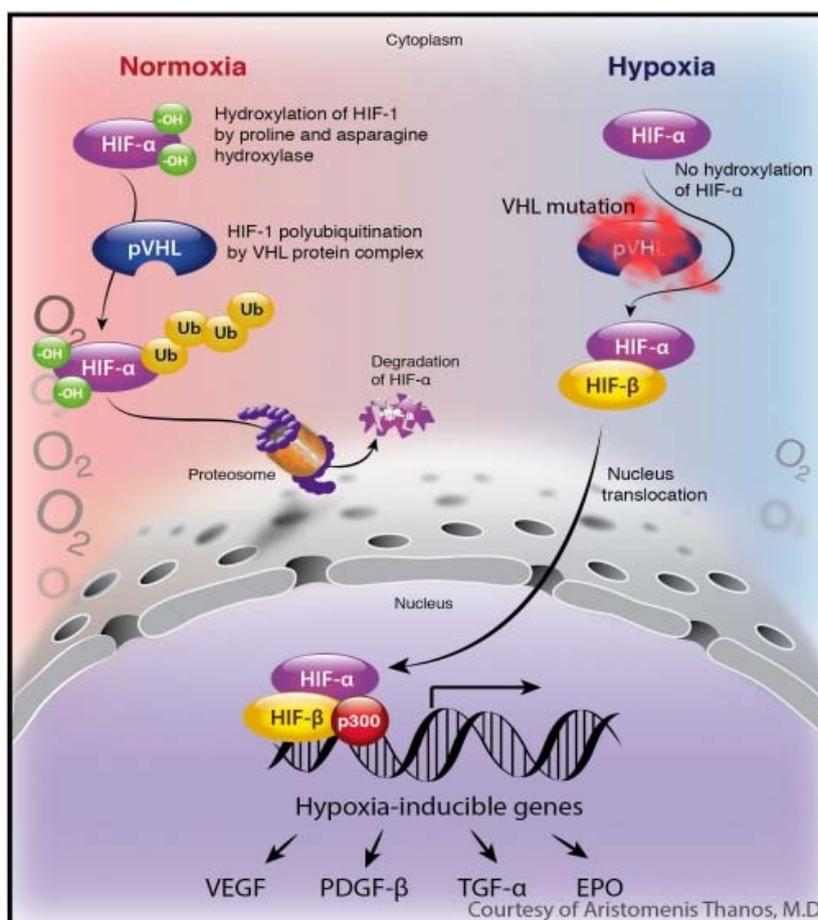
Curiosamente, durante a maior parte do século XX, a doença de VHL foi considerada uma condição rara, e, portanto de pouco interesse clínico por

aparentemente, não possui relevância para amplos estudos em câncer. No entanto, a descrição inicial do VLH em 1993, através de estudos envolvendo famílias com a Síndrome Hereditária da Doença VHL, que é caracterizada por susceptibilidade para tumores altamente vascularizados tais como hemangioblastomas de retina e de Sistema Nervoso Central (SNC), tumores neuroendócrinos e pancreáticos, cistos renais e ccCCR, representou um importante passo para a nossa compreensão atual da fisiopatologia do CCR (BYLER e BRATSLAVSKY 2014).

Atualmente, sabe-se que a mutação do gene VHL é transmitida de forma autossômica dominante, afeta aproximadamente 1 a cada 35.000 pessoas, sendo observada em cerca de 75% dos casos de ccCCR (BALDEWIJNS et al. 2010).

Geneticamente, o gene VHL localiza-se no braço curto do cromossomo 3, na posição 3p25-26, sendo expresso amplamente nos tecidos humanos, além de codificar uma proteína de 213 aminoácidos com 30 kDa (pVHL₃₀) aparentemente encontrada no citoplasma, e uma proteína menor, de 160 aminoácidos com 19 kDa (pVHL₁₉) aparentemente encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo celular. Ambas as proteínas são funcionais, e estudos demonstraram que as duas isoformas têm efeitos equivalentes, e que ambas as isoformas possuem atividade supressora de tumores *in vivo* (ILIOPOULOS et al. 1998; SCHOENFELD et al. 1998). Basicamente, as isoformas de pVHL são compostas por um domínio α (HIF- α), que é sensível à hipóxia e faz parte do mecanismo de detecção de oxigênio celular e um domínio β (HIF- β) que se encontra

constitutivamente presente nas células, e possui a capacidade de reconhecer e se ligar a substratos, incluindo HIF- α , formando um complexo com Ubiquitina ligase E3, direcionando HIF- α para a degradação proteossômica mediada pela presença de oxigênio no citoplasma celular (TARADE e OHH 2017) conforme ilustrado na Figura 2.



Fonte: Adaptado de VAGGAS et al. (2016).

Figura 2 - Representação da participação de VHL na regulamentação do HIF sob Normóxia e Hipóxia

Diante deste cenário em condições de hipóxia, ou situações que envolvem mutação genética, VHL torna-se incapaz de se ligar a HIF e

mediar a sua degradação. Pacientes com doença de VHL hospedam um único alelo mutante, e o desenvolvimento do tumor depende da inativação ou perda espontânea do segundo alelo tipo selvagem (GOSSAGE et al. 2015). A inativação completa do VHL pode ocorrer através de mecanismos genéticos (mutações pontuais, inserções e deleções) e/ou epigenéticos (metilação do promotor), e constitui um passo crucial para o desenvolvimento de ccCCR (HSIEH et al. 2017).

A maioria dos tumores surge de forma esporádica, mas em alguns casos, os pacientes são portadores da síndrome de von Hippel-Lindau, uma condição autossômica dominante rara, também associada a uma variedade de outros tumores que incluem hemangioblastomas da retina e do sistema nervoso central (WARREN e HARRISON 2018).

No cenário oncológico, HIF desempenha um papel central na tumorigênese renal, atuando basicamente como um fator de transcrição para diversos genes envolvidos na angiogênese, como o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), na proliferação de células tumorais, como o Fator de Crescimento Transformante alfa (TGF α), bem como na sobrevivência e progressão celular, disseminação metastática, apoptose e metabolismo da glicose (NOVICK 2007). Em conjunto, a ativação destes genes contribui para regular a agressividade e a imprevisibilidade tumoral (HSIEH et al. 2017).

1.5 TRATAMENTO DO CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

As abordagens terapêuticas tradicionalmente usadas para tumores com menos de sete centímetros de diâmetro consistem basicamente na ressecção tumoral por nefrectomia parcial. Já, para tumores maiores que sete centímetros, o tratamento primário consiste na realização de uma nefrectomia radical associada à remoção da glândula adrenal ipsilateral e de linfonodos regionais e trombectomia tumoral (caso haja a presença de trombo venoso) porém, aproximadamente 30% dos pacientes com doença localizada eventualmente, desenvolvem metástase (KOUL et al. 2011; HSIEH et al. 2017).

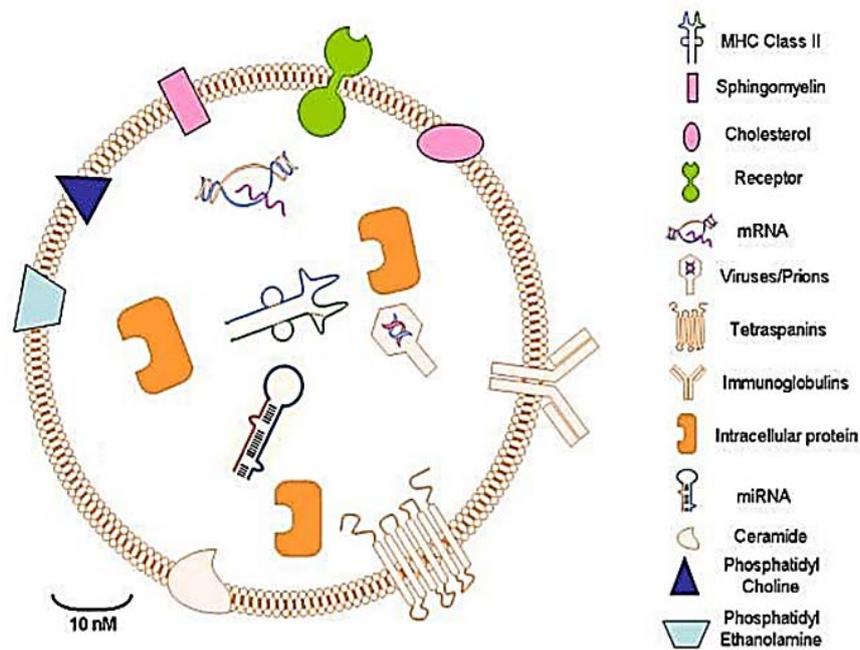
Diante desse cenário, atualmente ainda existe um enorme desafio a ser vencido pela prática clínica, que é como melhorar o diagnóstico nos estágios iniciais da doença através do desenvolvimento de métodos que possam detectar tumores malignos, transpondo os efeitos colaterais da biópsia e de outras abordagens tradicionais de diagnóstico.

Por este motivo, estudos que visem estabelecer novas estratégias para melhorar o seguimento dos pacientes durante o tratamento são de extrema importância. Nesse contexto, a identificação de biomarcadores presentes em Vesículas Extracelulares (VEs) tem ganhado destaque (RATAJCZAK et al. 2006; EL ANDALOUSSI et al. 2013).

1.6 VESÍCULAS EXTRACELULARES COMO TRANSPORTADORES DE BIOMARCADORES EM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIS

A comunicação intercelular é um processo essencial de organismos multicelulares e pode ser mediado tanto pelo contato direto célula-célula, como pela transferência de moléculas secretadas, sendo muito importante tanto para células normais como para células tumorais (RASHED et al. 2017).

Biologicamente, as células possuem a capacidade de secretar para o ambiente extracelular diversos tipos de Vesículas Extracelulares (VEs), que são constituídas por uma bicamada lipídica com proteínas transmembranares inseridas, além de, enzimas e outras moléculas que estão ligadas a funções específicas do tipo celular (Figura 3) (SALIDO-GUADARRAMA et al. 2014; THUMA e ZÖLLER 2014).



Fonte: Adaptado de AZMI (2013).

Figura 3 - Estrutura e composição das Vesículas Extracelulares.

Alternativamente VEs representam um importante meio de comunicação intercelular, servindo como veículos para transferência de proteínas, lipídios, RNA mensageiro e micro RNAs, que refletem a célula de origem, desempenhando papéis fundamentais em diversos processos fisiológicos e patológicos (RAPOSO e STOOORVOGEL 2013).

Durante as últimas décadas, as VEs têm ganhado popularidade, devido a sua importância na regulação de respostas imunes, seu potencial terapêutico e contribuição para o início e progressão de patologias diversas, entre elas o câncer (HROMADA et al. 2017).

Nos tumores, a comunicação celular intermediada por VEs está associada ao desenvolvimento e progressão do câncer através da invasão,

angiogênese, metástase, quimio-resistência, e capacidade de escapar da vigilância imunológica (GRANGE et al. 2011).

A indução da angiogênese representa uma das características marcantes do câncer, e numerosos esforços têm sido empregados para correlacionar biomarcadores presentes em VEs e angiogênese. Aparentemente, VEs de células tumorais que contenham TNF α , IL1 β , TGF β e TNFR1 recrutam progenitores de células hematopoiéticas, e promovem a angiogênese, contribuindo para a progressão e imprevisibilidade tumoral (PANT et al. 2012).

Nesse contexto, uma vez que as células tumorais liberem ativamente VEs para a corrente sanguínea, acredita-se que, estas vesículas sejam uma fonte de RNA estável, que poderia ser utilizada para identificar marcadores de diagnóstico e prognóstico ou ser empregada como agentes terapêuticos (FEVRIER e RAPOSO 2004).

Porém, a utilização dessas VEs como transportadoras de biomarcadores em CCR têm sido pouco explorada, e a maior parte dos biomarcadores identificados até o momento estão relacionados ao processo de angiogênese, progressão tumoral e evasão imunológica (GRANGE et al. 2011; GAI et al. 2019; GRANGE et al. 2019).

Além disso, outra grande dificuldade de se utilizar as VEs como ferramenta de biopsia líquida é a ausência de marcadores tumorais específicos, ou seja, todos os tipos celulares são capazes de produzir e liberar VEs (RATAJCZAK et al. 2006; GAI et al. 2019).

Assim, em linhas gerais, este trabalho propõe que o isolamento de VEs através do plasma poderá contribuir com a identificação de biomarcadores tumorais em pacientes portadores de CCR. Nossa estratégia consiste em usar os PDX pra identificar VEs humanas no sangue dos animais. Para isso é necessário estabelecer a plataforma de PDX renais e padronizar os métodos de enriquecimento de vesículas do sangue.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo central do presente estudo foi estabelecer uma plataforma de estudos baseada em xenoenxertos tumorais de carcinoma de células renais em animais imunodeficientes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Padronização do protocolo de implantação, monitoração e anotação dos PDX no A.C.Camargo Cancer Center.
- 2 Comparação morfológica (imunohistoquímica) e genética entre os tumores oriundos dos pacientes e os tumores gerados nos camundongos.
- 3 Estabelecer os melhores métodos para criopreservação dos xenoenxertos para possibilitar seu armazenamento e uso em projetos futuros.
- 4 Padronização do isolamento de VEs do plasma de camundongos portadores de CCR e fracionamento do conteúdo vesicular tumoral (humano) com a utilização de anticorpos que reconhecem epítomos humanos.

3 METODOLOGIA

3.1 CASUÍSTICA

Para este estudo, foram recrutados setenta e três pacientes portadores de CCR de qualquer subtipo histológico. As regiões tumorais foram identificadas a partir da peça cirúrgica por um patologista que ficou encarregado de separar fragmentos de até 1cm³ representativos da amostra tumoral.

As amostras foram transportadas resfriadas, acondicionadas em tubos estéreis com meio de cultura e antibiótico.

Critérios de inclusão: Para o estabelecimento dos xenotransplantes, foram utilizados fragmentos de CCR de qualquer tipo histológico, provenientes de pacientes atendidos no A.C.Camargo Cancer Center que aceitem participar do estudo.

Critérios de exclusão: Foram excluídos deste estudo os pacientes submetidos a tratamento prévio (quimioterapia).

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE IMPLANTE ECTÓPICO (SUBCUTÂNEO)

Foram utilizados 135 camundongos NOD Scid Gamma - NSG (*Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EUA*) de ambos os sexos. Estes animais são produzidos e fornecidos pelo Biotério do A.C.Camargo Cancer Center, e todos os procedimentos experimentais foram avaliados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais, CEUA que aprovaram este projeto sob o número 075/16.

Nas instalações do Biotério da instituição, o tecido foi processado e fragmentos de 1 a 3 mm e foram implantados subcutaneamente no dorso dos camundongos NSG previamente pesados e anestesiados através da injeção intraperitoneal de Cetamina (Ketamin-S, Crisália) e Xilasina (Ronpun, Bayer) na concentração de 10ul/g/peso.

Com o auxílio de uma *cancer implant needle* 11G x 3-1/4" (Cadence Science), um a cinco fragmentos tumorais foram implantados em até cinco animais. Após a recuperação anestésica, os animais foram devolvidos aos microisoladores e monitorados periodicamente para a observação do crescimento tumoral.

Quando os animais apresentaram crescimento tumoral com tamanho aproximado de 1 cm³, eles foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia, o tumor foi removido, processado e submetido a avaliação histológica.

Parte dos tumores foi utilizada para reimplantação em um segundo lote

de animais e outra parte foi criopreservada em biorrepositório (Figura 4). O fluxograma abaixo ilustra os procedimentos que foram realizados com os camundongos.

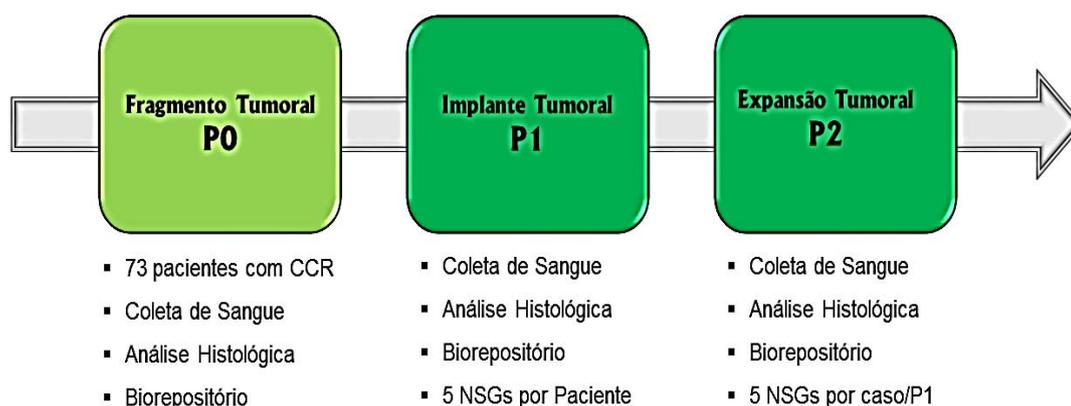


Figura 4 - Fluxograma ilustrando o desenho experimental da plataforma de xenoenxertos tumorais baseados em carcinomas de células renais.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE IMPLANTE ORTOTÓPICO DE CCR

A padronização do modelo experimental de implante ortotópico de CCR foi baseada na metodologia descrita por Pavía-Jiménez, em 2014 (PAVÍA-JIMÉNEZ et al. 2014), com a colaboração do Professor Dr. Humberto Delle da Universidade Nove de Julho. Nas instalações do Biotério, os animais foram inicialmente pesados e anestesiados através da injeção intraperitoneal de Cetamina (Ketamin-S, Crisália) e Xilasina (Ronpun, Bayer) na concentração de 10ul/g/peso. Posteriormente, foi realizada a tricotomia da região lombar esquerda, seguindo-se da assepsia local com digluconato

de clorexidina (RIOHEX) a 0,2%.

Foi realizada uma lombotomia longitudinal esquerda de aproximadamente 1 cm de comprimento, em seguida um campo cirúrgico estéril foi posicionado sobre a incisão. Com o auxílio de pinças específicas do tipo relojoeiro e de dissecação as vísceras foram afastadas e o rim foi isolado e externalizado.

Após a externalização do rim, foi realizada uma incisão transversal na cápsula renal de aproximadamente 2 mm com auxílio de um bisturi. Durante todo o procedimento o rim foi umedecido com solução de PBS estéril para evitar o ressecamento da cápsula renal.

Em seguida a cápsula renal foi divulsionada do córtex renal com o auxílio de uma pinça de relojoeiro curva e sem ponta para evitar abrasão e eventuais danos ao córtex renal, posteriormente, os fragmentos tumorais foram posicionados separadamente na região subcasular renal (2 a 4 fragmentos por animal).

O rim então foi devolvido à cavidade abdominal, e foi realizado o fechamento da parede abdominal em dois planos: o primeiro com a sutura da camada muscular, e o segundo com a sutura da pele. Para ambas as suturas foi utilizado fio Nylon 4.0 (Microsuture®, São Paulo, Brasil) através da confecção de pontos separados de sutura simples equidistantes entre si.

Por fim, foi realizada novamente uma assepsia local, e os animais passaram a ser acompanhados periodicamente para análise de achados clínicos e/ou evidência de crescimento tumoral.

3.4 ACOMPANHAMENTO PÓS OPERATÓRIO

Na avaliação pós-operatória, todos os animais foram acompanhados periodicamente para avaliação de sinais de dor (nas primeiras 48 horas do pós-operatório). Caso os animais apresentassem sinais de dor, eles recebiam uma injeção de Tramal intramuscular (Cloridrato de Tramadol, Medley, Campinas, Brasil) diluído em solução de PBS estéril.

Nas avaliações subsequentes, o intuito foi verificar a presença de algum sinal clínico que pudesse está associado ao crescimento de tumor como perda de peso e caquexia. O monitoramento de evidência de crescimento tumoral foi realizado através de lombotomias e de palpação lombar.

Todos os animais foram mantidos nas instalações do Biotério da instituição, distribuídos em gaiolas com sistema de fecho com filtro (5 animais por gaiola), onde permanecem acomodados durante todo o protocolo experimental, recebendo água e ração *ad libitum*.

3.5 COLETA DE SANGUE E ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS

Durante o procedimento da eutanásia, imediatamente após a indução da anestesia, foi realizada a assepsia com digluconato de clorexidina (RIOHEX) a 0,2%, seguindo-se da tricotomia da região do tórax, em seguida, com o auxílio de uma pinça anatômica e uma tesoura de íris foi realizada uma toracotomia para ter acesso ao coração, e o sangue dos animais foi

coletado com agulha 26G acoplada em uma seringa de 1 ml, por punção transcardíaca, a partir do ventrículo esquerdo.

Aproximadamente 1,5 ml de sangue foi coletado e processado em solução contendo ácido cítrico, citrato, dextrose (solução ACD) (LACROIX et al. 2012) em seguida com os animais ainda sob anestesia, foi realizado o aprofundamento do plano anestésico seguido por deslocamento cervical. Posteriormente o plasma foi separado por duas centrifugações a 2500xg por 15 minutos à temperatura ambiente e congelado a -80° C até a sua utilização.

3.6 CRIOPRESERVAÇÃO

Durante o processamento das amostras, parte dos fragmentos tumorais (pacientes e xenoenxertos) foram criopreservados. Os criotubos contendo os fragmentos tumorais foram imediatamente acondicionados em recipientes que permitem o congelamento lento e gradual dos tecidos em ultrafreezer (-80° C). Os criotubos permaneceram por até 48h no ultrafreezer para, então, serem transferidos para o nitrogênio líquido para armazenamento a longo prazo. Os criotubos foram devidamente identificados para conter todas as informações essenciais como RGH do paciente, número da passagem do tumor, meio de congelamento, data e usuário. Para o descongelamento, a solução contendo os fragmentos foi aquecida em banho-maria (37° C), os fragmentos foram lavados rapidamente duas vezes com meio DMEM sem soro a 37° C e

imediatamente implantadas nos camundongos (SRINIVASAN et al. 2015).

Outra condição para criopreservação dos tumores consiste na utilização de protocolos de vitrificação. Este processo consiste no rápido congelamento do tecido tumoral (na presença de criopreservantes) em nitrogênio líquido e tem sido utilizado como alternativa ao convencional congelamento lento (LUNARDI et al. 2012).

3.7 CONDIÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO

Como primeira abordagem, os fragmentos tumorais foram criopreservados em solução de congelamento contendo 40% de meio de cultura DMEM, 50% de soro fetal bovino e 10% do agente criopreservante dimetilsulfóxido (DMSO). Essa metodologia é amplamente utilizada por nosso grupo para o congelamento de células mantidas em cultura.

Os criotubos contendo os fragmentos tumorais foram mantidos em ultra freezer (-80° C), e posteriormente armazenados em nitrogênio líquido (após 48 horas).

Como segunda estratégia de criopreservação, os fragmentos tumorais foram acondicionados em solução de vitrificação filtrada, contendo 70% de meio de cultura DMEM, 20% de DMSO, 10% de soro fetal bovino e 0,17g de Sacarose.

O protocolo de vitrificação utilizado foi anteriormente descrito por LUNARDI et al. (2012), para testar a viabilidade de folículos ovarianos de ovinos. Em seguida, os criotubos foram armazenados em nitrogênio líquido,

até o momento que foram descongelados e reimplantados.

3.8 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para as reações de imunohistoquímica os tecidos tumorais foram avaliados para a expressão de PAX8, Citoceratina-7 (CK7), Anidrase Carbônica IX (CA IX) e Alfa-metilacil coenzima A racemase (AMACR) (WILLIAMSON et al. 2017). As análises de expressão foram realizadas com o uso do software Scanscope (Aperio).

3.9 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARA SEQUENCIAMENTO

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

O tecido seguiu para extração no Banco de Macromoléculas de acordo com o protocolo operacional padrão interno. O tecido congelado (até 50mg) foi lavado com PBS (pH 7,5 1x), digerido com proteinase K (Qiagen, CA, EUA) e tratado com RNase A (Qiagen, CA, EUA). A extração do DNA foi feita de forma automatizada no equipamento QIASymphony (Qiagen, CA, EUA) utilizando o kit QIASymphony DSP DNA Midi (Qiagen, CA, EUA). A pureza e concentração do DNA são avaliadas nos equipamentos

Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, DE, EUA) e Qubit QUANT-IT dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies), respectivamente. A integridade foi determinada com equipamento Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, CA, EUA). O TapeStation gera uma nota de qualidade do DNA que vai de 0-10, sendo 10 o DNA na sua forma mais íntegra.

3.10 PREPARO DE BIBLIOTECA E SEQUENCIAMENTO

As bibliotecas das amostras de DNA do tumor e do leucócito do paciente foram construídas de acordo com o kit QIAseq Targeted DNA Custom Panel (QIAGEN). Os fragmentos gerados passaram por diversas etapas durante este protocolo, e no passo final, ocorre a amplificação da biblioteca final e a inserção de adaptadores específicos da plataforma Illumina utilizando o kit QIAseq 96-Index I Set A (QIAGEN) em cada amostra.

O sequenciamento das bibliotecas construídas a partir do painel customizado, utilizando o kit QIAseq Targeted DNA Custom Panel (QIAGEN) foi realizado na plataforma NextSeq 500 - Illumina. Os painéis genéticos permitem analisar vários genes relacionados com o câncer renal, através da utilização de tecnologias de sequenciamento de alto desempenho.

Esta metodologia fornece alta qualidade, eficiência, aliadas a rapidez no processamento de vários genes simultaneamente. Para este projeto, foram utilizados 21 genes envolvidos na patogênese do câncer renal, descritos na literatura. São eles: VHL, ARID1A, KDM6A, PBRM1, SMARCA4, SMARCB1, BAP1, PCF11, NFE2L2, SETD2, AR, STAG2, KDM5C, MET, CDKN2A,

PTEN, FAT1, FH, TP53, NF2, e FLCN. Além destes genes, este painel contempla 7 (sete) regiões hotspots (genes que estão frequentemente alterados em diferentes tipos de câncer. São elas: MTOR, PIK3CA, NRAS, BRAF, EGFR, KRAS, e TCEB1. Para confirmar o repertório mutacional encontrado no tumor do paciente no tumor do xenoenxerto, foi realizado o sequenciamento de amplicon. As bibliotecas de amplicon foram construídas com o kit Ion Plus Fragment Library (Thermo Fisher), de acordo com o protocolo do fabricante, e o sequenciamento realizado na plataforma plataforma Ion Proton (Thermo Fisher).

3.11 CITOMETRIA

A preparação de VEs (50 ul em PBS) foi incubada com anticorpos CD63-AlexaFluor 647 (clone H5C6, BD Biosciences # 561983) e CD105-PE/Cy7 (clone MJ7/18, Biolegend # 120409) na diluição 1:50, por 1h à temperatura ambiente. As VEs foram centrifugadas em ultracentrifuga (CLS Airfuge, Beckman Coulter) por 1h à 100.000 g. O pellet foi ressuspendido em PBS e analisado no BD FACS Fortessa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE IMPLANTE ECTÓPICO DE CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

Para esta etapa do trabalho, foram recrutados 27 pacientes com diversos subtipos histológicos, estadiamento patológico e grau histológico, conforme encontra-se descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínico-patológicas dos pacientes recrutados para a padronização do implante ectópico de CCR.

Idade	38 - 74	
Homens	17	
Mulheres	10	
Subtipo Histológico	Células Claras	15
	Papilífero I	4
	Papilífero II	-
	Oncocitoma	3
	Cromóforo	2
	Cisto Renal	1
	Translocação de MiT	1
	Angiomolipoma	1
	Estadiamento patológico	pT1
pT1a		13
pT1b		4
pT2		-
pT2a		-
pT2b		-
pT3		5
pT3a		5
pT3b		-
pT4		-
Benignos		5
Grau Histológico - ISUP		1
	2	8
	3	9
	4	3
	Benignos	5

As amostras tumorais foram previamente fragmentadas e implantadas ectopicamente na região dorsal de camundongos NSGs, porém, apresentaram baixo rendimento em termos de viabilidade e crescimento tumoral. Dos 27 casos implantados ectopicamente, somente três casos desenvolveram massas tumorais.

Os três casos apresentaram um crescimento local (sítio primário do implante) e em dois casos houve o desenvolvimento de lesões à distância em linfonodos de região inguinal e cervical.

Os animais foram monitorados periodicamente e quando os tumores apresentaram crescimento equivalente a 1cm^3 foram removidos e enviados para análise histológica, conforme ilustrado abaixo (Figura 5).

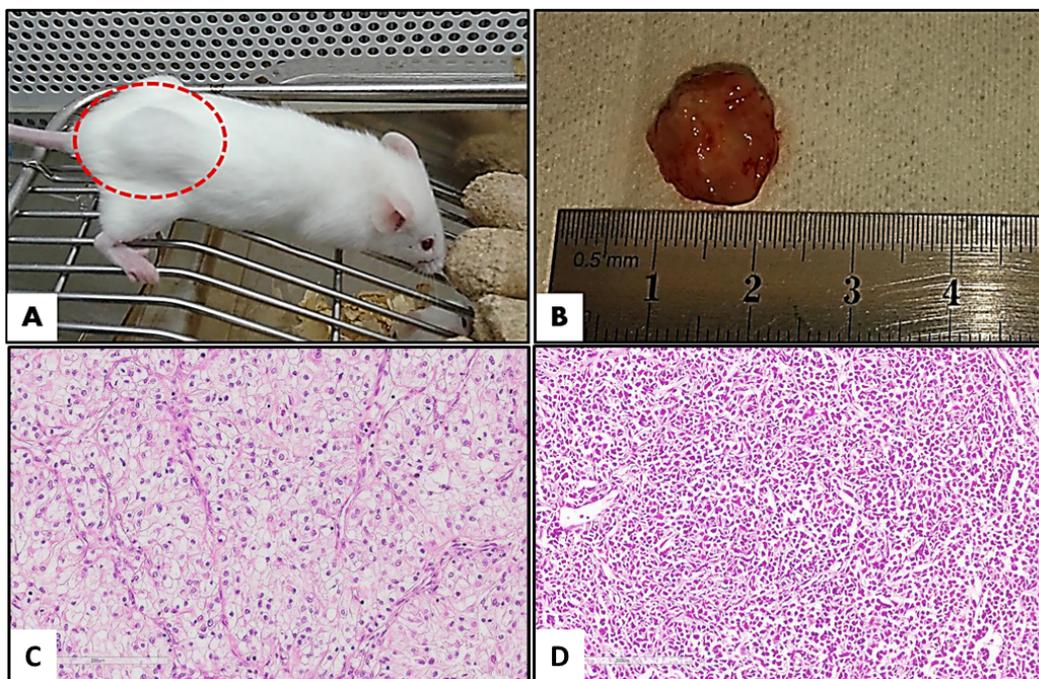


Figura 5 - Evidência de crescimento, ressecção tumoral e análise histológica nos animais que receberam implante ectópico. **(A)** Animal NSG com crescimento tumoral em evidência. **(B)** Ressecção tumoral. **(C)** Análise histológica do tumor obtido do paciente. **(D)** Análise histológica do tumor obtido do PDX.

Após a comparação morfológica dos tumores por histologia, foi observado que, para os três casos houve o desenvolvimento de uma lesão linfoproliferativa pós-transplante ou PTLD (*Post-transplant Lymphoproliferative Disease*), tornando o tumor obtido do animal completamente diferente do tumor primário. Basicamente, PTLD representa uma massa tumoral que não está relacionada ao CCR e, portanto, não reflete a doença humana.

Inúmeros trabalhos sugerem que tipo de lesão está associada à transformação maligna de linfócitos T oriundos do fragmento tumoral que frequentemente está relacionada à infecção por Epstein-Barr Vírus (ISLAS-OHLMAYER et al. 2004; CHEN et al. 2012; WHITE et al. 2012). Basicamente, os animais acometidos com este tipo de lesão, apresentam comprometimento de órgãos linfoides como baço, fígado, timo e linfonodos.

Para fins confirmatórios, foi realizada uma imunoistoquímica nesses tumores para Citoceratina AE1/AE3 e CD45. A análise histopatológica não indicou se tratar de um CCR devido à ausência de marcação de AE1/AE3 e marcação positiva para CD45, indicando origem linfoide.

Os resultados obtidos encontram-se representados abaixo, na Figura 6.

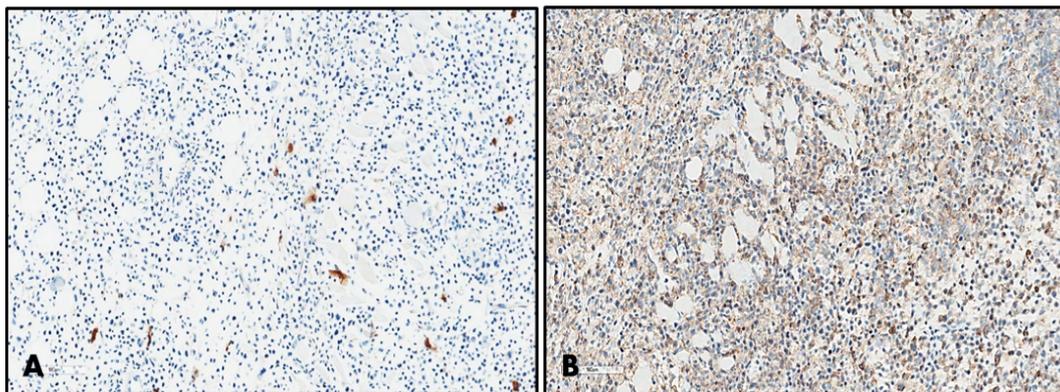


Figura 6 - Imunohistoquímica para confirmação de PTLD nos tumores ectópicos. (A) Citoceratina AE1/AE3. (B) CD45.

Devido ao baixo rendimento com o crescimento dos tumores implantados ectopicamente, e com o acometimento de alguns animais com lesões do tipo PTLD, embasados em inúmeros estudos já descritos na literatura, optamos por revisar a metodologia de implante dos fragmentos, e estabelecer o modelo de implante ortotópico por via subcapsular renal.

4.2 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA CIRÚRGICA DE IMPLANTE ORTOTÓPICO DO CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

Em nosso laboratório, a maior dificuldade encontrada na padronização deste modelo ocorreu após a externalização e isolamento do rim, ainda nos treinos iniciais as tentativas de divulsionar a cápsula renal do córtex renal resultaram em destruição da cápsula em consequência da delicadeza do tecido, do frequente ressecamento da cápsula renal, e dos danos causados ao córtex renal que frequentemente resultavam em sangramentos e formações de eventuais coágulos, dificultando e/ou

impossibilitando o implante dos fragmentos de CCR.

No entanto, este problema foi solucionado ainda durante os primeiros testes, conforme o aprimoramento da técnica cirúrgica, e com a utilização de solução PBS EDTA estéril que foi usada para umedecer a superfície do rim durante o procedimento, foi possível evitar sangramentos, destruição da cápsula renal, danos ao córtex renal bem como a formação eventual de coágulos que pudessem dificultar o implante e o posicionamento dos fragmentos.

Conseguimos então estabelecer a técnica cirúrgica para padronizar o modelo experimental de xenotransplante ortotópico de CCR, que brevemente encontra-se ilustrado a seguir (Figura 7).

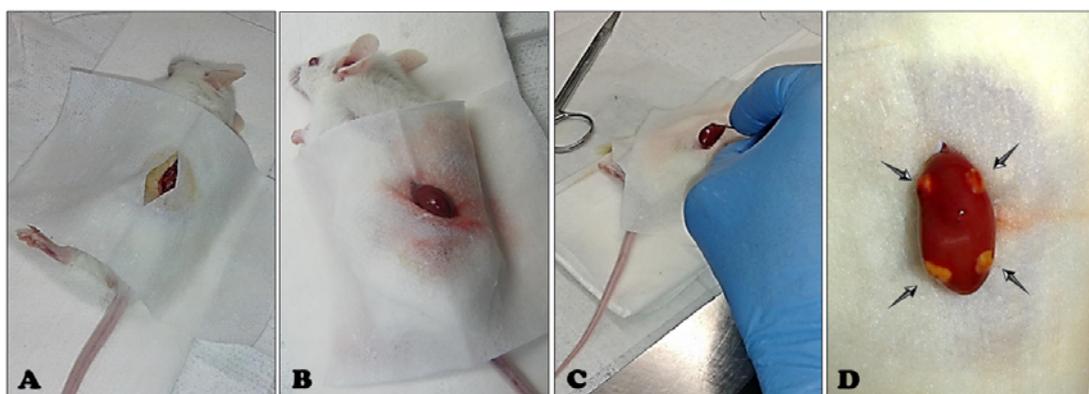


Figura 7 - Passo a passo da padronização da técnica cirúrgica aplicada no implante ortotópico de carcinoma de células renais. **(A)** Lombotomia esquerda de aproximadamente 1cm e posicionamento do campo cirúrgico. **(B)** Externalização e isolamento do rim esquerdo. **(C)** Incisão transversal na cápsula renal de ~2mm. **(D)** Posicionamento de 4 fragmentos tumorais subcapsular no terço superior e inferior renal.

Atualmente contamos com 46 (quarenta e seis) casos de pacientes com CCR de qualquer subtipo histológico, grau e estadiamento patológico que foram recrutados e tiveram fragmentos tumorais implantados ortotopicamente, utilizando a metodologia anteriormente descrita.

A Tabela 2 mostra as características clínico-patológicas dos pacientes recrutados até o momento para esta etapa do trabalho.

Tabela 2 - Características clínico-patológicas dos pacientes recrutados para padronização do implante ortotópico de CCR.

Idade	21 - 80	
Homens	34	
Mulheres	12	
Subtipo Histológico	Células claras	26
	Papilífero I	4
	Papilífero II	2
	Oncocitoma	5
	Cromóforo	3
	Túbulo papilar	3
	Translocação de MiT	1
	Inclassificável	2
Estadiamento patológico	pT1	32
	pT1a	21
	pT1b	11
	pT2	3
	pT2a	3
	pT2b	-
	pT3	6
	pT3a	5
	pT3b	1
	pT4	-
	Benignos	5
Grau Histológico - ISUP	1	4
	2	15
	3	20
	4	2
	Benignos	5

Do total de casos implantados, foi possível verificar evidências de crescimento tumoral (por palpação) em 10 (dez) casos dos 46 casos implantados, em 100% dos animais implantados.

No entanto, devido a grande demanda de tempo hábil para o estabelecimento e caracterização dos casos, até o momento, apenas três casos, encontram-se devidamente caracterizados, e serão apresentados a seguir.

Após a ressecção dos tumores renais, o tecido foi fragmentado em pedaços menores, onde, uma parte foi enviada para a análise histológica, que foi adotada para fins confirmatórios e comparação morfológica com o tumor primário, e realização de imunistoquímica, parte foi criopreservada (biorepositório), para que possa ser utilizada em estudos futuros, parte do tecido foi utilizada para realização de sequenciamento onde poderiam ser identificadas as alterações genéticas no tumor primário e no tumor obtido do PDX, e por fim, outra parte foi utilizada para fazer uma nova passagem do tumor (P2) em novo lote de animais.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO 1ª CASO (XR 19): CCR PAPILÍFERO

II

O primeiro caso onde foi observado crescimento tumoral tratava-se de um paciente do sexo masculino, 70 anos, grau de ISUP 3, e estadiamento patológico pT3a, com um CCR do subtipo histológico Papilífero II, submetido a nefrectomia radical.

Além dessas características, é importante destacar a presença no paciente de outros desfechos clínicos importantes como: Infiltração da cápsula renal, gordura perirrenal e seio renal, além de invasão linfática e acometimento de linfonodal.

Neste caso não foram identificadas a presença de componente sarcomatoide, componente rabdoide e necrose.

Clinicamente, trata-se de um subtipo menos frequente, porém maligno, associado a um mal prognóstico e sobrevida baixa, entre os seus pacientes. Morfologicamente, caracteriza-se pela presença de células colunares e pseudoestratificadas alinhadas com citoplasma eosinofílico, e núcleos grandes (CAPITANIO e MONTORSI 2016).

É importante destacar que passados três meses da data de implante, foi possível observar crescimento tumoral por palpação em todos os animais implantados. A caracterização macroscópica e análise histologia estão representadas na Figura 8.

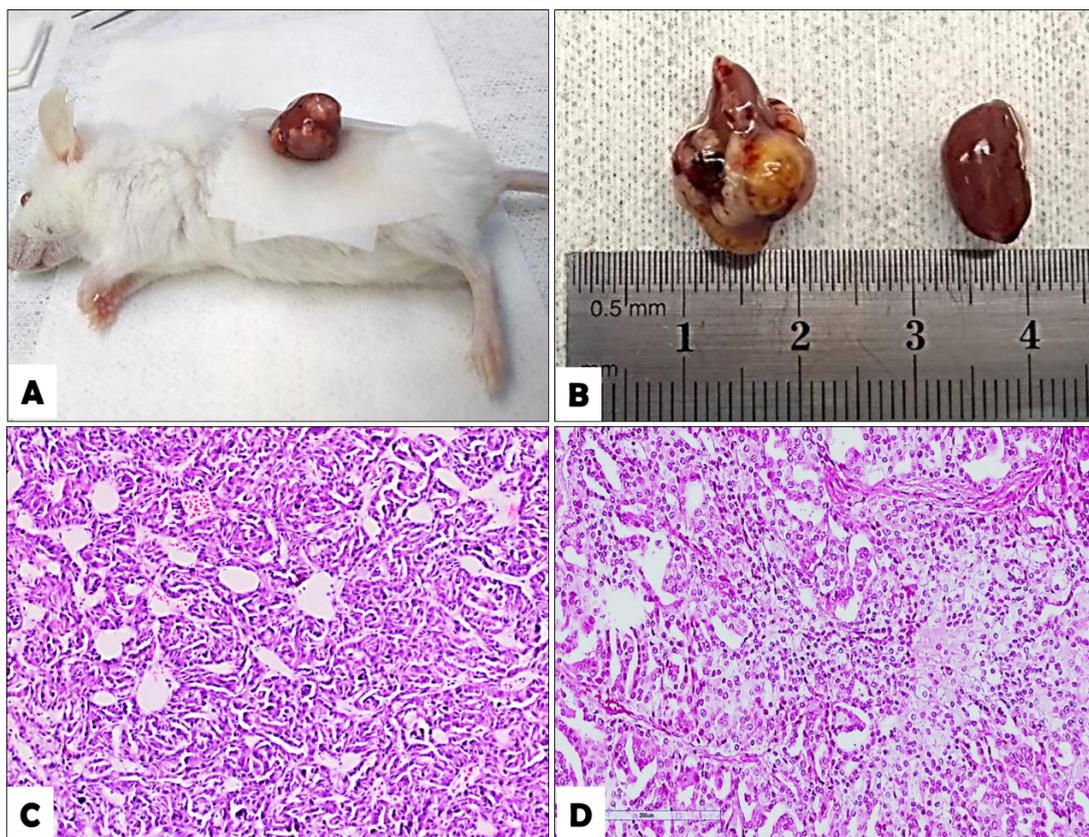


Figura 8 - Estabelecimento do modelo experimental (CCR Papilífero II). **(A)** Evidência de crescimento tumoral verificada por lombotomia. **(B)** Comparação entre o rim afetado pelo CCR e o rim remanescente. **(C)** Análise histológica do tumor obtido do PDX. **(D)** Análise histológica do tumor do paciente. Aumento = 200 μm

Após a confirmação do caso, dada por um médico patologista, foi realizada a comparação entre os tumores obtidos dos PDX e o tumor do paciente, utilizando a técnica de imunohistoquímica.

Para a caracterização deste caso, foram utilizados os seguintes marcadores: citoceratina 7 (CK7), PAX8 e Alfa-metilacil coenzima A racemase (AMACR).

Cabe ressaltar ainda que tais marcadores são utilizados rotineiramente na prática clínica para diagnóstico de CCR do subtipo Papilífero II (WARREN e HARRISON 2018).

Conforme esperado, a marcação para CK7 foi negativa, enquanto que foi observada a marcação nuclear para PAX8, confirmando tratar-se de tecido renal, e expressão citoplasmática de AMCR, marcador específico para o subtipo Papilífero tipo II, conforme ilustrado a seguir, na Figura 9.

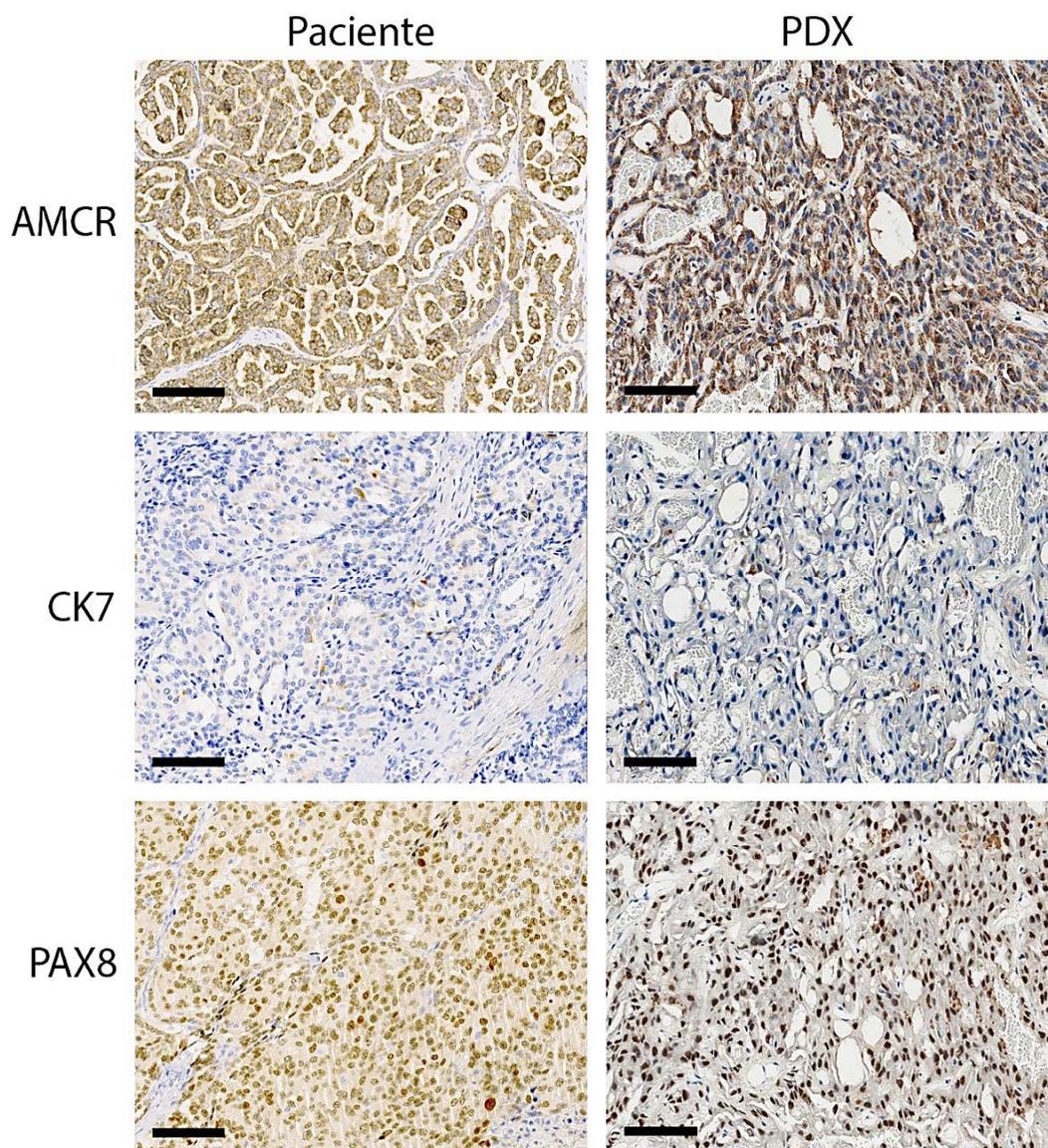


Figura 9 - Comparação por imunohistoquímica entre xenoinxerto derivado de paciente com Carcinoma de Células Renais do subtipo Papilífero tipo II. Barra de calibração = 100 μ m.

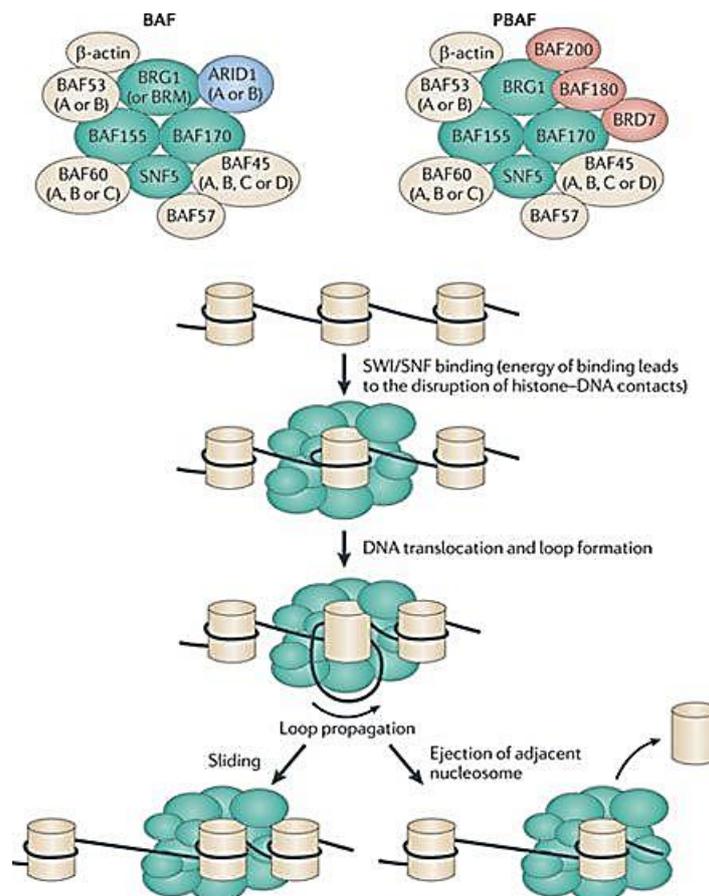
A expressão dos marcadores no xenoenxerto foi similar à encontrada no paciente, indicando que o PDX recapitulou as características morfológicas do tumor do paciente, consistente com o diagnóstico de um CCR Papilífero II.

Em seguida, foi realizado sequenciamento das amostras do paciente e PDX onde foram identificadas as alterações genéticas que são comuns entre as amostras do paciente e PDX. Neste caso, foram identificadas duas mutações no gene *ARID1A*, conforme observa-se na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise da caracterização do CCR do tipo Papilífero II (XR 19) por sequenciamento. *Lof* = Lost-of-function

Gene	Efeito	Frequência no tumor primário	Frequência no tumor do PDX
ARID1A	Lof	42%	36%
ARID1A	Lof	43%	42%

Biologicamente, o gene *ARID1A* consiste em uma subunidade do complexo de remodelamento de cromatina SWI/SNF e está envolvido nos processo de regulação da expressão gênica (Figura 10). Por este motivo, essa proteína é uma importante reguladora de diversos processos, tais como: reparo de DNA, duplicação, diferenciação e divisão celular (TAKEDA et al. 2016).



Fonte: Adaptado de WILSON e ROBERTS (2011).

Figura 10 - Participação do gene *ARID1A* nos complexos de remodelação da cromatina SWI/SNF.

Proteínas que participam do complexo SWI/SNF encontram-se frequentemente alteradas e inativadas por mutações em uma variedade de cânceres humanos (OIKE et al. 2013).

Mutações em *ARID1A* já foram relatadas em câncer de ovário, endométrio, CCR, bexiga, pulmão e mama (BITLER et al. 2017). No CCR, mutações em *ARID1A* ainda são pouco estudadas. O primeiro caso descrito na literatura é recente, e foi publicado em 2016 (CLEMONS et al. 2016).

Portanto, os reais mecanismos pelos quais mutações em *ARID1A* contribuem para a patogênese do câncer renal ainda permanecem controversos e pouco explorados.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO 2ª CASO (XR 46) - CCR CÉLULAS CLARAS

O segundo caso onde foi observado crescimento tumoral tratava-se de um paciente do sexo masculino, 45 anos, grau de ISUP 4, e estadiamento patológico pT3a, com um CCR do subtipo Células Claras, submetido a nefrectomia radical.

Parâmetros histológicos indicam a presença de componente sarcomatoide em 5% da neoplasia, presença de componente rabdoide em 5% e necrose presente em 40% da neoplasia, além da infiltração da cápsula, seio renal e veia renal, associada com invasão sanguínea e linfática.

Com o monitoramento por palpação dos animais implantados neste caso, foi possível observar crescimento tumoral após quatro meses da data de implante em todos os animais.

Basicamente, a caracterização macroscópica e histologia do PDX desse paciente estão representadas na Figura 11.

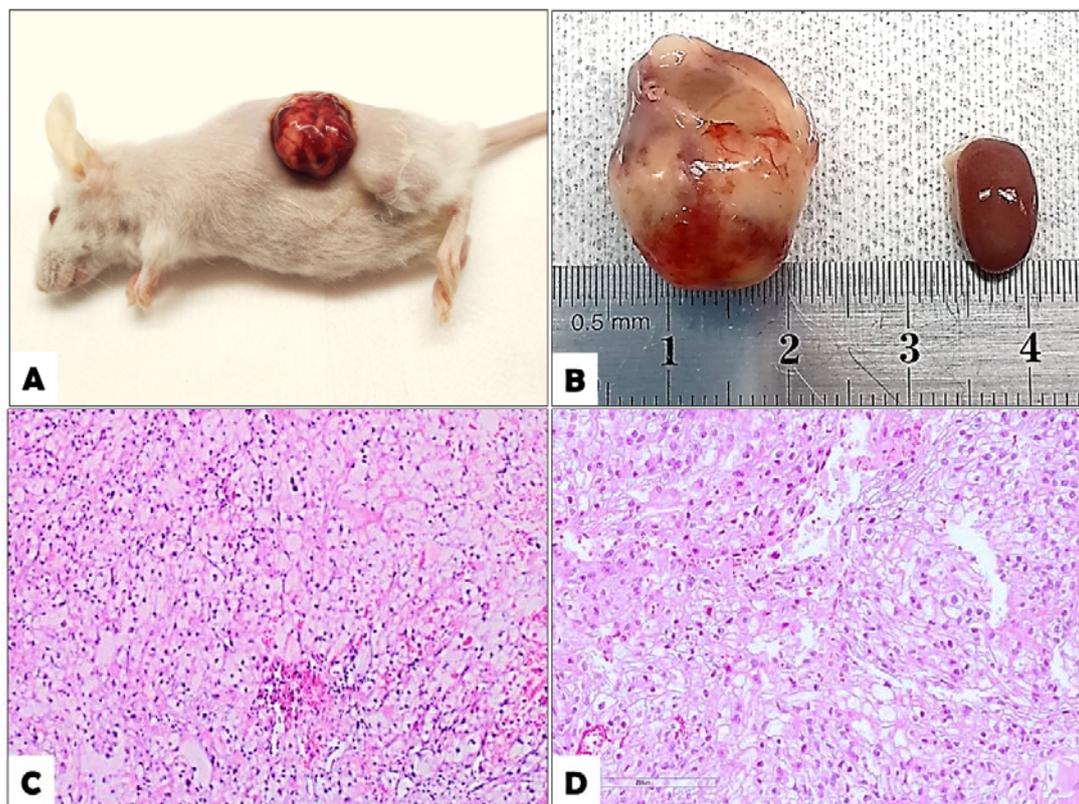


Figura 11 - Estabelecimento do modelo experimental (CCR Células Claras). **(A)** Evidência de crescimento tumoral verificada por lombotomia. **(B)** Comparação entre o rim afetado pelo CCR e o rim remanescente. **(C)** Análise histológica do tumor obtido do PDX. **(D)** Análise histológica do tumor do paciente. Aumento = 200 μm

Após a confirmação deste caso, foi realizada a comparação entre os tumores por imunohistoquímica. Para a caracterização deste subtipo foram utilizados os marcadores de diagnóstico de carcinoma de ccCCR: CK7, e Anidrase Carbônica IX (CAIX).

Foi verificado a marcação negativa para CK7, associada a uma marcação positiva para anidrase carbônica IX, confirma o diagnóstico de carcinoma de células claras, conforme representado na Figura 12.

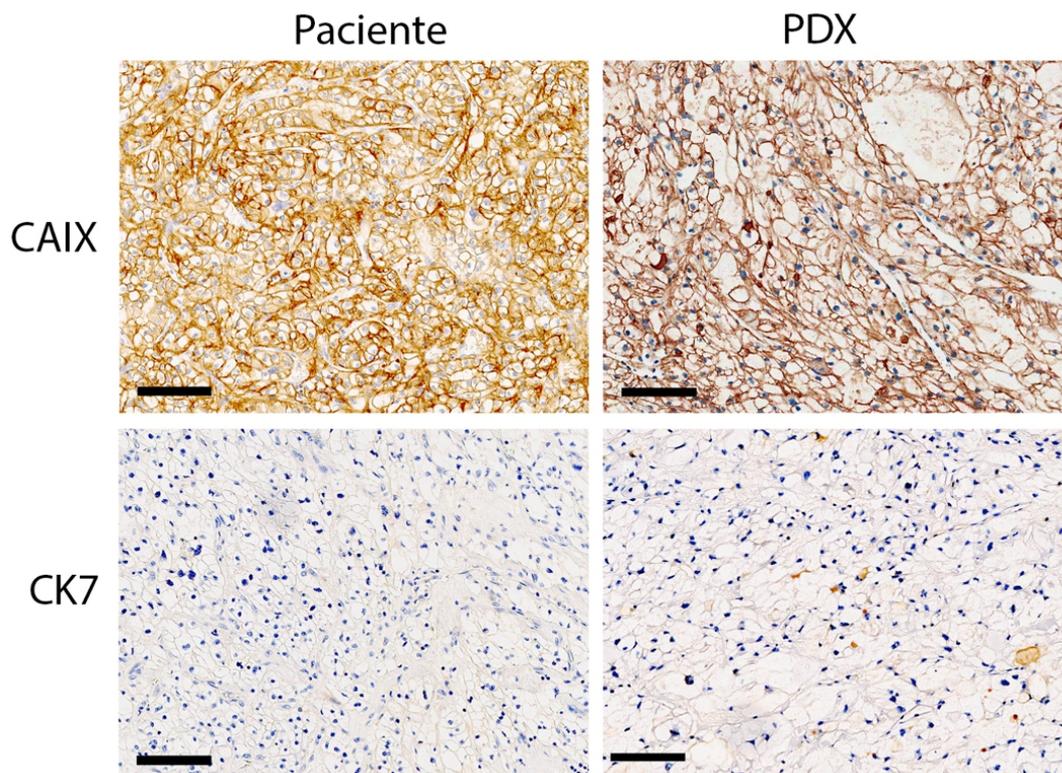


Figura 12 - Comparação por imunohistoquímica em xenoenxerto derivado de paciente com Carcinoma de Células Renais do tipo Células Claras. Barra de calibração = 100 μm

Posteriormente, foi realizado o sequenciamento da amostra de paciente e do tumor gerado no PDX. A partir desta análise foram encontradas três alterações (mutações) no tumor do paciente que estão presentes no PDX.

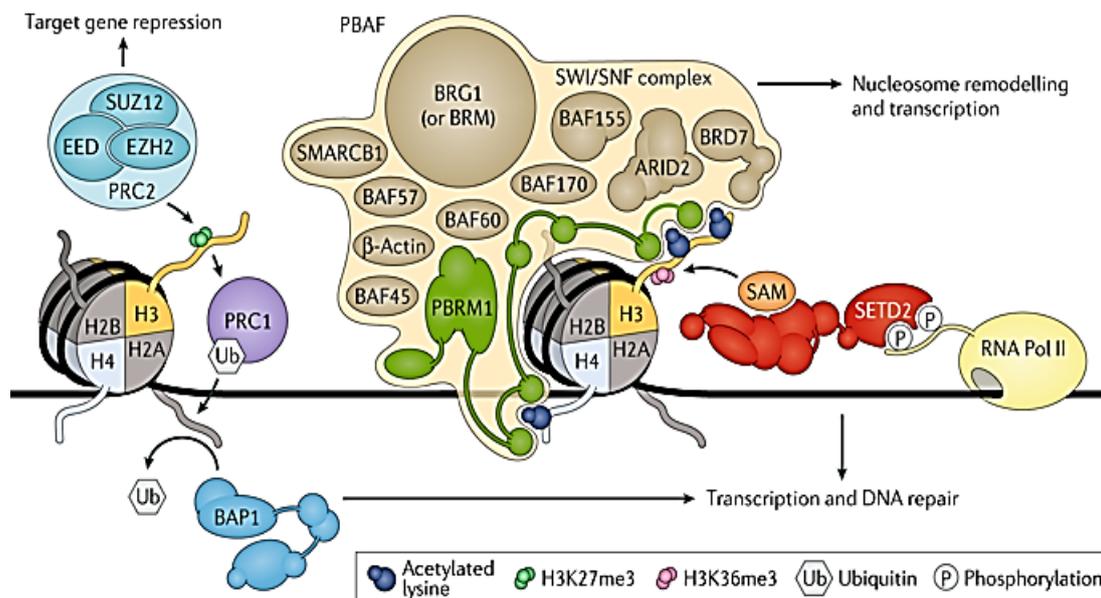
Tais alterações foram observadas nos seguintes genes: *VHL*, *PBRM1*, e *KDM5C*, conforme descrito abaixo na Tabela 4.

Tabela 4 - Análise da caracterização do CCR do tipo Células Claras (XR 46) por sequenciamento. *LoF* = Lost-of-function

Gene	Efeito	Frequência no tumor primário	Frequência no tumor do PDX
VHL	LoF	28%	79%
PBRM1	LoF	32%	98%
KDM5C	LoF	47%	99%

O VHL foi primeiro gene identificado para CCR hereditário e atualmente é conhecido por estar envolvido na maioria dos casos de CCR esporádico. Basicamente, este gene está envolvido na regulação de inúmeras vias que resultam na modelagem da matriz extracelular, regulação do ciclo celular e mediação de respostas adaptativas à hipóxia (através da ativação dos fatores indutíveis por hipóxia HIF1a e HIF2a (PAVLOVICH e SCHMIDT 2004; ESPANA-AGUSTI et al. 2017)).

Mais recentemente, estudos de sequenciamento genômico identificaram que mutações em PBRM1 representam a segunda alteração mais frequentemente ccRCC. A perda concomitante de VHL e PBRM1 pode ser observada em até 40% de todos os casos de ccCCR (VARELA et al. 2011). PBRM1 codifica a proteína BAF, presente no complexo de remodelamento de cromatina PBAF SWI/SNF, mediado pelo complexo PBAF (Figura 13), por este motivo, esta proteína está envolvida nos processos de replicação, transcrição, reparo de DNA e controle da proliferação / diferenciação celular (THOMPSON 2009).



Fonte: Adaptado de CUBAS e RATHMELL (2018).

Figura 13 - Participação do gene PBRM1 nos complexos de remodelação da cromatina SWI/SNF.

Outra importante alteração encontrada neste caso, está presente no gene KDM5C. Assim como PBRM1 e ARID1A, o gene KDM5C está envolvido na regulação das histonas e cromatina.

A atividade de histonas sobre a cromatina é crucial na regulação das funções genômicas e suas modificações frequentemente contribuem para processos regulatórios, como a repressão transcricional ou eventos de ativação que levam a alterações na expressão gênica que modulam a estrutura e a função da cromatina interferindo em processos como a replicação, reparo e transcrição do DNA (GEIMAN e ROBERTSON 2002).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO 3ª CASO (XR 14) - CCR CÉLULAS CLARAS

O terceiro caso onde foi observado crescimento tumoral tratava-se de uma paciente do sexo feminino, 78 anos, grau de ISUP 3, e estadiamento patológico pT1b, com um CCR do subtipo Células Claras, submetida a nefrectomia parcial.

Não foram identificadas a presença de componente sarcomatoide, componente rabdoide e necrose neste caso.

Quanto ao monitoramento dos animais, neste caso, foi possível verificar crescimento tumoral passados cinco meses da data de implante em todos os animais implantados.

A caracterização macroscópica e histologia do PDX desse paciente estão representadas na Figura 14.

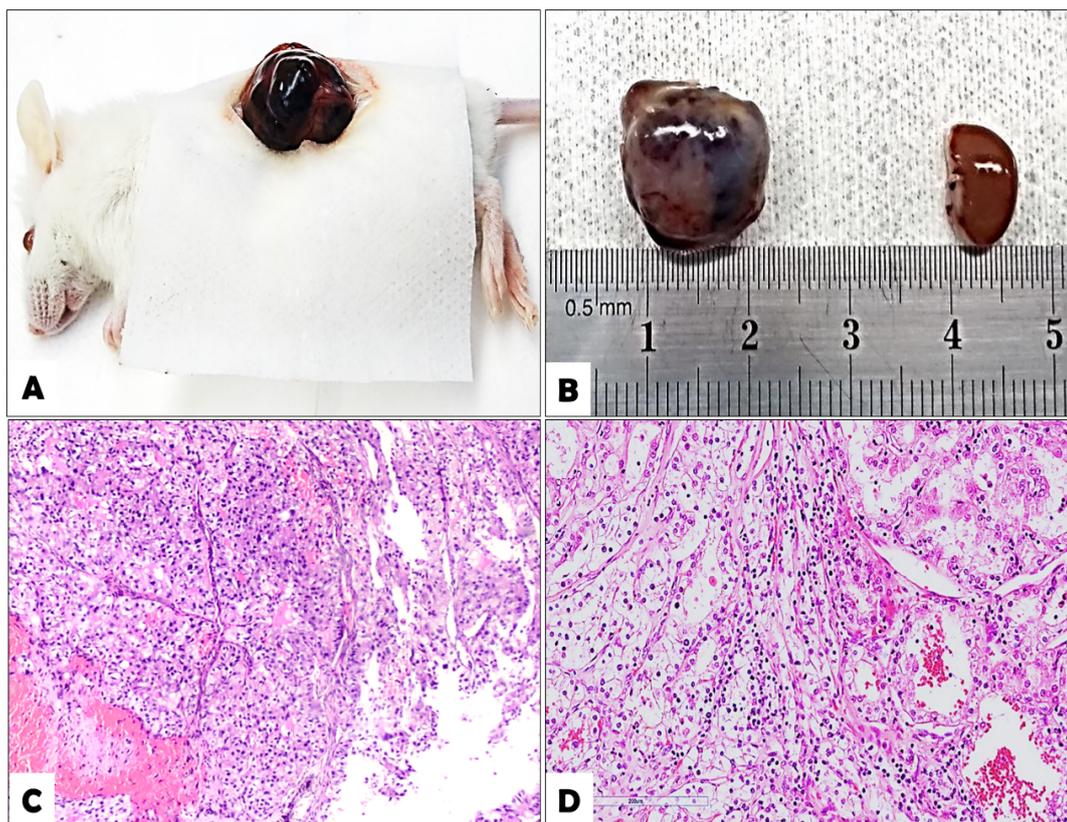


Figura 14 - Estabelecimento do modelo experimental (CCR Células Claras). **(A)** Evidência de crescimento tumoral verificada por lombotomia. **(B)** Comparação entre o rim afetado pelo CCR e o rim remanescente. **(C)** Análise histológica do tumor obtido do PDX. **(D)** Análise histológica do tumor do paciente. Aumento = 200 μm

Após a confirmação deste caso, foi realizada a comparação entre os tumores por imunohistoquímica. Por se tratar do mesmo subtipo histológico do 2º caso (XR 46), foram utilizados os mesmos marcadores, CK7 e Anidrase Carbônica (CAIX).

Conforme esperado, observa-se expressão negativa de CK7, associada a uma marcação positiva para anidrase carbônica IX, confirma o diagnóstico de carcinoma de células claras (Figura 15).

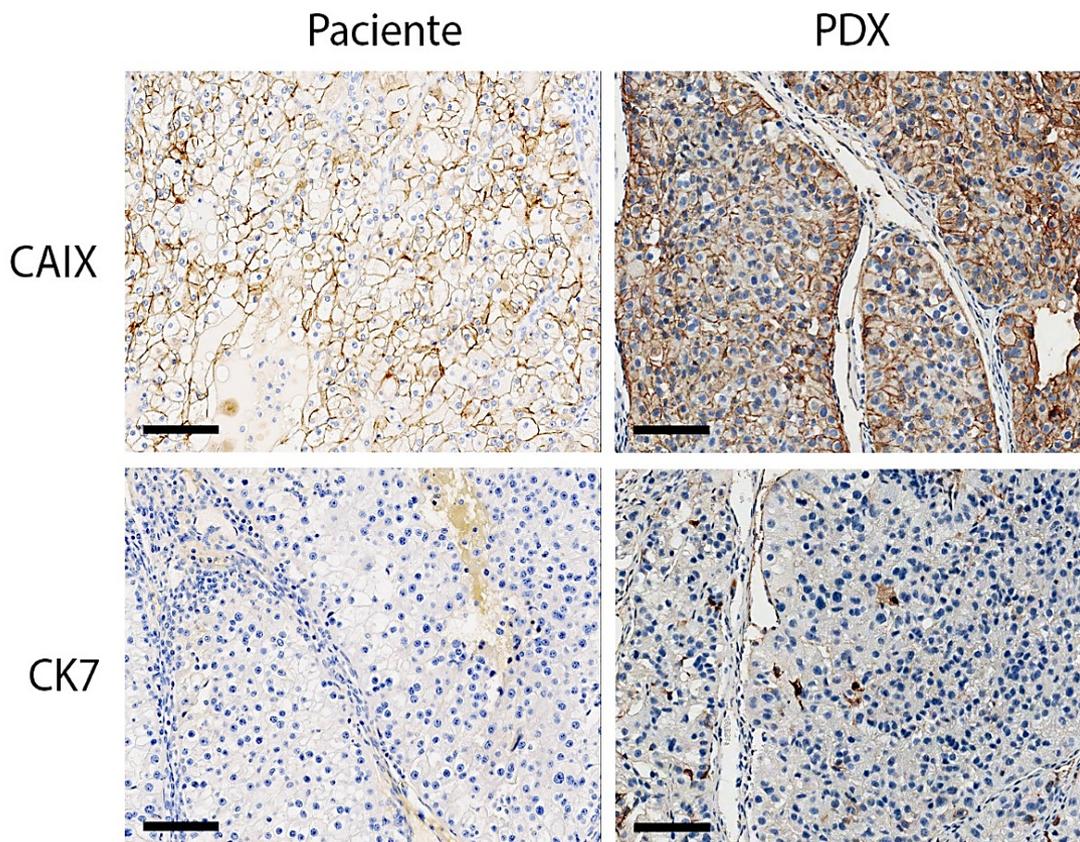


Figura 15 - Comparação por imunohistoquímica em xenoenxerto derivado de paciente com Carcinoma de Células Renais do tipo Células Claras. Barra de calibração = 100 μ m

Em seguida, foi realizado o sequenciamento da amostra de paciente e do PDX gerado. A partir desta análise foram encontradas quatro alterações (mutações) no tumor do paciente que estão presentes no PDX.

Tais alterações foram observadas nos seguintes genes: *BAP1*, *CDKN2A*, e duas alterações em *TP53*. Dentre as alterações, três foram encontradas também no PDX, com exceção de *CDKN2A*, conforme descrito abaixo (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise da caracterização do CCR do tipo Células Claras (XR 14) por sequenciamento. *Lof* = Lost-of-function

Gene	Efeito	Frequência no tumor primário	Frequência no tumor do PDX
BAP1	Missense	10%	99%
CDKN2A	Missense	3%	0%
TP53	Missense	11%	82%
TP53	Lof	7%	5%

Foi observada uma expressiva diferença entre as frequências com que as mutações em *BAP1* e *TP53* ocorreram no tumor primário do paciente e no tumor do PDX, de 10% de frequência para 99% em *BAP1* e de 11% para 82% em *TP53*.

Com o intuito de verificar se tais mudanças na frequência de mutações poderia estar refletida na expressão das proteínas, foi realizada imunohistoquímica utilizando p53. Os resultados obtidos com esta análise, encontram-se abaixo, na Figura 16.

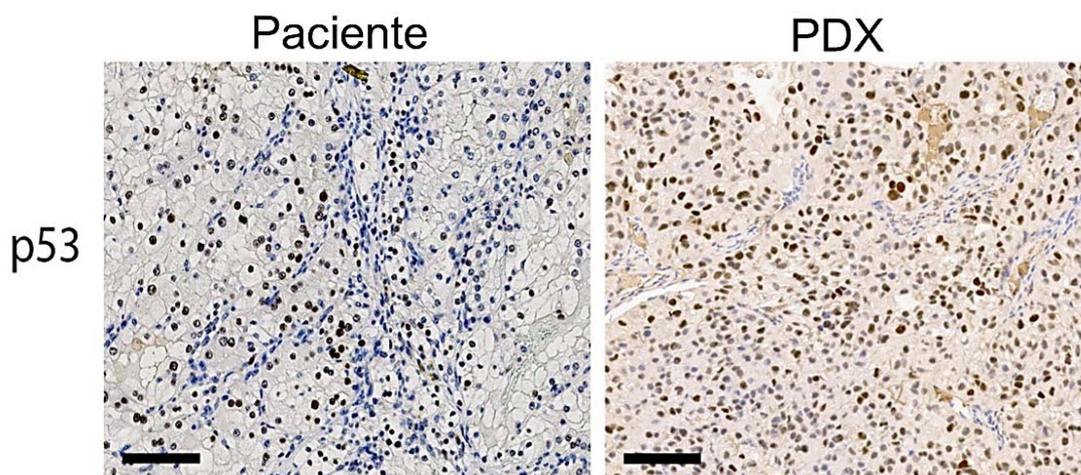


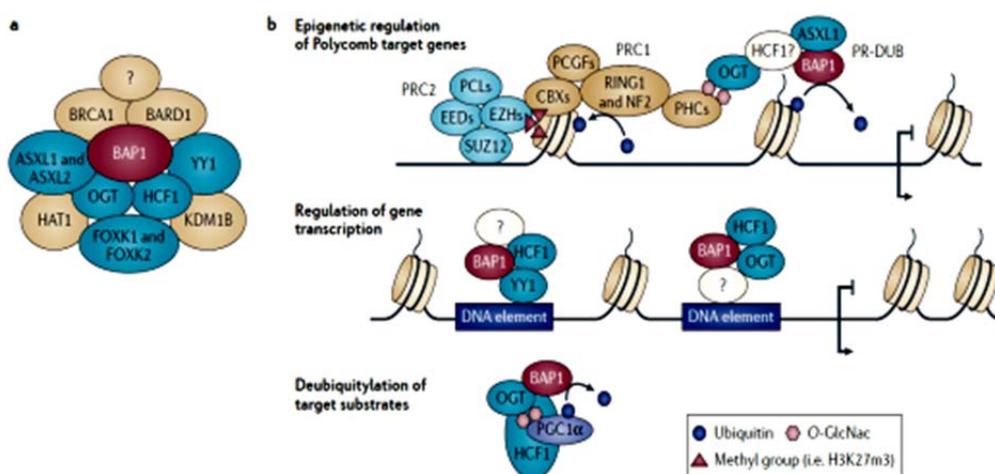
Figura 16 - Comparação por imunohistoquímica em xenoinxerto derivado de paciente com Carcinoma de Células Renais do tipo Células Claras, utilizando o anticorpo TP53. Barra de calibração = 100 μ m

Conforme esperado, observamos na marcação por imunohistoquímica uma diferença na expressão de p53, entre os tumores do paciente e PDX. Isso sugere que houve uma seleção clonal que permitiu o aumento da população das células que carregam as alterações em *TP53*.

Isso pode ter sido causado devido à alta heterogeneidade genética de tumores renais que faz com que diferentes regiões tumorais possam ter sido inoculadas nos camundongos, bem como uma evolução clonal que permitiu que os clones que carregam as alterações prosperassem em detrimento dos demais clones (GERLINGER et al. 2012).

Levando em conta a heterogeneidade dos tumores anteriormente mencionada, justifica-se o fato de não ter sido identificada a mutação em *CDKN2A* no PDX, uma vez que essa alteração encontrava-se em baixa frequência no paciente (3%).

O gene *BAP1* codifica uma deubiquitinase e participa na regulação da função proteínas envolvidas em diversos processos celulares como proliferação e a morte celular (Figura 17). Mutações no gene *BAP1* já foram encontradas em diversos tipos de câncer como melanoma, mesotelioma, e tumores de carcinoma de células renais de células claras (TESTA et al. 2011).



Fonte: Adaptado de CARBONE et al. (2013).

Figura 17 - Regulação de proteínas mediada por BAP1.

O gene *TP53* codifica o fator de transcrição p53, um supressor de tumoral que atua regulando negativamente os processos relacionados à divisão celular (CARBONE et al. 2013). Mutações somáticas em *TP53* são as alterações genéticas mais comuns encontradas em tumores, ocorrendo em cerca de metade de todos os cânceres.

A maioria das mutações *TP53* altera um único aminoácido na proteína p53, o que leva à produção de uma versão alterada desta proteína, incapaz de controlar a proliferação celular e de desencadear a apoptose em células

com DNA mutante ou danificado. Como resultado, o dano ao DNA pode se acumular nas células e se perpetuarem através da proliferação descontrolada, levando ao crescimento tumoral (HARAMI-PAPP et al. 2016).

Mais recentemente, constatamos evidência de crescimento tumoral em mais 7 (cinco) casos, sendo 6 casos do subtipo células claras e 1 caso do subtipo papilífero I. Os tumores já foram removidos e a análise histológica confirmou se tratar de tumores renais. A caracterização por imunohistoquímica e sequenciamento está sendo realizada, e por este motivo, tais resultados não contam nesta dissertação.

Até o momento, contamos com 46 casos implantados de forma ortotópica, e os animais estão sendo rotineiramente monitorados para observação de crescimento tumoral. Entre os casos encontram-se 5 casos de tumores benignos. O crescimento de PDX a partir destes tumores é algo bastante raro e impacta a taxa global de crescimento dos tumores. Em nossas condições experimentais, a taxa de sucesso com o implante ortotópico encontra-se em torno de 20% (10 casos confirmados para 46 implantados).

No entanto, é importante destacar que, os resultados obtidos até o momento, desde a caracterização do modelo, até a sua viabilidade relativamente, encontram-se em concordância com outros estudos recentes da literatura (PAVÍA-JIMÉNEZ et al. 2014; LANG et al. 2016).

Outro fator que contribui com este baixo rendimento é o fato da maioria dos casos operados serem de pacientes com tumores de estádios

iniciais T1 (32 casos) e T2 (3 casos). Entre tumores de estadiamento mais elevado, tivemos somente 6 casos de T3 e nenhum de T4.

Além disso, a graduação histológica é um fator de extrema importância, tanto em um contexto clínico, quanto experimental. Nesse sentido, quase 41% dos nossos casos são de baixo grau histológico: grau 1 (4 casos), e grau 2 (15 casos). Portanto, a taxa de crescimento global obtida por nós tende a crescer, pois de agora em diante será dada preferência para coleta de tumores com estadiamento patológico igual ou maior a T2.

4.6 CRESCIMENTO TUMORAL DE CARCINOMA DE CÉLULAS RENAI COM FORMAÇÃO DE TROMBO VENOSO

Mais recentemente, conseguimos obter resultados bastante promissores com o crescimento de um CCR associado à formação de trombo tumoral na veia renal e veia cava do animal. Clinicamente, a amostra tumoral para este caso foi obtida a partir de nefrectomia radical, tratava-se de uma paciente do sexo feminino, 64 anos, grau de ISUP 4, e estadiamento patológico pT3a, com um CCR do subtipo Células Claras. A análise histopatológica realizada após a cirurgia, revelou outras características clínico patológicas importantes como a presença de componente sarcomatoide (60%) e rabdoide (30%), presença de necrose (60%), infiltração da cápsula, gordura perirenal, artéria e veia renal, além de invasão sanguínea e linfática. Tais características são classicamente associadas com mal prognóstico e sobrevida baixa entre os pacientes.

Em nosso laboratório, observamos um rápido crescimento tumoral entre os animais que receberam fragmentos oriundos deste tumor (um mês após a data de implante), em todos os animais implantados. Durante a eutanásia e ressecção tumoral dos animais, foi observada a infiltração da veia renal e de um seguimento da veia cava inferior, culminando com oclusão vascular total em todos os animais.

É importante destacar que esse achado é interessante, pelo fato de o animal reproduzir a característica clínica presente no paciente, além de preservar a morfologia do tumor primário. Em um cenário experimental, esses modelos não reproduzem completamente todas as características observáveis nos tumores primários de seres humanos, por este motivo, este caso merece destaque.

Após a ressecção tumoral, foram enviados fragmentos do tumor obtido do rim do PDX e também do trombo venoso para análise histológica, e, durante a realização de uma nova passagem do tumor entre os animais, foi realizado também o implante de fragmentos de diferentes regiões do trombo venoso. A descrição deste caso encontra-se ilustrada na Figura 18.

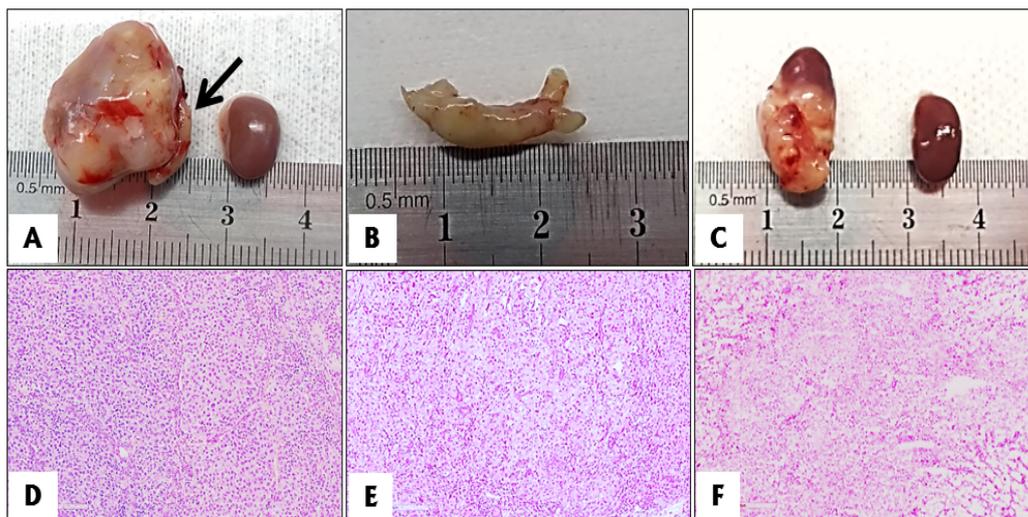


Figura 18 - Estabelecimento do modelo experimental (CCR Células Claras de alto grau) com a formação de trombo venoso. **(A)** Comparação entre o rim afetado pelo CCR e o rim remanescente (Seta indicando o trombo venoso). **(B)** Ressecção tumoral do trombo na veia cava inferior no animal. **(C)** Comparação entre o rim afetado pelo trombo venoso de CCR e o rim remanescente. **(D)** Análise histológica do tumor do paciente. **(E)** Análise histológica do tumor do PDX. **(F)** Análise histológica do tumor do trombo venoso PDX.

Surpreendentemente, todas as amostras enviadas para análise histológicas foram confirmadas como ccCCR de alto grau histológico. Em conjunto, nossos dados sugerem que em um cenário experimental, parâmetros clínicos como, doença localmente avançada, ou metastática, alto grau histológico, e alto estadiamento patológico são importantes, uma vez que torna mais viável o estabelecimento do modelo experimental *in vivo*.

Por se tratar de um caso mais recente, a caracterização por imunohistoquímica e o sequenciamento dos tumores ainda estão em andamento. Porém, é importante destacar que a capacidade de formação de trombos de veia cava é uma característica pouco entendida no desenvolvimento dos carcinomas de células renais (REESE et al. 2013).

Devido a preservação desta propriedade no modelo PDX, temos a oportunidade de criar um modelo *in vivo* que permita estudar os mecanismos que governam a formação de trombos neste tipo tumoral, investigar as vias envolvidas nesse fenômeno e, eventualmente, testar novas abordagens terapêuticas.

4.7 PADRONIZAÇÃO DA CRIOPRESERVAÇÃO DE PDX

Com o intuito de estabelecer um biorrepositório de PDX que mantenham as características primárias dos tumores, especialmente aquelas relacionadas à heterogeneidade tumoral é necessário que o método de criopreservação seja eficiente em manter a vitalidade celular.

Não existem métodos definitivos para criopreservação, muitos trabalhos na literatura utilizam metodologia semelhante a aquelas utilizadas pra preservação de células, com a utilização de criopreservantes como o dimetil-sulfóxido (DMSO) (KIMPLE et al. 2013). Porém, a qualidade da criopreservação não é suficientemente boa para todos os tipos tumorais. Diversas tentativas foram realizadas pelo grupo no intuito de garantir a vitalidade celular, porém com baixo sucesso (Tiago Góss dos Santos, comunicação oral).

Portanto, com o objetivo de padronizar as melhores condições de criopreservação dos fragmentos tumorais frescos provenientes do paciente e dos fragmentos tumorais de PDX, testamos duas metodologias já descritas na literatura, na tentativa de comparar e identificar qual seria a melhor

estratégia para criopreservar essas amostras, viabilizando o seu armazenamento e a utilização desses tecidos em experimentos e estudos futuros.

O congelamento lento com DMSO, é uma estratégia bastante utilizada para a criopreservação de linhagens celulares e culturas primárias. Tecnicamente, além da baixa concentração de DMSO (10%), o congelamento se dá a partir da redução gradual das taxas de resfriamento. No entanto, o fato de o processo de congelamento ocorrer gradualmente não evita eficientemente a formação de cristais de gelo nas células (KULESHOVA e LOPATA 2002).

Por outro lado, a vitrificação é um método alternativo bastante recente de criopreservação. Consiste basicamente em um processo de congelamento rápido, cuja principal vantagem é induzir uma solidificação em forma de vidro de células vivas, o que evita completamente a formação de cristais de gelo, que são capazes de danificar as células durante o congelamento e o descongelamento.

Alternativamente, a adição de sacarose na composição da solução de vitrificação contribui com a viabilidade da amostra, pois atua tamponando o estresse osmótico durante a adição e a remoção do crioprotetor intracelular e estabiliza a membrana celular, minimizando o dano celular (LUNARDI et al. 2012).

Para estes ensaios de criopreservação foram utilizados inicialmente dois tipos diferentes de tumor: Melanoma e Mesotelioma. A amostra de melanoma foi obtida da mesma maneira que os demais tumores renais.

Tratava-se de uma lesão renal com indicação cirúrgica, a amostra foi utilizada para inoculação e o exame anatopatológico realizado posteriormente revelou que a lesão na verdade era uma metástase de melanoma que acometeu o rim.

A amostra inoculada no animal desenvolveu um tumor em 27 dias corridos à data de implante, e foi mantida no projeto para os testes de criopreservação, devido a sua alta taxa de crescimento. A amostra de mesotelioma é oriunda do projeto “Plataforma de estudo de tumores raros e menos comuns baseados em xenoenxertos derivados de pacientes - CEUA 082/18” que também apresenta um alta taxa de crescimento em PDX.

Os ensaios iniciais foram desenhados com tumores que apresentam 100% de taxa de implantação para verificar qual seria a eventual perda de vitalidade pelos dois diferentes métodos de criopreservação.

Conforme esperado as amostras de melanoma e mesotelioma apresentaram 100% de viabilidade, quando congeladas com solução de vitrificação, descongeladas e reimplantadas nos animais. Sendo que, as amostras de melanoma mantiveram viabilidade independente da abordagem de congelação utilizada. Os dados obtidos com esses testes estão descritos a seguir, na Tabela 6.

Tabela 6 - Descrição da viabilidade das amostras armazenadas em solução de vitrificação e solução de congelação.

	MELANOMA	MESOTELIOMA	CCR
VITRIFICAÇÃO	100% de viabilidade n = 03	100% de viabilidade n = 03	0% de viabilidade n = 03
CONGELAÇÃO	100% de viabilidade n = 03	0% de viabilidade n = 03	0% de viabilidade n = 03

É importante destacar que o padrão de crescimento dos tumores que foram descongelados e reimplantados nos animais assemelha-se com o padrão observado no implante de amostra tumoral fresca.

Para as amostras de melanoma que estavam criopreservadas, observamos crescimento tumoral após 30 dias da data de implante na amostra armazenada em solução de congelação e também na amostra que estava armazenada em solução de vitrificação. Este resultado foi semelhante ao observado após o implante de tecido tumoral fresco.

Para as amostras de mesotelioma, foi observado um resultado bem semelhante entre o implante da amostra que estava armazenada em solução de vitrificação, e entre o implante de tecido tumoral fresco. Em ambas as situações, houve crescimento tumoral após 60 dias da data de implante.

Mais recentemente, foram descongelados e reimplantados fragmentos de CCR células claras do 2º caso (XR 46) Optamos por utilizar amostras deste caso, tomando como base, os parâmetros clínicos, justamente por ser sido o caso mais agressivo entre os que cresceram nos animais. No entanto, até o momento, não foi possível observar nenhum sinal de crescimento tumoral. Cabe destacar que tais animais ainda estão sob monitoramento, e que para todos os testes foram utilizados 3 animais por grupo.

4.8 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Até o momento, foram coletadas amostras de plasma de 34 pacientes, também estão armazenadas as amostras de plasma dos camundongos que apresentaram crescimento tumoral nos três casos. Esse material será utilizado para verificação e caracterização do conteúdo vesicular por espectrometria de massas e por citometria de fluxo.

Essas análises serão realizadas em colaboração com o do Dr. Kit Lam do Departamento de Bioquímica e Medicina Molecular e do Dr. Randy Carney do Departamento de Engenharia Biomédica, ambos pesquisadores da UC Davis, California, EUA.

É importante destacar que a etapa do trabalho relacionada ao estudo das vesículas extracelulares foi bastante comprometida devido ao longo período para obtenção dos PDX. O processo de padronização e estabelecimento do modelo experimental, do acompanhamento dos animais, bem como o tempo utilizado na caracterização dos casos. Somente nas etapas finais do trabalho foi possível obter os plasmas de PDX, cujo resultados preliminares estão apresentados a seguir. São achados preliminares e necessitam ser confirmados com outras análises. É importante mencionar também que o envolvimento da Dra Ethiene Castellucci Estevam (Pós-doutoranda) que ficou responsável pela caracterização das VEs.

Os plasmas dos camundongos que apresentaram crescimento tumoral foram separados e armazenados para posterior avaliação dos exossomos circulantes. Em dois dos três casos conseguimos coletar o plasma dos pacientes que deram origem aos PDX e também culturas primárias que tiveram seu conteúdo de exossomos isolados para avaliação por citometria de fluxo.

Os ensaios preliminares consistiram em realizar uma caracterização inicial por citometria de fluxo com marcadores típicos de VEs de tumores renais, como a proteína CD63 e CD105 (Endoglin) (GRANGE et al. 2011). A Figura 19 mostra a comparação entre VEs isoladas de plasma de paciente com CCR Papilífero Tipo II (1º Caso - XR 19), VEs isoladas do camundongo (PDX) com o tumor do paciente e VEs de meio condicionado de culturas primárias oriundas do PDX.

Nesse primeiro ensaio foi possível observar que a marcação de ambas moléculas está baixa no plasma humano e com uma positividade maior no plasma dos camundongos. Porém, houve uma marcação mais evidente das duas moléculas quando analisadas as VEs de culturas primárias. Para o próximo ensaio será utilizada uma quantidade maior de plasma para aumentar o número de VEs a ser analisado.

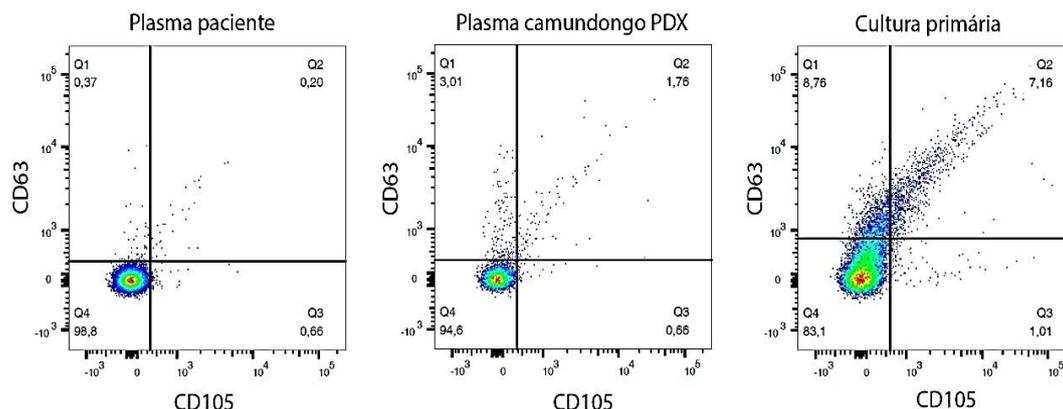


Figura 19 - Citometria de fluxo de VEs derivadas de CCR Papilífero Tipo II. O plasma do paciente e do camundongo e o meio condicionado das culturas primárias foram ultracentrifugados e marcados com anti-CD105 PE/Cy7 e anti-CD63 Alexa Fluor 647. As VEs foram analisados no citômetro BD Fortessa.

Também foi realizada a citometria com VEs isolados do paciente com CCR de células claras (2º Caso - XR 46) (Figura 20). Neste caso, não foi possível obter culturas primárias estáveis para isolamento de VEs.

A marcação para as duas proteínas no plasma humano foi maior do que no paciente com CCR Papilífero Tipo II, porém quando observada a marcação no plasma do camundongo PDX a marcação foi menor.

Também serão necessários novos experimentos para confirmar os fenótipos.

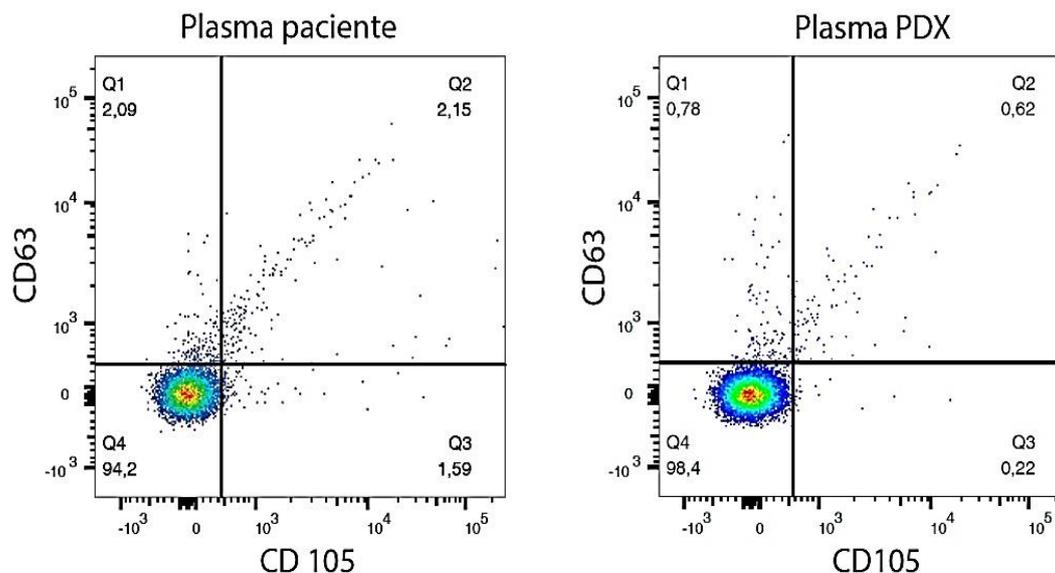


Figura 20 - Citometria de fluxo de VEs derivados de CCR de células claras. O plasma do paciente e do camundongo foram ultracentrifugados e marcados com anti-CD105 PE/Cy7 e anti-CD63 Alexa Fluor 647. As VEs foram analisados no citômetro BD Fortessa.

Também foi avaliado o plasma do camundongo PDX com carcinoma de células claras e uma cultura celular derivada (3º Caso - XR 14) (Figura 21). Neste caso não foi possível coletar o plasma do paciente.

Em relação ao padrão de marcação nas VEs derivadas do meio condicionado das culturas primárias houve uma marcação semelhante ao observado nos cultivos de CCR Papilífero Tipo II.

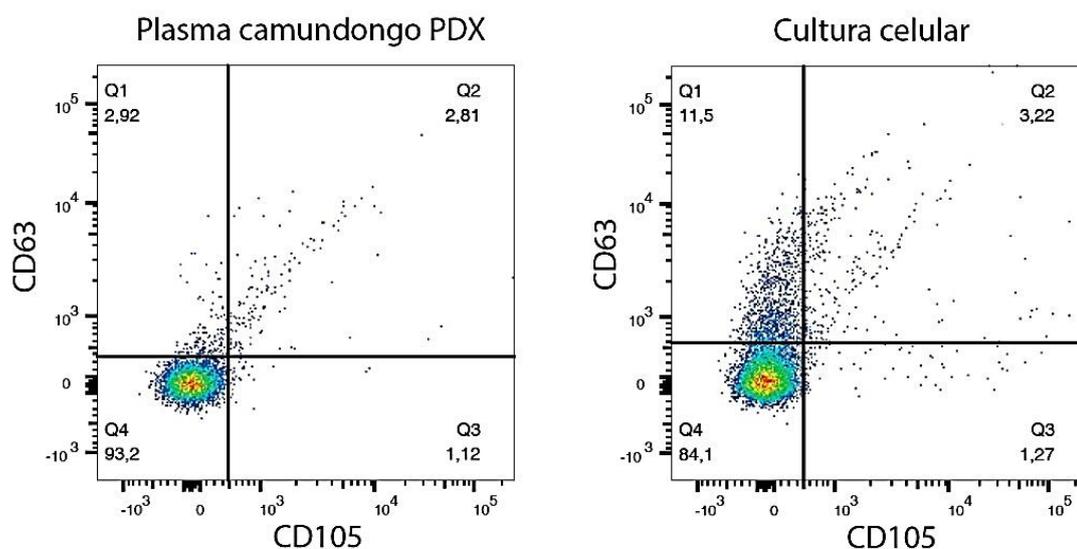


Figura 21 - Citometria de fluxo de VEs derivados de CCR de células claras. O plasma do camundongo e o meio condicionado das culturas primárias foram ultracentrifugados e marcados com anti-CD105 PE/Cy7 e anti-CD63 Alexa Fluor 647. As VEs foram analisados no citômetro BD Fortessa.

Finalmente, foram analisadas VEs de meio condicionado de duas culturas primárias de casos independentes de CCR. Um caso de CCR de células claras e outro de células claras associado a uma mutação germinativa no gene Mit (MAGERS, UDAGER, MEHRA 2015).

Conforme ilustrado na Figura 22, a marcação para CD63 e CD105 no CCR de células claras foi mais baixa do que o caso com mutação em Mit que, por sua vez, assemelha-se ao perfil de marcação do caso de CCR da Figura 21.

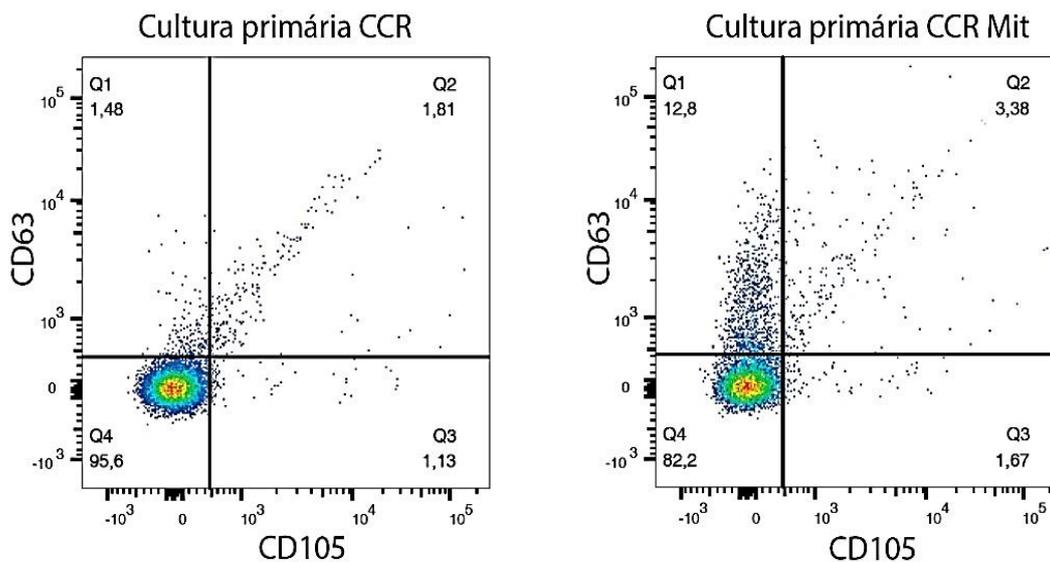


Figura 22 - Citometria de fluxo de VEs derivadas de CCR de células claras com mutação no gene Mit. O meio condicionado das culturas primárias foi ultracentrifugado e marcado com anti-CD105 PE/Cy7 e anti-CD63 Alexa Fluor 647. As VEs foram analisados no citômetro BD Fortessa.

Como perspectiva para estes ensaios serão realizados novas citometrias para os mesmos marcadores com um maior volume de plasma para possibilitar uma marcação mais efetiva. Temos a expectativa de realizar ensaios de *vesicle sorting* das VEs no equipamento Astrius.

5 CONCLUSÕES

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

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

Tumores de alto grau, com alto estadiamento patológico e/ou metastáticos possuem maiores chances de crescimento e viabilidade em modelos PDX, quando comparados com tumores menos agressivos.

A técnica de vitrificação aparentemente vem mostrando-se mais eficaz em preservar a vitalidade dos tumores, uma vez que após o reimplante, as amostras mantêm o padrão de crescimento observado durante o implante das amostras tumorais frescas. No entanto, não obtivemos êxito envolvendo o CCR.

Não foi possível realizar as metodologias de análise de VEs derivadas do plasma de animais com PDX de tumores renais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. **Cancer Metastasis Rev** 2013; 32:623-42.

Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Vermeulen PB, Soetekouw PM, van Engeland M, de Bruïne AP. VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. **J Pathol** 2010; 221:125-38.

Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, et al. A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ('xenopatients') identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. **Cancer Discov** 2011; 1:508-23.

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

Bindayi A, Hamilton ZA, McDonald ML, et al. Neoadjuvant therapy for localized and locally advanced renal cell carcinoma. **Urol Oncol** 2018; 36:31-7.

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

Byler TK, Bratslavsky G. Hereditary renal cell carcinoma: genetics, clinical features, and surgical considerations. **World J Urol** 2014; 32:623-30.

Cancer Genome Atlas Research Network, et al. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. **Nature** 2013; 499:43-9.

Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. **Lancet** 2016; 387:894-906.

Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and cancer. **Nat Rev Cancer** 2013; 13:153-59.

Chen K, Ahmed S, Adeyi O, Dick JE, Ghanekar A. Human solid tumor xenografts in immunodeficient mice are vulnerable to lymphomagenesis associated with Epstein-Barr virus. **PLoS One** 2012; 7:1-8.

Clemons J, Robinson K, Alanee S. First report of arid1a somatic mutation in a female patient with renal cell carcinoma. **Clin Genitourin Cancer** 2016; 14:229-31.

Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2014; 30:255-89.

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

Delahunt B, Sika-Paotonu D, Bethwaite PB, et al. Grading of clear cell renal cell carcinoma should be based on nucleolar prominence. **Am J Surg Pathol** 2011; 35:1134-39.

Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. **Am J Surg Pathol** 2013; 37:1490-504.

Delahunt B. Advances and controversies in grading and staging of renal cell carcinoma. **Mod Pathol** 2009; 22:24-36.

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

EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nat Rev Drug Discov** 2013; 12:347-57.

Ellis LM, Fidler IJ. Finding the tumor copycat: Therapy fails, patients don't. **Nat Med** 2010; 16:974-5.

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

Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extra-cellular messages. **Curr Opin Cell Biol** 2004; 16: 415-21.

Fichtner I, Slisow W, Gill J, et al. Anticancer drug response and expression of molecular markers in early-passage xenotransplanted colon carcinomas. **Eur J Cancer** 2004; 40:298-307.

Flippot R, Comperat E, Tannir NM, Maloaf GG. Papillary renal cell carcinoma: a family portrait. **Eur Urol** 2018; 73:79-80.

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 1982; 6:655-63.

Gai C, Pomatto MAC, Grange C, Deregibus MC, Camussi G. Extracellular vesicles in onco-nephrology. **Exp Mol Med** 2019; 51:1-8.

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

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **N Engl J Med** 2012; 366:883-92.

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

Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:55-64.

Grange C, Tapparo M, Collino F, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. **Cancer Res** 2011; 71:5346-56.

Grange C, Brossa A, Bussolati B. Extracellular Vesicles and Carried miRNAs in the Progression of Renal Cell Carcinoma. **Int J Mol Sci** 2019; 20:1-16.

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

Haas NB, Nathanson KL. Hereditary kidney cancer syndromes. **Adv. Chronic Kidney Dis** 2014; 21:81-90.

Hakimi AA, Tickoo SK, Jacobsen A, et al. TCEB1-mutated renal cell carcinoma: a distinct genomic and morphological subtype. **Mod Pathol** 2015; 28:845-53.

Harami-Papp H, Pongor LS, Munkácsy G, et al. TP53 mutation hits energy metabolism and increases glycolysis in breast cancer. **Oncotarget** 2016; 7:67183-95.

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

Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:451-52.

Hromada C, Mühleder S, Grillari J, Redl H, Holnthoner W. Endothelial Extracellular Vesicles-Promises and Challenges. **Front Physiol** 2017; 8:1-9.

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

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

Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG. pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. **Proc Natl Acad Sci** 1998; 95:11661-66.

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

Islas-Ohlmayer M, Padgett-Thomas A, Domiati-Saad R, et al. Experimental infection of NOD/SCID mice reconstituted with human CD34+ cells with Epstein-Barr virus. **J Virol** 2004; 78:13891-900.

Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, et al. Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2012; 18:5314-28.

Karashima T, Udaka K, Niimura M, et al. Therapy with transcutaneous administration of imiquimod combined with oral administration of sorafenib suppresses renal cell carcinoma growing in an orthotopic mouse model. **Oncol Lett** 2017; 14:1162-66.

Kawashima A, Young SW, Takahashi N, King BF, Atwell TD. Inherited renal carcinomas. **Abdom Radiol (NY)** 2016; 41:1066-78.

Kersten K, de Visser KE, van Miltenburg MH, Jonkers J. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. **EMBO Mol Med** 2017; 9:137-53.

Kimple RJ, Harari PM, Torres AD, et al. Development and characterization of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma tumorgrafts. **Clin Cancer Res** 2013; 19:855-64.

Koul H, Huh JS, Rove KO, et al. Molecular aspects of renal cell carcinoma: a review. **Am J Cancer Res** 2011; 1:240-54.

Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertil Steril** 2002; 78:449-54.

Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. **J Thromb Haemost** 2012; 10:437-46.

Lang H, Béraud C, Bethry A, et al. Establishment of a large panel of patient-derived preclinical models of human renal cell carcinoma. **Oncotarget** 2016; 7:59336-59.

Latif F, Tory K, Gnarr J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. **Science** 1993; 260:1317-20.

Li J, Sherman-Baust CA, Tsai-Turton M, Bristow RE, Roden RB, Morin PJ. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. **BMC Cancer** 2009; 9:244-55.

Li VD, Li KH, Li JT. TP53 mutations as potential prognostic markers for specific cancers: analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database. **J Cancer Res Clin Oncol** 2019; 145:1-12.

Linxweiler J, Körbel C, Müller A, et al. Experimental imaging in orthotopic renal cell carcinoma xenograft models: comparative evaluation of high-resolution 3D ultrasonography, in-vivo micro-CT and 9.4T MRI. **Sci Rep** 2017; 7:1-10.

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

Lüders C, Kristiansen G. Oncocytoma versus chromophobe renal cell carcinoma: Is there something in between?. **Pathologe** 2016; 37:153-58.

Lunardi OF, Araujo RV, Faustino RL, et al. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Small Ruminant Res** 2012; 107:121-30.

Lund C, Olsen CM, Tveit H, Tranulis MA. Characterization of the prion protein 3F4 epitope and its use as a molecular tag. **J Neurosci Methods** 2007; 165:183-90.

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

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <URL:<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.asp>> [2019 jan 3].

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

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

Novick AC. Kidney cancer: past, present, and future. **Urol Oncol** 2007; 25:188-95.

Oike T, Ogiwara H, Nakano T, Yokota J, Kohno T. Inactivating mutations in SWI/SNF chromatin remodeling genes in human cancer. **Jpn J Clin Oncol** 2013; 43:849-55.

Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. **Biochem Pharmacol** 2012; 83:1484-94.

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

Pavlovich CP, Schmidt LS. Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:381-93.

Ralli M, Altissimi G, Turchetta R, Rigante M. Metastatic renal cell carcinoma presenting as a paranasal sinus mass: the importance of differential diagnosis. **Case Rep Otolaryngol** 2017; 2017:1-8.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol** 2013; 200:373-83.

Rashed M, Bayraktar E, K Helal G, et al. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. **Int J Mol Sci** 2017; 18:1-25.

Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia** 2006; 20:1487-95.

Reese AC, Whitson JM, Meng MV. Natural history of untreated renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. **Urol Oncol** 2013; 31:1305-9.

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

Salido-Guadarrama I, Romero-Cordoba S, Peralta- Zaragoza O, Hidalgo-Miranda A, Rodríguez-Dorantes M. MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. **Oncotargets Ther** 2014; 7:1327-38.

Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. **Nat Genet** 2013; 45:860-67.

Schoenfeld A, Davidowitz EJ, Burk RD. A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. **Proc Natl Acad Sci** 1998; 95:8817-22.

Shorthouse AJ, Peckham MJ, Smyth JF, Steel GG. The therapeutic response of bronchial carcinoma xenografts: a direct patient-xenograft comparison. **Br J Cancer Suppl** 1980; 4:142-45.

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

Souza GR, Molina JR, Raphael RM, et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nat Nanotechnol** 2010; 5:291-96.

Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver classification of renal neoplasia. **Am J Surg Pathol** 2013; 37:1469-89.

Srinivasan R, Ricketts CJ, Sourbier C, Linehan WM. New strategies in renal cell carcinoma: targeting the genetic and metabolic basis of disease. **Clin Cancer Res** 2015; 21:10-7.

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

Tarade D, Ohh M. The HIF and other quandaries in VHL disease. **Oncogene** 2017; 37:139-47.

Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. **Nat Rev Clin Oncol** 2012; 9:338-50.

Testa JR, Cheung M, Pei J, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. **Nat Genet** 2011; 43:1022-25.

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Curr Protoc Cell Biol** 2006; 30:3-22.

Thompson M. Polybromo-1: the chromatin targeting subunit of the PBAF complex. **Biochimie** 2009; 91:309-19.

Thuma F, Zöller M. Outsmart tumor exosomes to steal the cancer initiating cell its niche. **Semin Cancer Biol** 2014; 28:39-50.

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

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

Warren AY, Harrison D. WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. **World J Urol** 2018; 36:1913-26.

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

White RE, Rämer PC, Naresh KN, et al. EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. **J Clin Invest** 2012; 122:1487-502.

Wilson BG, Roberts CW. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:481-92.

Wobker SE, Williamson SR. Modern pathologic diagnosis of renal oncocytoma. **J Kidney Cancer VHL** 2017; 4:1-12.

Young JR, Coy H, Douek M, et al. Type 1 papillary renal cell carcinoma: differentiation from Type 2 papillary RCC on multiphasic MDCT. **Abdom Radiol (NY)** 2017; 42:1911-18.

Zhang BY, Chevillat JC, Thompson RH, et al. Impact of rhabdoid differentiation on prognosis for patients with grade 4 renal cell carcinoma. **Eur Urol** 2015; 68:5-7.