



A.C. Camargo
Cancer Center

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA GERMINATIVA E SOMÁTICA DE
CÂNCER RENAL PEDIÁTRICO E ADULTO E AVALIAÇÃO DE
BIÓPSIA LÍQUIDA BASEADA EM DNA TUMORAL EM PLASMA
E URINA PARA ESTRATIFICAÇÃO DE PROGNÓSTICO**

ANA CAROLINA KEREKES MIGUEZ

Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Miguez, Ana Carolina Kerekes.

Caracterização genética germinativa e somática de câncer renal pediátrico e adulto e avaliação de biópsia líquida baseada em DNA tumoral em plasma e urina para estratificação de prognóstico . / Ana Carolina Kerekes Miguez. São Paulo, 2023.

197f.

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

Orientador: Dirce Maria Carraro.

1. Tumor de Wilms, 2. Carcinoma de células renais, 3. Estratificação de prognóstico

CDU 616

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título: Caracterização genética germinativa e somática de câncer renal pediátrico e adulto e avaliação de biópsia líquida baseada em DNA tumoral em plasma e urina para estratificação de prognóstico.

Aprovado em: 28/04/2023

Banca Examinadora

Orientador: Dra. Dirce Maria Carraro
Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dra. Franciele Hinterholz Knebel
Instituição: Instituto Sírio-Libanês de Ensino e Pesquisa

Membro da banca: Dra. Elisa Napolitano
Instituição: Grupo Fleury

Membro da banca: Dra. Ana Cristina Victorino Krepischi
Instituição: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP)

Membro da banca: Dra. Mariana Camargo Maschietto
Instituição: Hospital do Câncer Dr. Domingos A. Boldrini

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio de Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT), financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2014/50943-1 e 2013/23277-8, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo 465682/2014-6; da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) através da concessão de bolsa para realização deste projeto (processo nº 88882.366022/2019-01); e do PRONON - *“Medicina Personalizada aplicada para o monitoramento terapêutico do paciente oncológico”*, NUP: 25000.055121/2015-12, coordenado pela Dra. Dirce Maria Carraro.

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes.

Isaac Newton, 1676.

Dedico este trabalho aos pacientes com câncer, que enfrentam corajosamente os desafios impostos pela doença. Suas histórias de coragem, determinação e esperança são um verdadeiro exemplo de força humana.

A vocês, a minha eterna admiração, respeito e gratidão.

AGRADECIMENTOS

O período do meu doutorado teve alguns obstáculos, como uma pandemia e um tornozelo fraturado na reta final. Ao mesmo tempo, nesse mesmo período, fui integrada profissionalmente ao grupo de pesquisa ao qual chamo de “casa” e, principalmente, sinto que amadureci e aprendi muito – tanto profissionalmente quanto pessoalmente.

Agradeço, em primeiro lugar, à minha melhor amiga, minha maior inspiração e meu anjo da guarda - minha mãe, Jane Kerekes. Sem você, mãe, eu não teria condições de finalizar mais este capítulo da minha vida, e sei que posso contar com você para os próximos. Te amo! Incluo aqui meus bebês caninos, Pakko e Beatriz, cuja presença constante e amor incondicional foram fundamentais para manter meu equilíbrio durante os momentos de maior pressão e tensão.

Também agradeço imensamente às minhas "hermanas", minhas colegas e amigas Nathália de Angelis, Ana Araújo, Sara Oliveira, Débora Andrade e Julia Salles. Obrigada por todo o apoio, por todas as risadas, as conversas, os conselhos, pela companhia tão valiosa! Nossa amizade fortalece e, quando as coisas pareciam estar saindo do controle, vocês foram meu porto seguro.

Aos meus colegas e amigos Dra. Giovana Torrezan, Dra. Karina Santiago e Dr. Rafael Brianese - obrigada! Conheço vocês há anos, os vi crescer de pós-graduandos a profissionais de primeira linha, e sempre os tive como referência e exemplo! Agradeço de coração por tudo o que vocês me ensinaram, todas as vezes em que me ajudaram, me acolheram, pelo coleguismo e companhia. Todos do Grupo de Genômica Clínica e Funcional foram importantes em cada etapa da realização deste trabalho.

Também agradeço, pela valiosa contribuição neste trabalho, à minha colega Dra. Isabella Tanus e aos médicos envolvidos na realização deste projeto - Dra. Cecília Lima, Dra. Viviane Sonaglio, Dra. Isabella Werneck, Dra. Stephânia Bezerra, Dra. Maria Lúcia Pinho, Dr. Stênio Zequi, Dr. Walter Henriques da Costa, entre outros que de alguma forma participaram, de forma direta ou indireta.

Também não posso deixar de agradecer ao A.C.Camargo Cancer Center e às agências de fomento por toda a infraestrutura e tecnologia disponíveis para a pesquisa.

Agradeço também às enfermeiras de pesquisa e da pediatria por sua inestimável ajuda, especialmente as enfermeiras Glenda Lins e Cassia da Silva; às profissionais do Biobanco, Dra. Eloisa Olivieri, Ana Paula Silva e Louise de Carvalho, pelo cuidado e ajuda com as amostras de tumor, sangue e urina utilizadas neste estudo.

Deixo aqui um agradecimento especial à Dra. Dirce Maria Carraro, por todos os ensinamentos e inúmeras oportunidades proporcionadas a mim ao longo desses últimos 9 anos de iniciação científica, mestrado e doutorado. Sua carreira é uma inspiração para todos os seus alunos!

Por último, gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos aos pacientes com câncer renal que, através da doação de suas amostras e informações clínicas, tornaram possível este estudo. Sua generosidade num momento tão delicado é verdadeiramente admirável e valiosa. Obrigada!

RESUMO

Miguez, ACK. Caracterização genética germinativa e somática de câncer renal pediátrico e adulto e avaliação de biópsia líquida baseada em DNA tumoral em plasma e urina para estratificação de prognóstico [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

Introdução: Tumores renais estão entre os 10 tipos de câncer mais frequentes na população, com o tumor de Wilms (TW) sendo o mais frequente em crianças e o carcinoma renal de células claras (ccRCC) o mais comum em adultos. O monitoramento de resposta a tratamento por biópsia líquida baseada na análise do DNA tumoral (tDNA) em pacientes com câncer renal usando plasma e urina vem sendo recentemente explorado. No entanto, sua relação na estratificação de prognóstico continua sendo uma área ainda pouco estudada. Ainda, o fator hereditário destes tumores é um campo de pouca investigação. **Objetivos:** Investigar a predisposição genética em pacientes com tumores renais e explorar o potencial do tDNA em urina e plasma como ferramenta para estratificação de prognóstico. **Metodologia:** Pacientes com TW e ccRCC foram recrutados de forma prospectiva para estratificação de prognóstico por tDNA. As coletas de amostras de fluidos corpóreos (plasma e urina) foram realizadas de forma seriada, sendo 3 coletas para TW: *baseline*, antes do tratamento, ou seja, antes da quimioterapia neoadjuvante; *M1*, após quimioterapia neoadjuvante e *M2*, após cirurgia; e 5 coletas para ccRCC: *baseline*, antes do tratamento, ou seja, no dia da cirurgia; *M1*, de 6 a 8 semanas após cirurgia; *M2*, 6 meses após cirurgia; *M3*, 18 meses após cirurgia e *M4*, 30 meses após cirurgia. Os tumores foram avaliados utilizando dois painéis: um contendo 35 genes para TW (PAINEL TW-35) e outro contendo 28 genes para ccRCC (PAINEL CCR-28). Tumores de pacientes com TW e com ccRCC que foram negativos para variante somática foram submetidos a sequenciamento de exoma ou ao painel comercial CCP (Thermo Fisher, USA) contendo 409 genes de câncer, respectivamente. As variantes somáticas específicas de cada tumor foram rastreadas no cfDNA das amostras de plasma e urina de forma personalizada através de PCR multiplex desenvolvida pelo grupo denominado PATS (*personalized amplicon target sequencing*). Para os casos de TW, o cfDNA do sobrenadante e do sedimento de urina foram avaliados isoladamente; para os casos de ccRCC, foram avaliados juntos de forma equimolar. Para o teste genético, foi utilizado um painel customizado de 126 genes de predisposição ao câncer tanto na série prospectiva de pacientes recrutados para esse estudo como retrospectiva utilizando amostras de nosso Biobanco. A perda de heterozigose (LOH) foi avaliada nos casos de pacientes com variantes patogênicas ou de impacto clínico desconhecido e do quais havia DNA tumoral disponível. Sequenciamento de próxima geração (NGS) foi realizado na plataforma Ion GeneStudio S5 (Thermo Fisher, USA) para as análises somáticas e na plataforma NextSeq 500 (Illumina, USA) para as análises germinativas. **Resultados:** Um total de 10 casos de TW foram recrutados. Na análise somática dos TW foi possível detectar variantes específicas do tumor em 90% dos casos (9/10). *WTX*, *SIX1* e *CTNNB1* foram os genes mais mutados, sendo que cada um foi detectado em 2 casos (2/10,

20%). Dos 9 pacientes com variante somática específica do tumor, 100% apresentaram tDNA positivo na coleta realizada antes do tratamento (baseline) em ao menos um fluido corpóreo, sendo 6 no plasma (6/8, 75%) e 4 na urina (4/7, 57%), com frequência alélica (FA) média de 26,48% no plasma e, na urina, 18,92% no sedimento e 17,12% no sobrenadante. Em relação às coletas de monitoramento após quimioterapia neoadjuvante (M1), 71% (5/7) foram tDNA positivos, sendo 5 no plasma (5/7, 71%) com FA média de 42,13% e 4 na urina (4/6, 67%), todos no sobrenadante, com FA média de 3,50%. No monitoramento após cirurgia (M2) 44% (4/9) foram tDNA positivos, sendo 1 no plasma (1/9, 11%) com FA média de 2,60% e 3 na urina (3/9, 33%) com FA média de 3,19% no sedimento e 5,16% no sobrenadante. Nenhuma associação com prognóstico pode ser estabelecida pelo fato da casuística ser pequena. Para os casos de ccRCC, 46 pacientes foram recrutados para o estudo. Foram identificadas variantes somáticas no DNA de tumor em 78,3% (36/46), sendo 35 pelo PAINEL CCR-28 (97%) confeccionado e analisado em um estudo anterior do grupo e a amostra negativa pelo PAINEL CCP no estudo atual. *VHL* foi o gene mais mutado, alterado em 67% amostras (24/36), seguido por *PBRM1* em 36% (13/36). A análise do plasma e urina baseline, coletados antes da cirurgia, foi realizada no estudo anterior do grupo, sendo tDNA positivo detectado em 4 amostras de plasma e 4 de urina (4/32, 12,5% cada) com FA média de 1,83% e 2,66%, respectivamente. Para o monitoramento M1, o tDNA foi positivo no plasma em 10% (2/20) com FA média de 2,60%, e negativo nas 16 amostras de urina. No monitoramento M2, tanto o plasma quanto a urina foram negativos. No monitoramento M3, o tDNA foi positivo no plasma em 11,8% (2/17) e na urina em 7,1% (1/14), com FA média de 1,66% e 1,35%, respectivamente. No monitoramento M4, todas as amostras foram negativas. Foram detectadas associações entre tDNA positivo no plasma baseline (antes da cirurgia) com progressão da doença ($p=.015$), estadiamento tumoral $\geq T3$ ($p=.002$) e com menor sobrevida livre de progressão ($p=.004$). A análise germinativa em pacientes com TW resultou em uma taxa de detecção de variantes patogênicas (VP) em 10,2% deles (6/59) nos genes *BRCA1*, *CHEK2*, *WT1* (2 casos), *ERBB2* e *SDHA*. LOH foi avaliada em 7 casos e detectada somente em um caso com *WT1*. Em pacientes com CCR, 6,9% (5/72) foram portadores de VP nos genes *MET*, *CASR*, *MITF* e *MUTYH* (2 casos). Desses, 8 foram avaliados para LOH e nenhum foi positivo. **Conclusões:** Em pacientes com TW, para avaliação de tDNA com prognóstico, é necessário ampliar o número de casos. Em pacientes com ccRCC, a presença de tDNA no plasma coletado antes da cirurgia tem potencial de ser um biomarcador de prognóstico. A análise de genes de risco reforçou o papel de *WT1* na predisposição ao TW.

Palavras-chave:

1. Tumor de Wilms. 2. Carcinoma de células renais. 3. Biópsia líquida. 4. Estratificação de prognóstico.

ABSTRACT

Miguez, ACK. Germline and somatic genetic characterization of pediatric and adult kidney cancer and liquid biopsy evaluation based on tumor DNA in plasma and urine for prognosis stratification [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

Introduction: Kidney tumors are among the 10 most common types of cancer in the population, with Wilms tumor (WT) being the most frequent in children and clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) the most common in adults. The monitoring of treatment response by liquid biopsy based on the analysis of tumor DNA (tDNA) in patients with renal cancer using plasma and urine has been recently explored. However, its relationship in prognosis stratification remains an area that has yet to be studied. Still, the hereditary factor of these tumors is a field of little investigation. **Objectives:** To investigate genetic predisposition in patients with renal tumors and to explore the potential of tDNA in urine and plasma as a tool for prognosis stratification. **Methodology:** Patients with WT and ccRCC were prospectively recruited for prognosis stratification by tDNA. The collection of samples of body fluids (plasma and urine) were performed serially, with 3 collections for WT: baseline, before treatment, that is, before neoadjuvant chemotherapy; M1, after neoadjuvant chemotherapy and M2, after surgery; and 5 collections for ccRCC: baseline, before treatment, that is, on the day of surgery; M1, 6 to 8 weeks after surgery; M2, 6 months after surgery; M3, 18 months after surgery and M4, 30 months after surgery. Tumors were evaluated using two panels: one containing 35 genes for WT (PANEL WT-35) and another containing 28 genes for ccRCC (PANEL CCR-28). Tumors from patients with WT and with ccRCC that were negative for somatic variant in genes of the panel underwent exome sequencing or the commercial CCP panel (Thermo Fisher, USA) containing 409 cancer genes, respectively. The specific somatic variants of each tumor were tracked in the cfDNA of the plasma and urine samples in a personalized way through multiplex PCR developed by the group called PATS (personalized amplicon target sequencing). For the cases of WT, the cfDNA of the supernatant and the urine sediment were evaluated separately; for cases of ccRCC, they were evaluated together in an equimolar manner. For genetic testing, a customized panel of 126 cancer predisposition genes was used both in the prospective series of patients recruited for this study and in the retrospective series using samples from our Biobank. Loss of heterozygosity (LOH) was evaluated in cases of patients with pathogenic variants or those of unknown clinical impact and for whom tumor DNA was available. Next generation sequencing (NGS) was performed on the Ion GeneStudio S5 platform (ThermoFisher, USA) for somatic analyzes and on the NextSeq 500 platform (Illumina, USA) for germline analyzes. **Results:** A total of 10 WT cases were recruited. In the somatic analysis of WT it was possible to detect tumor-specific variants in 90% of the cases (9/10). *WTX*, *SIX1* and *CTNNB1* were the most mutated genes, each being detected in 2 cases (2/10, 20%). Of the 9 patients with tumor-specific somatic variant, 100% had positive tDNA in the collection performed before treatment (baseline) in at least one body fluid, being 6 in plasma (6/8, 75%)

and 4 in urine (4/ 7.57%), with an mean allele frequency (AF) of 26.48% in plasma and, in urine, 18.92% in sediment and 17.12% in supernatant. Regarding monitoring collections after neoadjuvant chemotherapy (M1), 71% (5/7) were tDNA positive, 5 in plasma (5/7, 71%) with mean AF of 42.13% and 4 in urine (4 /6, 67%), all in the supernatant, with mean AF of 3.50%. In monitoring after surgery (M2), 44% (4/9) were tDNA positive, 1 in plasma (1/9, 11%) with mean AF of 2.60% and 3 in urine (3/9, 33%) with mean AF of 3.19% in the pellet and 5.16% in the supernatant. No association with prognosis could be established due to the fact that the casuistry was small. For ccRCC cases, 46 patients were recruited for the study. Somatic variants were identified in the tumor DNA in 78.3% (36/46), 35 of them by PANEL CCR-28 (97%) prepared and analyzed in a previous study of the group and the sample negative by PANEL CCP in the current study. *VHL* was the most mutated gene, altered in 67% of samples (24/36), followed by *PBRM1* in 36% (13/36). Baseline plasma and urine analysis, collected before surgery, was performed in the previous study of the group, with positive tDNA being detected in 4 plasma and 4 urine samples (4/32, 12.5% each) with mean AF of 1.83% and 2.66%, respectively. For M1 monitoring, tDNA was positive in plasma in 10% (2/20) with mean AF of 2.60%, and negative in all 16 urine samples. On M2 monitoring, both plasma and urine were negative. At M3 monitoring, tDNA was positive in plasma in 11.8% (2/17) and in urine in 7.1% (1/14), with mean AF of 1.66% and 1.35%, respectively. In monitoring M4, all samples were negative. Associations were detected between positive tDNA in plasma at baseline (before surgery) with disease progression ($p=.015$), tumor staging $\geq T3$ ($p=.002$) and with shorter progression-free survival ($p=.004$). Germline analysis in patients with WT resulted in a detection rate of pathogenic variants (PV) in 10.2% of them (6/59) in *BRCA1*, *CHEK2*, *WT1* (2 cases), *ERBB2* and *SDHA* genes. LOH was evaluated in 7 cases and detected only in one case with *WT1*. In patients with CCR, 6.9% (5/72) carried PV in the *MET*, *CASR*, *MITF* and *MUTYH* genes (2 cases). Of these, 8 were evaluated for LOH and none were positive. **Conclusions:** In patients with WT, in order to evaluate tDNA with prognosis, it is necessary to increase the number of cases. In patients with ccRCC, the presence of tDNA in plasma collected before surgery has the potential to be a prognosis biomarker. Risk gene analysis reinforced the role of *WT1* in the predisposition to WT.

Keywords:

1. Wilms tumor. 2. Renal cell carcinoma. 3. Liquid biopsy. 4. Prognosis stratification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Os três diferentes componentes histológicos do TW.	9
Figura 2 - Principais genes relacionados aos diferentes tumores renais da classe CCR de origem hereditária.	21
Figura 3 - As diferentes origens do DNA encontrado em plasma e urina de pacientes com tumor renal e sua presença nos componentes de urina e sangue.	25
Figura 4 - Delineamento experimental.	29
Figura 5 - Esquematização das coletas de amostras de sangue e urina de pacientes com TW e ccRCC.	32
Figura 6 - Genes mais mutados em TW, segundo levantamento bibliográfico.	53
Figura 7 - Progressão de doença e detecção de DNA tumoral (tDNA) em amostras de plasma e componentes da urina de pacientes com TW.	61
Figura 8 - Frequências alélicas (FA) das variantes somáticas identificadas em amostras de plasma e urina de pacientes com TW.	62
Figura 9 - Dados clínicos e anatomopatológicos e detecção de DNA tumoral (tDNA) em amostras de plasma e urina de pacientes com ccRCC.	71
Figura 10 - Frequências alélicas (FA) das variantes somáticas identificadas em amostras de plasma e urina de pacientes com ccRCC.	72
Figura 11 - Curvas de sobrevida global e livre de progressão para os casos de ccRCC.	74
Figura 12 - Variantes germinativas potencialmente patogênicas em casos de TW.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios para estadiamento do tumor de Wilms - protocolo SIOP (2001).	11
Tabela 2 - Critérios histológicos para subtipagem do TW - protocolo SIOP (2001).	12
Tabela 3 - Critérios para classificação de risco do TW - protocolo SIOP (2001).	12
Tabela 4 - Critérios para classificação do CCR de acordo com o sistema TNM.	18
Tabela 5 - Critérios para estadiamento do CCR de acordo com o sistema TNM.	18
Tabela 6 - Bibliografia utilizada para seleção de genes e mapeamento de mutações.	49
Tabela 7 - Variantes somáticas identificadas nos principais genes dos trabalhos avaliados. .	51
Tabela 8 - Funções dos genes incluídos no novo PAINEL TW-35.	54
Tabela 9 - Variantes somáticas identificadas em amostras de TW através do sequenciamento dos genes do painel anterior (Torrezan et al. 2014) e do novo PAINEL TW-35.	55
Tabela 10 - Informações gerais sobre os pacientes com TW recrutados para a análise de biópsia líquida.	56
Tabela 11 - Variantes somáticas identificadas no tumor de Wilms através de sequenciamento do PAINEL TW-35 ou de WES.	58
Tabela 12 - Variantes somáticas detectadas em amostras de plasma e componentes da urina de pacientes com TW.	60
Tabela 13 - Informações gerais sobre os 36 pacientes com ccRCC selecionados para a análise de biópsia líquida.	63
Tabela 14 - Variantes somáticas identificadas nos ccRCC através de sequenciamento do painel de genes customizado ou do PAINEL CCP.	65
Tabela 15 - Detecção de variantes somáticas em amostras de plasma e urina de pacientes com ccRCC.	68

Tabela 16 - Informações gerais sobre os casos de TW recrutados para a análise de genes de risco.....	75
Tabela 17 - Priorização de variantes germinativas em 52 amostras de TW.....	77
Tabela 18 - Informações gerais sobre os casos de tumores renais do tipo CCR recrutados para a análise de genes de risco.....	79
Tabela 19 - Priorização de variantes germinativas em 72 amostras de CCR.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

2SC	2-succinocisteína
AD	<i>Allele Depth</i>
AIQ	Alterações induzidas por quimioterapia
CCP	<i>Comprehensive cancer panel</i>
CCR	Carcinoma de células renais
ccRCC	Carcinoma renal de células claras (do inglês <i>clear cell renal cell carcinoma</i>)
celDNA	DNA celular livre circulante (do inglês <i>cellular DNA</i>)
cfDNA	DNA livre de células (do inglês <i>circulating free DNA</i>)
CHEK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
CMA	<i>Chromosome Microarray Analysis</i>
CNA	Alteração no número de cópias (do inglês <i>copy number alteration</i>)
CPDN	Nefroma cístico parcialmente diferenciado (do inglês <i>cystic partially differentiated neuroblastoma</i>)
ddPCR	<i>Digital droplet polymerase chain reaction</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERCC2	<i>ERCC Excision Repair 2</i>
F	Feminino
FA	Frequência alélica da variante
FFPE	Fixado em formalina e embebido em parafina (do inglês <i>formalin fixed, paraffin embedded</i>)
FH	<i>Fumarate Hydratase</i>
FHD	Deficiência da fumarato hidratase (do inglês <i>fumarate hydratase deficiency</i>)

FL	<i>Full lenght</i>
GPC	Genes de predisposição ao câncer
H	<i>Hotspot</i>
HIF	fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (do inglês <i>hypoxia-inducible factors</i>)
HLRCC	Leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais (do inglês <i>hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer</i>)
ID	Identificação do paciente
INDEL	Inserção/deleção (do inglês <i>insertion/deletion</i>)
LOH	Perda de heterozigose (do inglês <i>loss of heterozygosity</i>)
M	Masculino
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NA	Não avaliado
NC	Não coletado
ND	Não detectado
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos (do inglês <i>nucleotide excision repair</i>)
NGS	Sequenciamento de próxima geração (do inglês <i>next-generation sequencing</i>)
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas (do inglês <i>non-small cell lung cancer</i>)
P	<i>Partial</i>
PATS	<i>Personalized amplicon target sequencing</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)

POP	Procedimento operacional padrão
SNV	<i>Single nucleotide variant</i>
sWGS	Sequenciamento raso completo do genoma (do inglês <i>shallow whole genome sequencing</i>)
tDNA	DNA tumoral (do inglês <i>tumor DNA</i>)
TW	Tumor de Wilms
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VP	Variante patogênica
VPP	Variante provavelmente patogênica
VUS	Variante de significado incerto (do inglês <i>variant of uncertain significance</i>)
VUSp	Variante de significado incerto priorizada (do inglês <i>priorized variant of uncertain significance</i>)
WES	Sequenciamento completo de exoma (do inglês <i>whole exome sequencing</i>)
WGS	Sequenciamento de genoma completo (do inglês <i>whole genome sequencing</i>)
XP	Xeroderma pigmentoso
XPD	<i>Xeroderma Pigmentosum Group D</i>

LISTA DE SIGLAS

ABRaOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACC	A.C.Camargo Cancer Center
ACMG	American College of Medical Genetics
AJCC	American Joint Committee for Cancer
Capes	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEP	Conselho de ética em pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COG	Children's Oncology Group
COSMIC	Catalog of Somatic Mutations in Cancer
dbSNP	The Database of Short Genetic Variation
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GATK	Genome Analysis Toolkit
IGV	Integrative Genomics Viewer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCT	Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia
ISUP	International Society of Urological Pathology
NWTSG	National Wilms Tumor Study Group
OMS	Organização Mundial da Saúde
PRONON	Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica
RD	Rede D'Or
RTSG	Renal Tumor Study Group

SIOP Société Internationale d’Oncologie Pédiatrique

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.2 Tumor de Wilms	8
1.2.1 Classificação do TW	11
1.2.2 Caracterização genética do TW	13
1.3 Carcinoma de células renais.....	15
1.3.1 Classificação do CCR.....	17
1.3.2 Caracterização genética do ccRCC	19
1.4 Biopsia Líquida na detecção de DNA tumoral.....	22
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. METODOLOGIA	27
3.1 Delineamento experimental	27
3.2 Casuística.....	30
3.2.1 Avaliação da presença de tDNA em plasma e urina	30
3.2.2 Avaliação de genes de predisposição ao TW e ao CCR.....	31
3.3 Coleta de amostras biológicas.....	31
3.4 Processamento e extração do DNA das amostras biológicas coletadas no A.C. Camargo Cancer Center.....	33
3.4.1 Fragmento de tecido tumoral.....	33
3.4.2 Sangue	35
3.4.3 Urina	36
3.5 Processamento e extração do DNA das amostras de tumor, plasma, urina e saliva de pacientes com TW coletadas em outras instituições.....	37

3.6	Elaboração do painel de genes frequentemente mutados em TW	38
3.7	Sequenciamento paralelo para identificação de variantes somáticas em DNA de tecido tumoral	39
3.7.1	Tumor de Wilms – PAINEL TW-35 e sequenciamento de exoma (WES).....	39
3.7.2	Carcinoma renal de células claras – PAINEL CCR-28 e CCP	40
3.7.3	Chamada de variantes somáticas em DNA de tecido tumoral	40
3.8	Detecção de tDNA em amostras plasma e urina	41
3.9	Rastreamento de variantes germinativas patogênicas utilizando painéis multigênicos de genes de predisposição ao câncer.....	43
3.9.1	Interpretação e classificação das variantes germinativas.....	44
3.10	Validação de variantes somáticas e de variantes germinativas.....	45
3.11	Análise cromossômica por microarranjo genômico (CMA)	46
3.12	Análise estatística	46
3.13	Aprovação do projeto	49
4.	RESULTADOS	49
4.1	Elaboração do painel de genes frequentemente mutados em TW	49
4.2	Detecção de DNA tumoral em amostras de plasma e urina de pacientes com tumor de Wilms	56
4.2.1	Casuística de TW	56
4.2.2	Identificação de variante somática no TW	57
4.2.3	Detecção de tDNA em plasma e urina dos casos com TW	59
4.3	Detecção de DNA tumoral em amostras de plasma e urina de pacientes com ccRCC	63
4.3.1	Casuística de ccRCC	63
4.3.2	Identificação de variante somática no ccRCC.....	64
4.3.3	Detecção de tDNA em plasma e urina dos casos com ccRCC.....	66
4.4	Teste genético multigênico em pacientes com TW e com CCR	74

4.4.1 Teste genético em pacientes com TW	74
4.4.2 Teste genético em pacientes com CCR	78
5. DISCUSSÃO.....	83
6. CONCLUSÕES	96
7. REFERÊNCIAS	98
Apêndice 1. Perfil dos fragmentos de DNA livre presentes nas amostras de plasma.....	108
Apêndice 2. Genes contidos nos painéis TW, CCR, CCP e 126 genes.....	112
Apêndice 3. Variantes somáticas em 978 amostras de TW, de acordo com levantamento bibliográfico, e regiões cobertas pelo painel de genes.....	114
Apêndice 4. Ruído de sequenciamento para as variantes somáticas avaliadas nas coortes de biópsia líquida usando DNA de leucócito controle (Controles Negativos).....	118
Apêndice 5. Dados clínicos e patológicos dos casos de TW.....	121
Apêndice 6. Análise do DNA do tecido tumoral do TW da paciente TW2 através de aCGH para avaliação de perda de 11p15 ou ganho de 1q.	122
Apêndice 7. Frequência alélica (FA) individual de tDNA em amostras de plasma e urina avaliadas em duplicata.....	123
Apêndice 8. Análise estatística da associação entre presença de tDNA em plasma e urina de pacientes com TW, variáveis patológicas e desfecho clínico.....	124
Apêndice 9. Curvas de sobrevida dos casos de TW	133
Apêndice 10. Dados clínicos e patológicos dos casos de ccRCC.....	135
Apêndice 11. Análise estatística da associação entre presença de tDNA em plasma e urina de pacientes com ccRCC, variáveis patológicas e desfecho clínico.....	138
Apêndice 12. Curvas de sobrevida dos casos de ccRCC.....	146
Anexo 1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP.....	148
Anexo 2. Parecer de aprovação de mudança de título do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa-CEP.....	149
Anexo 3. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do projeto 2559/18	163

Anexo 4. Termo de assentimento (TA) do projeto 2559/18	169
Anexo 5. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do projeto 2397/17.	170
Anexo 6. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do PRONON (Biópsia Líquida), processo nº88882.366022/2019-01.	175

1. INTRODUÇÃO

No contexto do câncer, a elucidação das características genéticas tanto dos tumores como dos pacientes, bem como o estabelecimento de métodos efetivos de monitoramento da doença e de estratificação de prognóstico são de grande importância para avançar no conhecimento desta doença e no manejo dos pacientes.

Na população adulta dos Estados Unidos, o câncer renal é o sexto câncer mais frequente em homens e o 9º mais frequente em mulheres (Siegel et al. 2022). No Brasil, os dados de incidência de câncer renal não são relatados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), mas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2020 o câncer renal foi o 13º mais frequente no Brasil, com quase 12 mil novos casos diagnosticados e 4700 mortes (World Health Organisation - OMS, 2021). O tumor renal mais comum na população adulta é o carcinoma de células renais (CCR), especialmente o subtipo carcinoma renal de células claras (ccRCC) que representa cerca de 75% dos casos (Petejova e Martinek 2016). Ele é mais comum em homens, com uma proporção de 2 para 1 em relação às mulheres e tem maior incidência em indivíduos com idade entre 60 e 70 anos, sendo raro em pessoas com menos de 45 anos (Motzer et al. 2017).

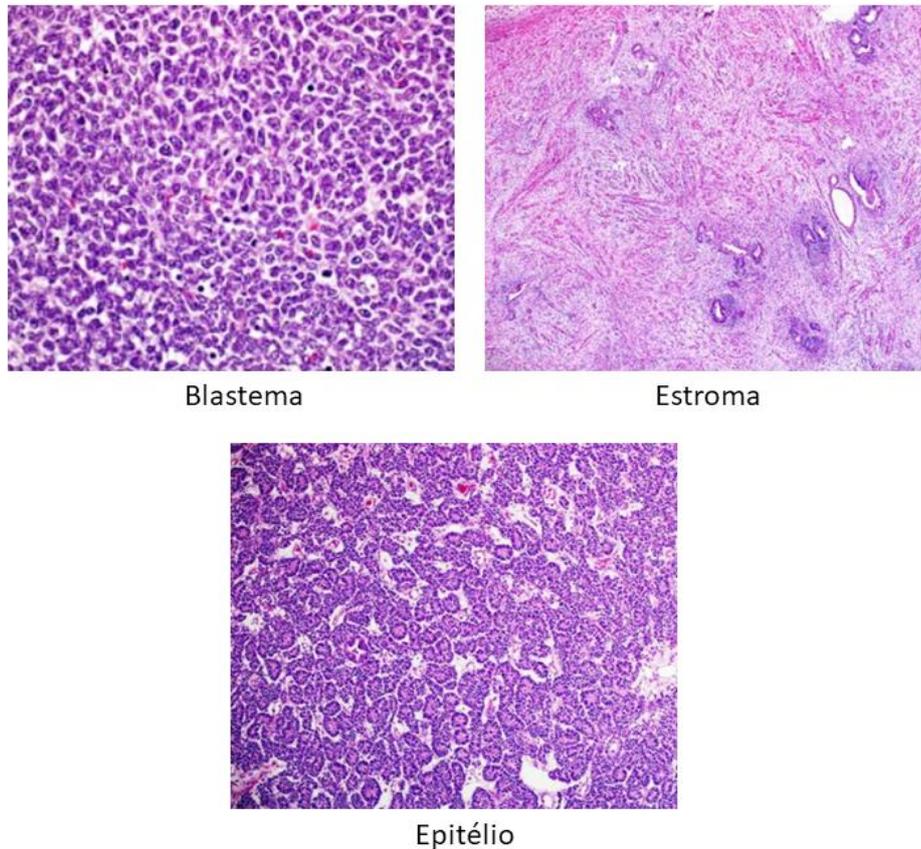
Na população pediátrica, os tumores renais representam 5% dos casos de câncer mundialmente (Nakata et al. 2020). No Brasil, o câncer renal em crianças e adolescentes é o 3º mais comum (World Health Organisation - OMS, 2021). Entre os tumores renais nessa faixa etária, o tumor de Wilms (TW) é o mais frequente, sendo diagnosticado em 95% dos casos (Breslow et al. 1993; Pastore et al. 2006). O pico de incidência do TW ocorre entre 2 e 5 anos de idade, sendo o segundo tipo mais comum de câncer intra-abdominal na infância e a quinta forma mais frequente de malignidade pediátrica geral (Breslow et al. 1993; Pastore et al. 2006),

resultando em uma incidência de 1 criança afetada a cada 10.000 crianças nascidas vivas (Birch e Breslow 1995).

1.2 Tumor de Wilms

O tumor de Wilms (TW) é uma neoplasia embrionária que tem origem a partir de erros no processo de diferenciação celular em células primitivas durante estágios precoces da nefrogênese (Beckwith 1982; Hohenstein et al. 2015; Li et al. 2002).

Histologicamente, o TW se diferencia dos outros tumores renais por conter componentes de tecido em até três morfologias diferentes: componente mesenquimatoso ou estromal, que se assemelha ao mesênquima fetal primitivo; componente epitelial, que se assemelha a túbulos e glomérulos renais fetais; e componente blastematoso, constituído por aglomerados de células blásticas (**Figura 1**). Os diferentes componentes do TW recapitulam os diversos estágios de diferenciação celular durante o complexo processo de desenvolvimento renal na embriogênese (Beckwith 1982; Hohenstein et al. 2015; Li et al. 2002; Maschietto et al. 2008), demonstrando que este tumor se origina de uma falha nesse processo.



Fonte: Adaptado de Al-Hussain et al (2014).

Figura 1 - Os três diferentes componentes histológicos do TW.

Nos países desenvolvidos, as taxas de sobrevivência para o TW aumentaram significativamente nas últimas décadas, passando de 20% na década de 1960 para cerca de 90% atualmente. Já nos países em desenvolvimento, as taxas de sobrevivência são um pouco menores, de aproximadamente 75% (Dome et al. 2013; Gleason et al. 2014; Rabeh et al. 2016; Verma e Kumar 2016). Essa melhoria dramática na sobrevivência deve-se, em parte, à maneira sistemática em que a abordagem terapêutica evoluiu devido ao trabalho de dois grandes grupos cooperativos que estudam TWs: o grupo norte-americano NWTSG (*National Wilms Tumor Study Group*), que em 2001 fundiu-se com outros grupos gerando o COG - *Children's Oncology Group* e o grupo europeu SIOP (*Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*), também denominado como RTSG (*Renal Tumor Study Group*).

Os esforços dos grupos NWTSG e SIOP geraram protocolos de tratamento para o TW. A principal diferença entre estes protocolos é o momento cirúrgico. Enquanto o NWTSG recomenda a nefrectomia seguida por quimioterapia adjuvante para a maioria dos pacientes, o SIOP sugere a quimioterapia pré-operatória/neoadjuvante visando reduzir o tamanho e estadiamento do tumor antes da cirurgia. No Brasil, segue-se o protocolo SIOP para o tratamento do TW.

Um fator chave para o sucesso no tratamento e a ótima sobrevida dos pacientes com TW foi o refinamento de marcadores prognósticos clínicos e biológicos que permitiram a terapia direcionada ao risco. Entretanto, apesar de apresentar um bom prognóstico na maioria dos casos, cerca de 15% dos pacientes com TW sofrem recidiva. Estes pacientes requerem tratamento adicional que pode levar a efeitos adversos a longo prazo, como efeitos musculoesqueléticos, toxicidade cardíaca, problemas reprodutivos, disfunção renal e o desenvolvimento de segundas neoplasias malignas (Foster et al. 2022; Wright et al. 2009). Estima-se que cerca de 25% dos sobreviventes de TW sofrem com tais efeitos adversos tardios (Suh et al. 2020; Termuhlen et al. 2011).

Portanto, são necessárias ferramentas auxiliares na identificação precoce de pacientes de maior risco, auxiliando na estratificação de prognóstico. No futuro, essas ferramentas poderão auxiliar no ajuste de intensidade de tratamento de forma cada vez mais certa, intensificando precocemente o tratamento de pacientes com maiores chances de progressão e poupando pacientes de menor risco dos efeitos colaterais a longo prazo, mantendo uma excelente taxa de sobrevida.

1.2.1 Classificação do TW

A classificação histológica precisa e o estadiamento apropriado do TW são fundamentais para a seleção do tratamento mais efetivo, que objetiva maximizar a sobrevida e minimizar a toxicidade. As **tabelas 1, 2 e 3** mostram os critérios de classificação do TW adotados pela SIOP (2001).

Tabela 1 - Critérios para estadiamento do tumor de Wilms - protocolo SIOP (2001).

Estadio	Critérios
I	<ul style="list-style-type: none"> - O tumor é limitado ao rim ou está rodeado por uma pseudocápsula fibrosa se estiver fora do contorno renal normal. - O tumor pode apresentar uma protusão no sistema pélvico e no ureter, mas não está infiltrando suas paredes. - O seio renal (seus vasos e tecidos moles) não está envolvido. - Vasos intrarrenais podem estar envolvidos.
II	<ul style="list-style-type: none"> - O tumor penetra através da cápsula renal ou pseudocápsula fibrosa na gordura perirrenal. - O tumor infiltra tecidos moles ou vasos linfáticos do seio renal. - O tumor infiltra-se no tecido perirrenal. - O tumor infiltra-se na parede pélvica do ureter. - O tumor infiltra-se em órgãos ou veia cava adjacentes. - Critério obrigatório: o tumor é completamente ressecado.
III	<ul style="list-style-type: none"> - Tumor viável ou não viável presente nas margens da ressecção. - Todos os nódulos linfáticos abdominais estão envolvidos. - Ruptura tumoral pré ou intra-operatória (independentemente de outros critérios de estadiamento). - Penetração de tumor através da superfície peritoneal. - Implantes de tumor são encontrados na superfície peritoneal. - Trombos tumorais presentes nas margens da ressecção de vasos extra-renais. - Tumor foi submetido a biópsia cirúrgica antes da quimioterapia pré-operatória ou cirurgia.
IV	<ul style="list-style-type: none"> - Metástases hematógenas (pulmão, fígado, ossos, cérebro, etc.) ou metástases nos linfonodos fora da região abdominopélvica.
V	<ul style="list-style-type: none"> - Tumor renal bilateral ao diagnóstico.

Fonte: Adaptado de Vujanic e Sandstedt (2010).

Tabela 2 - Critérios histológicos para subtipagem do TW - protocolo SIOP (2001).

Tipo de tumor	AIQ (%)	Características histológicas (% do tumor)		
		Epitélio	Estroma	Blastema
Completamente necrótico	100	0	0	0
Regressivo	>66	0-33	0-33	0-33
Misto	<66	0-65	0-65	0-65
Epitelial	<66	66-100	0-33	0-10
Estromal	<66	0-33	66-100	0-10
Blastemal	<66	0-33	0-33	66-100

Fonte: adaptado de Vujanic e Sandstedt (2010).

Legenda: AIQ, alterações induzidas por quimioterapia.

Tabela 3 - Critérios para classificação de risco do TW - protocolo SIOP (2001).

Risco	Critérios
Baixo	- Nefroma mesoblástico. - Nefroma cístico parcialmente diferenciado (CPDN). - Completamente necrótico.
Intermediário	- Subtipo epitelial. - Subtipo estromal. - Subtipo misto. - Subtipo regressivo. - Anaplasia focal. - Não anaplásico.
Alto	- Subtipo blastemal. - Anaplasia difusa.

Fonte: adaptado de Vujanic e Sandstedt (2010).

A classificação histológica é uma ferramenta importante na avaliação do prognóstico e no planejamento do tratamento para pacientes com TW. No Brasil a análise histológica é realizada após a quimioterapia pré-operatória. De forma geral, os tumores com maior grau de diferenciação celular (ou seja, maior fração de componentes estromal e/ou epitelial) apresentam menor risco e prognóstico melhor, porque estes componentes mais diferenciados têm menor sensibilidade à quimioterapia. Já as células menos diferenciadas (blastema) são geralmente mais sensíveis ao tratamento quimioterápico, então a presença de blastema após a quimioterapia

neoadjuvante demonstra que o tumor apresenta resistência ao tratamento, sinalizando casos de maior risco.

Outros marcadores de prognóstico em TW vem sendo estudados nos últimos anos com o objetivo de refinar ainda mais a escolha terapêutica, como o volume absoluto de blastema no tumor, ganho do cromossomo 1q e o padrão de metilação do cromossomo 11p15 (Dome et al. 2014; van den Heuvel-Eibrink et al. 2017), mostrando que ainda há necessidade de marcadores de risco e de prognóstico mais específicos para pacientes com TW.

1.2.2 Caracterização genética do TW

Nos últimos anos, houve um notável empenho na identificação de genes responsáveis por predispor ao câncer indivíduos de diferentes faixas etárias, como crianças, adolescentes e adultos jovens (Akhavanfard et al. 2020; Diets et al. 2019; Gröbner et al. 2018; Mahamdallie et al. 2019; Zhang et al. 2016). Esta progressão foi impulsionada pelo advento da tecnologia de sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*), que aumentou exponencialmente a capacidade de análise do genoma humano.

Novos genes de predisposição ao TW foram recentemente identificados, como *TRIM28*, que parece estar associado ao subtipo epitelial do TW (Diets et al. 2019; Mahamdallie et al. 2019), e *FBXW7*, *NYNRIN* e *KDM3B*, envolvidos em diversos processos biológicos, como silenciamento genético, reparo de DNA e manutenção da integridade genômica (Mahamdallie et al. 2019). Clinicamente, pacientes com predisposição genética ao TW tendem a desenvolver a doença de forma bilateral com mais frequência e podem ou não apresentar sintomas sindrômicos ou ser parte de uma família afetada pelo TW.

Estima-se que anomalias genéticas congênitas são responsáveis por cerca de 10% a 15% dos casos de TW, como as causadas por alterações patogênicas em *WT1* (Síndromes de WAGR e Denys-Dash) (Pelletier et al. 1991), desregulações de *imprinting* genômico em 11p15 (Síndrome de Beckwith-Wiedemann) (Ohlsson et al. 1993), alterações em *DIS3L2* (Síndrome de Perlman) (Astuti et al. 2012) e em *DICER1* na síndrome do blastoma pleuropulmonar (Foulkes et al. 2011). Entretanto, muitos casos sindrômicos, não sindrômicos e clusters familiares afetados por TW ainda não tiveram um gene responsável identificado, expondo uma importante lacuna no conhecimento sobre genes envolvidos na predisposição ao TW e, conseqüentemente, sobre os sistemas biológicos que operam em sua tumorigênese.

Cerca de 90% dos casos de TW são esporádicos, resultando de variantes somáticas que são restritas ao tecido tumoral. Assim como outros tumores pediátricos, o TW apresenta uma média de alterações somáticas consideravelmente menor do que tumores em pacientes adultos, apresentando menor instabilidade genética (Vogelstein et al. 2013).

O TW é considerado altamente heterogêneo. Entre as alterações genéticas pontuais mais comuns estão as variantes somáticas em *WTX* (Rivera et al. 2007), *WT1* (Huff et al. 1995; Varanasi et al. 1994) e *CTNNB1* (Koesters et al. 1999), que correspondem a cerca de 30% dos casos (Ruteshouser et al. 2008), indicando que a via Wnt está intimamente envolvida com a tumorigênese dessa neoplasia. *CTNNB1*, por exemplo, encontra-se mutado em 7,5% dos TWs em Torrezan et al. (2014) e em 6,5% dos TWs em Gadd et al. (2017). Os genes *TP53* (Bardeesy et al. 1994), *DIS3L2* (Astuti et al. 2012), *DICER1* (Wu et al. 2013), *FBXW7* e *MYCN* (Williams et al. 2010) também foram descritos como mutados nesse tumor.

Em um estudo anterior do grupo (Torrezan et al. 2014) foi identificada uma variante recorrente em TW (p.E1147K) em *DROSHA*, um gene primordial envolvido no processamento de microRNAs. Essa variante, presente em 10% das amostras analisadas, afeta o domínio RNase IIIb

e altera o perfil de microRNAs destes pacientes, causando diminuição na expressão de microRNAs maduros. Nesse mesmo estudo também foram identificadas mutações não-recorrentes em outros genes da via de microRNAs em cerca de 17% dos TWs. Resultados semelhantes foram obtidos por outro grupo (Rakheja et al. 2014). Entre os outros genes da via de microRNAs identificados como alterados no TW, o gene *DGCR8* foi descrito como mutado em 10,3% das amostras analisadas por Wegert et al. (2015) e em 9% das amostras analisadas por Torrezan et al. (2014). Outro gene desta mesma via, *DICER1*, foi encontrado mutado em 4,5% dos TWs por Torrezan et al. (2014) e em 3,7% dos TWs por Gadd et al. (2017), demonstrando o importante envolvimento da via de microRNAs no desenvolvimento deste tumor.

No entanto, ainda há uma lacuna na compreensão dos processos biológicos envolvidos na tumorigênese do TW, uma vez que muitos casos apresentam variantes somáticas em genes que ainda não foram relacionados à essa neoplasia.

1.3 Carcinoma de células renais

O Carcinoma de Células Renais (CCR) se origina no revestimento do túbulo contorcido proximal dos rins. O CCR tem envolvimento de fatores ambientais que aumentam as chances de acometimento pela doença, como tabagismo, hipertensão e obesidade (Gray e Harris 2019), além exposição ocupacional ao tricloroetileno, substância utilizada por mecânicos, lavanderias, processadores de óleo, fabricantes de cloreto de polivinila e produtores de tabaco com baixo teor de nicotina (Kelsh et al. 2010; Karami et al. 2012; Alanee et al. 2015). O CCR também parece ser mais comum em pacientes com insuficiência renal terminal, doença cística renal, transplantados renais, pacientes em diálise ou com síndrome da esclerose tuberosa (Escudier et al. 2019).

Aproximadamente metade dos casos de CCR são descobertos de forma incidental, sem apresentar sintomas, durante exames de imagem realizados por outros motivos relacionados à saúde (Campbell et al. 2009). Casos que apresentam hematúria, dor e massa abdominal palpável são incomuns e geralmente representam a doença em estágio mais avançado (Ljungberg et al. 2007; Loo et al. 2013).

O CCR é classificado em diferentes subtipos com base nas suas características histológicas. Os três subtipos mais comuns são o carcinoma renal de células claras (ccRCC, do inglês "*clear cell renal cell carcinoma*") que representa cerca de 75% dos casos; o subtipo Papilífero, que corresponde a 15% a 20% dos casos; e o subtipo Cromóforo, que corresponde a 5% dos casos (Ricketts et al. 2018). Entre esses subtipos, o ccRCC é o mais agressivo e apresenta o pior prognóstico (Campbell et al. 2009).

Ao diagnóstico, o CCR costuma ser um tumor localizado em 45% dos casos, invasivo em 33% dos casos e disseminado para outros órgãos em até 25% dos casos. As taxas de sobrevivência em 5 anos ficam em torno de 81% para o grupo I (T1 N0 M0) e em torno de apenas 8% para o grupo IV (T4 ou M1).

Para o CCR precoce o tratamento é cirúrgico. A nefrectomia é o tratamento padrão para casos de doença localizada, podendo ser total (nefrectomia radical) ou parcial (cirurgia conservadora de néfrons). Cada modalidade está associada a seus próprios riscos e benefícios. A nefrectomia radical pode levar a um risco aumentado para doença renal crônica (Huang et al. 2006) e para morbimortalidade cardiovascular (Thompson et al. 2008), sendo indicada em casos onde o tumor se estende para a veia cava inferior. Já a nefrectomia parcial pode preservar a função renal, diminuir a mortalidade geral e reduzir a frequência de eventos cardiovasculares, sendo indicada para pacientes com uma forma hereditária de CCR ou com tumores renais T1a/T1b (até 7 cm em sua maior dimensão). Em alguns pacientes com CCR localizado a nefrectomia

parcial pode não ser adequada devido ao crescimento tumoral localmente avançado ou porque o tumor está em uma localização desfavorável. Ambas as modalidades cirúrgicas apresentam sucesso terapêutico equivalente (Leibovich et al. 2004; Tan et al. 2012).

Mais de 20% dos pacientes submetidos à nefrectomia desenvolverão metástases durante o acompanhamento. Nos últimos anos houve notável avanço no tratamento do CCR metastático, com a aprovação de terapias alvo como sorafenibe, sunitinibe, bevacizumabe, pazopanibe e axitinibe, que inibem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seu receptor (VEGFR), além de everolimus e temsirolimus, que inibem o alvo mecanístico do complexo rapamicina 1 (mTORC1). Desde 2015, foram aprovados agentes com alvos adicionais além do VEGFR, como cabozantinib e lenvatinib, bem como imunoterapias, como nivolumab (Hsieh et al. 2017). Mesmo com estes avanços, as opções terapêuticas para o CCR são limitadas devido à resistência à quimioterapia e radioterapia, bem como à baixa eficácia e alta toxicidade da imunoterapia.

1.3.1 Classificação do CCR

O sistema utilizado para classificação do CCR é o sistema TNM da AJCC (do inglês "*American Joint Committee for Cancer*"), que tem sua versão mais recente em uso desde janeiro de 2018 (Amin et al. 2017). No sistema TNM se leva em conta o tumor primário (T), o acometimento de linfonodos da cadeia linfática (N) e a presença de metástase à distância (M). As **tabelas 4 e 5** descrevem os critérios utilizados para cada estadiamento.

Tabela 4 - Critérios para classificação do CCR de acordo com o sistema TNM.

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

Fonte: adaptado de American Cancer Society (2020).

Tabela 5 - Critérios para estadiamento do CCR de acordo com o sistema TNM.

Estadio	TNM
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T3 N0 M0; T1-3 N1 M0
IV	T4, qualquer N, M0; qualquer T, qualquer N, M1

Fonte: adaptado de American Cancer Society (2020).

Para a classificação do CCR utiliza-se também o sistema ISUP (do inglês “*International Society of Urological Pathology*”), com graduação de 1 a 4 de acordo com o grau de proeminência nucleolar (graus 1 a 3) e presença de células altamente atípicas (grau 4). O sistema ISUP é similar ao sistema de Fuhrman, porém apresentando maior reprodutibilidade e maior relação com o prognóstico do paciente (Samaratunga et al. 2014).

Ao longo das últimas décadas, diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de identificar marcadores prognósticos para CCR, visando identificar pacientes com maior risco de recidiva e mortalidade (Carril-Ajuria et al. 2019; Kroeze et al. 2010; Petitprez et al. 2021; Rabjerg 2017). A necessidade de marcadores prognósticos e o desenvolvimento de terapias mais eficazes são evidenciados pelas baixas taxas de sobrevida em casos avançados de CCR, principalmente em sua forma mais comum e agressiva, o ccRCC.

1.3.2 Caracterização genética do ccRCC

Geneticamente, o ccRCC é o subtipo de CCR mais explorado, sendo considerado um tumor heterogêneo (Gerlinger et al. 2012). O gene supressor tumoral *VHL* é o mais mutado no ccRCC, presente em cerca de 55% dos casos como mutação pontual, deleção ou hipermetilação (Dalgliesh et al. 2010). A proteína VHL é uma ubiquitina ligase E3 que tem como alvo fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIFs) para degradação mediada por proteassoma. Assim, a perda da função de *VHL* leva à estabilização e acúmulo de HIFs que regulam positivamente os genes pró-angiogênicos, principalmente *VEGF* (que codifica o fator de crescimento endotelial vascular), promovendo a angiogênese e a ativação de outras vias, como PI3K-AKT-mTOR (WM et al. 2016).

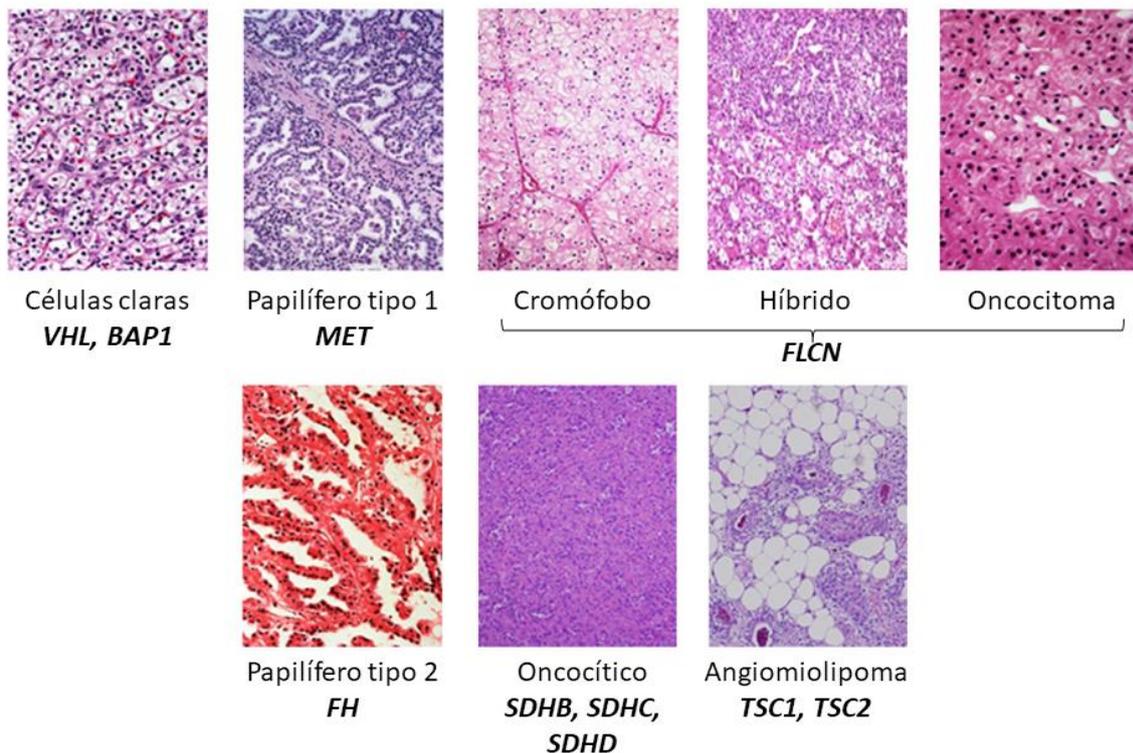
Outros genes supressores de tumor foram encontrados mutados em ccRCC em estudos que tiveram como objetivo elucidar o espectro mutacional destes tumores, identificando mutações frequentes nos genes *PBRM1* e *BAP1*, além de genes também envolvidos no controle transcricional e na maquinaria de modificação da cromatina, como *KDM6A*, *KDM5C* e *SETD2* (Dalgliesh et al. 2010; Guo et al. 2011; Varela et al. 2011).

Num estudo recente do nosso grupo (Meira, 2022) foi gerado um painel de 28 genes frequentemente mutados em CCR (PAINEL CCR-28). Para o subtipo ccRCC foi possível identificar variantes somáticas em *VHL* em 27 das 46 amostras avaliadas usando esse painel (58,7%), seguido por *PBRM1* em 15 amostras (32,6%) e por *SETD2* em 6 amostras (14%). De forma geral, o PAINEL CCR-28 teve uma taxa de 76% de sucesso na detecção de variantes somáticas em ccRCC, reforçando a predominância de *VHL* no espectro de genes mutados nesta neoplasia e o peso do envolvimento de vias relacionadas à remodelação da cromatina e ao controle transcricional na tumorigênese do ccRCC.

O CCR também pode ocorrer devido a aspectos genéticos hereditários. Cerca de 2% a 3% de todos os CCR são hereditários, causados por síndromes como a de Von-Hippel-Lindau (relacionada a alterações no gene *VHL*) e também aspectos não sindrômicos, como o carcinoma renal papilar hereditário (relacionado ao gene *MET*), carcinoma de célula renal e leiomioma hereditário (relacionado ao gene *FH*). Clinicamente, pacientes em idade jovem (≤ 45 anos), com lesões múltiplas e bilaterais tem maiores chances de terem um componente hereditário relacionado ao tumor renal.

A **figura 2** ilustra os principais genes relacionados aos diferentes tipos de câncer renal hereditário que acometem a população adulta. Variantes germinativas patogênicas no gene *VHL* causam a doença de *von Hippel-Lindau* e tumores renais de células claras; as no oncogene *MET* predisõem o indivíduo ao carcinoma papilífero do tipo 1; quando ocorrem no gene *FLCN*, em pacientes com a síndrome de *Birt-Hogg-Dubé*, existe predisposição aos tumores oncocíticos híbridos, tumores renais cromóforos e oncocitomas benignos; no gene *FH*, essas variantes em pacientes com leiomiomatose e carcinoma de células renais tem maiores chances de apresentar tumores com histologia do subtipo papilífero tipo 2; quando ocorrem nos genes que codificam as subunidades de succinato desidrogenase (*SDHB*, *SDHC* e *SDHD*), causam predisposição a

tumores renais com fenótipo oncocítico em pacientes com CCR; pacientes com complexo de esclerose tuberosa que herdam variantes patogênicas nos genes *TSC1* ou *TSC2* sofrem maior risco de desenvolver angiomiolipomas nos rins e, ocasionalmente, tumores renais (Schmidt e Linehan 2016).



Fonte: Adaptado de Schmidt e Linehan (2016).

Figura 2 - Principais genes relacionados aos diferentes tumores renais da classe CCR de origem hereditária.

O conhecimento do repertório dos genes de predisposição ao TW e ao CCR pode melhorar a compreensão do processo de tumorigênese, auxiliar no tratamento e fornecer informações sobre o risco genético herdável de desenvolvimento destes tumores. Além disso, essa compreensão pode ser útil no aconselhamento genético dos pacientes e de suas famílias.

1.4 Biopsia Líquida na detecção de DNA tumoral

Atualmente está bem estabelecido que pacientes com diferentes tipos de câncer, independente do estadiamento clínico, apresentam maiores níveis de DNA circulante livre (cfDNA, do inglês “*circulating free DNA*”) em fluidos corpóreos do que indivíduos saudáveis. O cfDNA é o DNA altamente fragmentado que circula no sangue e em outros fluidos corpóreos, sem estar associado a células vivas.

O cfDNA pode ser detectado em fluidos corpóreos tais como o plasma sanguíneo e sobrenadante da urina (Bettegowda et al. 2014; Diehl et al. 2008; Ferreira et al. 2016; Li et al. 2002; Murtaza et al. 2015; Perkins et al. 2012; Riediger et al. 2016; Schwarzenbach et al. 2011). Na urina também é possível detectar o DNA íntegro de células epiteliais que se desprendem do trato geniturinário (ceDNA, do inglês “*cellular DNA*”), a partir da análise do sedimento urinário (Birkenkamp-Demtröder et al. 2016; Botezatu et al. 2000; Guo et al. 2016; Millholland et al. 2012; Su et al. 2004b; Togneri et al. 2016).

Estudos em pacientes com câncer têm mostrado evidências de que o cfDNA e o ceDNA contêm moléculas de DNA tumoral (tDNA). Com base no perfil mutacional observado, é possível identificar que essas moléculas de DNA são claramente representativas do genoma tumoral. O tDNA é resultado de apoptose e/ou necrose de células tumorais e, portanto, também apresenta-se tipicamente em estado fragmentado (160-180bp) (Jahr et al. 2001; Mouliere et al. 2011), misturando-se ao cfDNA de células não cancerosas encontrado nos fluidos corpóreos. Na literatura, o DNA tumoral livre encontrado em plasma também é chamado de ctDNA (do inglês “*circulating tumor DNA*”).

Em casos de tumores renais, que podem estar em contato direto com a urina, a liberação de células tumorais pode ocorrer devido à instabilidade tecidual, dependendo da localização do

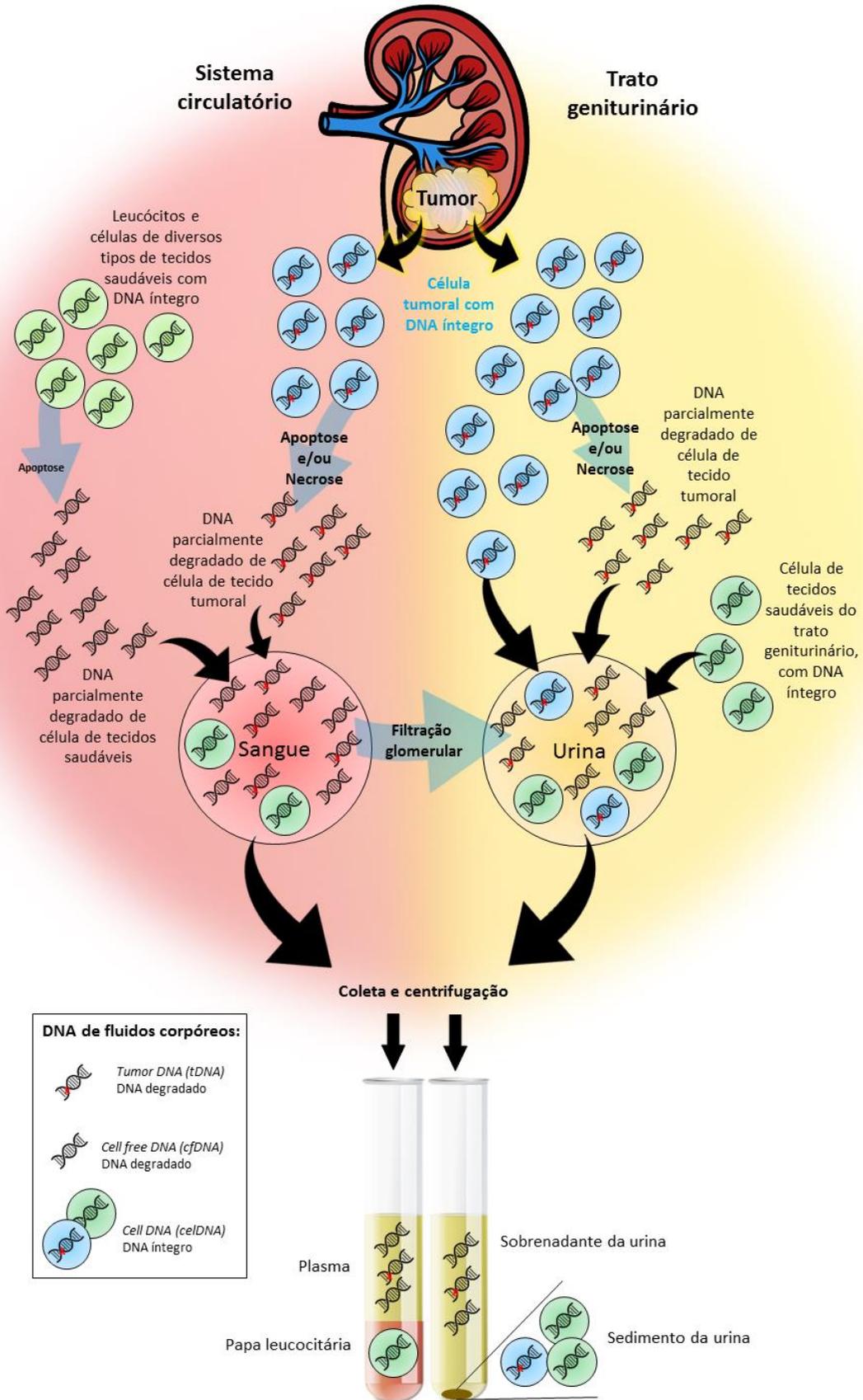
tumor no rim. Essas células tumorais são diluídas na urina juntamente com células de tecidos saudáveis, resultantes do processo natural de esfoliação e apoptose do tecido epitelial do trato geniturinário. Além disso, outros estudos mostram que é possível identificar tDNA altamente degradado, proveniente da circulação após filtração glomerular (Botezatu et al. 2000; Su et al. 2004a), também no sobrenadante da urina. Já no sedimento da urina encontra-se o ceDNA em estado mais íntegro, proveniente das células do trato geniturinário (Su et al. 2004b) (**Figura 3**).

É observada alta correlação entre a frequência destas mutações específicas do tumor detectadas em tDNA com a progressão da doença em diferentes tipos de câncer (Dawson et al. 2013; De Mattos-Arruda et al. 2014; Miguez et al. 2020; Murtaza et al. 2015). Estudos mostram que a biópsia líquida pode ainda superar o obstáculo da heterogeneidade tumoral enfrentado pelas biópsias teciduais (Chan et al. 2013; Forsheew et al. 2012). Além disso, a análise de amostras seriadas de fluidos corpóreos pode detectar o surgimento de clones relacionados à resistência ao tratamento, permitindo uma personalização da estratégia terapêutica para cada paciente (De Mattos-Arruda et al. 2014; Murtaza et al. 2015).

Numa análise anterior publicada pelo nosso grupo (Miguez et al. 2020), foi feita uma avaliação da presença de tDNA em plasma e componentes da urina (sedimento e sobrenadante) de pacientes com TW. Foram coletadas amostras seriadas destes fluidos corpóreos antes, durante e após o tratamento. A detecção de tDNA em plasma e/ou urina antes do início do tratamento foi recorrente nestes pacientes, assim como a diminuição do tDNA durante a quimioterapia neoadjuvante. Observou-se ainda que a persistência do tDNA em fluidos corpóreos após a cirurgia ocorreu em casos acometidos por metástase após cirurgia, óbito por avanço da doença e em um caso de TW bilateral que passou por nefrectomia parcial, podendo indicar doença residual estável.

Quanto à detecção de tDNA em fluidos corpóreos de pacientes adultos com CCR, um estudo recente avaliou a presença de tDNA em urina e plasma, abrangendo desde casos com tumores benignos até casos metastáticos. Utilizando o método de *target sequencing* através de um painel de genes, foi possível detectar tDNA em 54,5% dos plasmas de 22 casos e 50% dos sobrenadantes de urina de 14 casos, todos coletados antes do início do tratamento. Foi possível observar uma correlação entre a detecção de tDNA nos plasmas e o tamanho do tumor. A detecção de tDNA no plasma foi mais frequente em pacientes com CCR localmente avançados, com trombo tumoral da veia renal ou da veia cava inferior. Já nos sobrenadantes de urina, não houve relação entre a detecção de tDNA, o tamanho do tumor ou o comprometimento da veia renal ou da veia cava. Além disso, foi observado que os níveis de tDNA em plasma e urina de pacientes com CCR são baixos, com a média da frequência alélica da variante de aproximadamente 3% (Smith et al. 2020).

Esses relatos abrem perspectivas reais da investigação do tDNA em fluidos corpóreos como ferramenta não invasiva de monitoramento de resposta ao tratamento, de progressão e recidiva, identificação precoce de pacientes de maior risco e estratificação de prognóstico.



Fonte: autoria própria.

Figura 3 - As diferentes origens do DNA encontrado em plasma e urina de pacientes com tumor renal e sua presença nos componentes de urina e sangue.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os aspectos genéticos germinativos e somáticos tanto do câncer renal adulto quanto do pediátrico, e avaliar o potencial da detecção do DNA tumoral (tDNA) em urina e plasma destes pacientes como ferramenta complementar para estratificação de prognóstico.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um painel de genes com alta sensibilidade para detecção de variantes somáticas no TW, com base nas informações disponíveis na literatura sobre os genes mutados nesta neoplasia.
- Investigar a presença de tDNA em amostras seriadas de plasma e urina de pacientes com TW e ccRCC através da detecção de variantes somáticas específicas do tumor, como ferramenta complementar para estratificação de prognóstico.
- Identificar variantes germinativas de predisposição ao TW e ao CCR através do sequenciamento de um painel de 126 genes de predisposição ao câncer (GPC) em amostras de DNA constitutivo.

3. METODOLOGIA

3.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental do estudo está ilustrado na **Figura 5**. Para identificação das variantes somáticas presentes no tecido tumoral dos casos de TW foi utilizado o PAINEL TW-35, criado no presente estudo através de revisão da literatura, contendo os genes mais frequentemente mutados em TW. Foram usados os DNAs do tecido tumoral pareado com o DNA de leucócitos. No caso de ausência de detecção de variante somática nos genes contidos no painel, os DNAs foram submetidos ao sequenciamento do exoma que possibilita a detecção de variantes somáticas em outros genes não presentes no painel. Para os casos de ccRCC, as variantes somáticas foram previamente identificadas no estudo anterior do grupo através de um painel customizado com genes frequentemente mutados em CCR (*Meira, 2022*). Para os casos de tumor de ccRCC que não tiveram variante somática identificada nos genes do painel customizado, foi realizado o sequenciamento do painel comercial Comprehensive Cancer Panel (CCP) (ThermoFisher Scientific, USA), com 409 genes frequentemente mutados em câncer.

As variantes somáticas identificadas no tecido tumoral foram rastreadas pelo método PATS (do inglês “*personalized amplicon target sequencing*”) de forma personalizada para cada paciente, usando sequenciamento de amplicon com alta cobertura nos DNAs das amostras de sobrenadante da urina, das células do sedimento da urina e do plasma dos pacientes com TW e ccRCC. Para os pacientes com TW, as amostras foram coletadas no momento do diagnóstico (baseline), após quimioterapia neoadjuvante (M1) e após a cirurgia (M2). Para os pacientes com ccRCC, as amostras foram coletadas antes da cirurgia (baseline), de 6 a 8 semanas após cirurgia (coleta M1), 6 meses após cirurgia (coleta M2), 18 meses após cirurgia (coleta M3) e 30 meses

após cirurgia (coleta M4). A associação entre os dados de detecção de tDNA, variáveis patológicas e desfecho clínico foram então analisados. Estes pacientes foram monitorados por um período de pelo menos 2 anos e meio.

Paralelamente, para identificação de genes de predisposição ao TW, foram selecionadas amostras de DNA de leucócito e de tecido não neoplásico de pacientes com TW e com ccRCC no Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center de forma retrospectiva e dos pacientes recrutados para o presente estudo de forma prospectiva.

a) Coleta de amostras de sangue e urina

Tumor de Wilms (TW):

Baseline	Antes do tratamento
M1	Após quimioterapia neoadjuvante
M2	Após cirurgia

Carcinoma renal de células claras (ccRCC):

Baseline	Antes da cirurgia
M1	6 a 8 semanas após cirurgia
M2	6 meses após cirurgia
M3	18 meses após cirurgia
M4	30 meses após cirurgia

b) Painel de genes customizado:

Painel TW-35:

Análise da literatura e confecção do painel:
Estudos com dados de seq. de exoma ou genes específicos em amostras de TW.

ABCA7, CTNNA1, DGCR8, INTS1, MYCN, RERE, SIX2, TNRC18, XPO5, ARID1A, DCHS1, DROSHA, KLHL30, NONO, REST, SLC25A5, TP53, WT1, BCOR, DICER1, FBXW7, MAX, NOTCH1, RYR2, SMARCA4, TTN, WTX, CHD4, DIS3L2, GLI3, MLLT1, NOTCH2, SIX1, TARBP2, U2AF2.

Painel CCR-28:

Painel previamente customizado (Meira, 2022):

AR, BRAF, FAT1, KDM5C, MET, NFE2L2, PCF11, SMARCB1, STAG2, ARID1A, CDKN2A, FH, KDM6A, MTOR, NRAS, PIK3CA, SMARCA4, TCEB1, BAP1, EGFR, FLCN, KRAS, NF2, PBRM1, PTEN, SETD2, TP53, VHL.

c) Identificação de variantes somáticas no tumor e busca por tDNA em plasma e urina:

TW:

Seq. utilizando o Painel TW-35:
DNA de tec. tumoral + DNA de leucócitos

Se **negativo** para variante somática

Seq. Exoma:
DNA de tec. tumoral + DNA de leucócitos

ccRCC:

Seq. DNA de tumor e de leucócitos utilizando o Painel CCR-28, realizado previamente (Meira, 2022)

Se **positivo** para variante somática

Se **negativo** para variante somática

Seq. de amplicon:
DNA de plasma e de urina

Painel CCP:
DNA de tec. tumoral + DNA de leucócitos

Análise de associação com desfecho clínico e variáveis patológicas

d) Identificação de genes de predisposição:

TW e CCR:

Seq. painel de 126 genes:
DNA de leucócitos ou de tecido não neoplásico

Legenda:

Análises realizadas em um projeto anterior (Meira, 2022).

Análises realizadas no presente estudo.

Análises realizadas em parte no projeto anterior (Meira, 2022), em parte no presente estudo.

Fonte: autoria própria.

Figura 4 - Delineamento experimental.

3.2 Casuística

3.2.1 Avaliação da presença de tDNA em plasma e urina

Para as análises de tDNA em plasma e urina, foram incluídos neste estudo pacientes com TW, independente de estadiamento e grau de risco, na faixa etária pediátrica e que não iniciaram tratamento, em programação para tratamento de acordo com o protocolo SIOP-2001. Os pacientes foram recrutados no serviço de pediatria oncológica do A.C.Camargo Cancer Center, além de pacientes provenientes dos hospitais da Rede D'OR São Luiz através de parceria, tendo como responsável a Dra. Isabela Werneck da Cunha, coordenadora médica do departamento de patologia da Rede D'OR São Luiz.

Também foram incluídos 39 pacientes com ccRCC de um estudo prévio do nosso grupo (*Meira, 2022*) que tiveram ao menos uma variante somática determinada no tumor, com idade ≥ 18 anos, sem tratamento prévio, independente de estadiamento, que foram submetidos a ressecção cirúrgica do tumor renal. Os pacientes foram recrutados no Departamento de Oncourologia do A.C.Camargo Cancer Center.

Para os casos de TW, só foram incluídos os pacientes cujos responsáveis legais aceitaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos 3 e 4). Já os casos de ccRCC assinaram o TCLE para o estudo prévio do grupo (*Meira, 2022 - CEP 2397/17*) (Anexo 5).

3.2.2 Avaliação de genes de predisposição ao TW e ao CCR

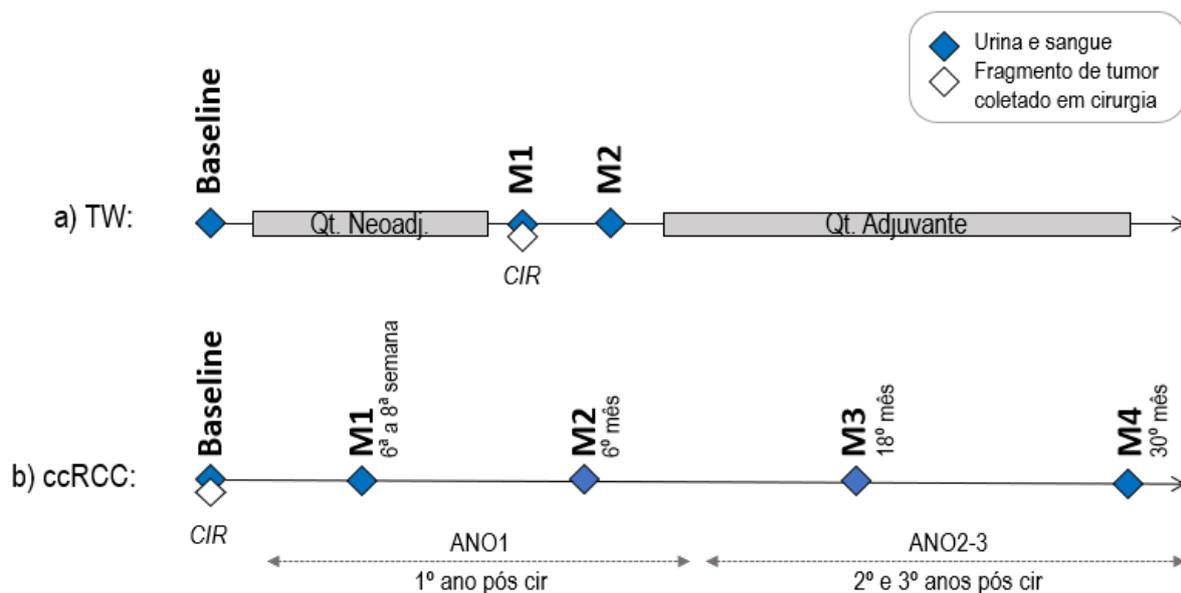
Para a identificação de genes de predisposição ao TW, foi realizada uma busca por amostras de DNA de leucócitos ou de tecido não neoplásico de pacientes com TW, com até 25 anos de idade ao diagnóstico, no Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, de forma retrospectiva. Também foram incluídos na análise de genes de predisposição os pacientes com TW recrutados de forma prospectiva neste estudo para a análise de biópsia líquida.

Para a análise de genes de predisposição ao CCR, incluindo todos os subtipos tumorais, foram utilizados os casos do estudo prévio do nosso grupo (*Meira, 2022*) que tinham DNA de leucócito ou de tecido não neoplásico disponíveis, além de casos selecionados de forma retrospectiva através do sistema Recruit com DNA de leucócito disponível no Biobanco.

3.3 Coleta de amostras biológicas

Os pacientes com TW realizaram coleta de amostras de sangue e urina no momento do diagnóstico (*baseline*), após a quimioterapia neoadjuvante (M1) e após a cirurgia (M2) (**Figura 4a**). Com o objetivo de encontrar biomarcadores com potencial de estratificar pacientes por prognóstico, os pontos de coleta de fluidos corpóreos para os casos de tumor de Wilms do presente estudo foram escolhidos baseados nos resultados de um trabalho anterior do grupo (Miguez et al. 2020), onde foram coletadas amostras seriadas antes do tratamento, durante as quimioterapias neoadjuvante e adjuvante, no dia da cirurgia e após o fim do tratamento. Os 3 momentos escolhidos para análise no presente estudo foram os considerados mais informativos no estudo anterior.

Para os pacientes com ccRCC foram coletadas amostras de plasma e urina em 5 momentos: no momento da cirurgia (baseline), monitoramento 1 (M1), realizada de 6 a 8 semanas após cirurgia; coleta de monitoramento 2 (M2), realizada 6 meses após cirurgia; coleta de monitoramento 3 (M3), realizada 18 meses após cirurgia; coleta de monitoramento 4 (M4), realizada 30 meses após cirurgia (**Figura 4b**).



Fonte: autoria própria.

Legenda: (a) Casos de TW; (b) Casos de ccRCC; CIR, cirurgia.

Figura 5 – Esquematização das coletas de amostras de sangue e urina de pacientes com TW e ccRCC.

Para as amostras de urina, foram coletados aproximadamente 50 ml de material em tubo Falcon. Para as amostras de sangue para extração de DNA de plasma, foram coletados pelo menos 4 ml de sangue em tubo *PAXgene Blood ccfDNA Tube* (Qiagen, Alemanha). Uma amostra extra de pelo menos 4 ml de sangue foi coletada junto das amostras *baseline* em tubo EDTA para a extração do DNA de leucócitos.

Para os casos de TW de outras instituições participantes foi coletada uma amostra de saliva através de *swab* bucal *ORACollect Dx OCD100* (Genotek, Canadá) no lugar do tubo de sangue EDTA.

Para todos os casos uma amostra de tecido tumoral congelada ou emblocada em parafina (FFPE) foi utilizada neste estudo para caracterização das variantes somáticas.

3.4 Processamento e extração do DNA das amostras biológicas coletadas no A.C. Camargo Cancer Center

3.4.1 Fragmento de tecido tumoral

Os tecidos congelados solicitados no Biobanco do AC Camargo Cancer Center foram submetidos à análise histológica por um patologista para avaliar a porcentagem do tecido de interesse. Somente amostras com pelo menos 80% de células malignas foram incluídas no estudo e seguiram para extração do DNA no Banco de Macromoléculas. Amostras que continham tecido não-neoplásico, fibrose, tecido adiposo ou outros contaminantes foram dissecadas manualmente. A extração do DNA foi feita de acordo com o procedimento operacional padrão (POP) do Banco de Macromoléculas (Olivieri et al. 2014). O protocolo de extração iniciou-se com duas lavagens do tecido em solução PBS 1X para retirada do excesso de Tissue-Tek® O.C.T. Compound (SAKU-4583). Em seguida, foi realizada a homogeneização do tecido em 600 µL de solução de lise (Buffer ATL – QIAGEN, Alemanha) e 20ul de Proteinase K 20mg/ml (QIAGEN, Alemanha), por 18h a 55°C sob agitação em um Termomixer (Eppendorf, Alemanha). Após homogeneização completa do tecido, ele foi submetido ao tratamento com RNase A (Promega Corporations, USA – 100mg/ml), incubando-se por 2 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, por 20 minutos à 37°C sob agitação em um Termomixer (Eppendorf, Alemanha). Após tratamento, o material lisado foi transferido cuidadosamente para o equipamento automatizado

de extração QIASymphony (QIAGEN), utilizando-se o protocolo BC_400_V7 (com eluição final em 200ul).

Os tecidos parafinados foram submetidos à análise histológica por um patologista para avaliar a porcentagem do tecido de interesse e se os cortes histológicos seguem diretamente para extração ou serão submetidos ao processo de “*scrape*” a fim de separar tecido não neoplásico, fibrose, tecido adiposo ou outros contaminantes. A extração do DNA foi feita de acordo com o POP do Banco de Macromoléculas (Olivieri et al. 2014). O protocolo de extração iniciou-se com a adição de 160ul do Deparaffinization Solution (QIAGEN, Alemanha) para retirada do excesso de parafina do tecido, seguido de vortex por 10 segundos e incubação à 56°C por 3 minutos sob agitação em um Termomixer (Eppendorf, Alemanha). Foram adicionados 180ul do Buffer ATL (QIAGEN, Alemanha), a solução foi homogeneizada no vortex e centrifugada por 1 minuto a 10.000 rpm à temperatura ambiente. Após centrifugação, foram adicionados 20ul de Proteinase K 20mg/ml (QIAGEN, Alemanha) à fase aquosa, homogeneizando cuidadosamente com a pipeta, e o tubo foi submetido à incubação à 56°C overnight sob agitação em um Termomixer (Eppendorf, Alemanha). Após incubação overnight, a solução foi novamente incubada à 90°C por 1 hora (sem agitação), seguido de centrifugação breve para remover as gotas de dentro da tampa e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, utilizando-se o protocolo QIAamp® DNA Micro Kit (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante, com modificações.

A pureza e a concentração do DNA foram avaliadas pelos equipamentos Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) e QUBIT 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA), respectivamente. A integridade do DNA foi avaliada pelo equipamento 4200 TapeStation (Agilent Technologies, EUA).

3.4.2 Sangue

O DNA das amostras de leucócitos foi extraído no Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. As amostras de sangue periférico para extração de DNA de leucócitos foram coletadas em tubo EDTA e centrifugadas a 1000 rcf por 10 minutos em temperatura ambiente. Os glóbulos vermelhos, juntamente com a camada de leucócitos, foram transferidos para um tubo cônico de 50 ml. Foram adicionados 40 ml de Tris-EDTA buffer pH 8.0 (1x) para a lise dos glóbulos vermelhos e para purificação dos leucócitos. Após intenso vortex e centrifugação do tubo a 3500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e descartado. 25 ml de Tris-EDTA buffer pH 8.0 (1x) foi adicionado ao tubo de 50 ml para remoção dos restos de glóbulos vermelhos. Após vortex e nova centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi novamente retirado e descartado. O sedimento de leucócitos formado no fundo do tubo cônico de 50 ml foi dissolvido no volume restante e o volume total foi ajustado para 300 µL com tampão Tris-EDTA pH 8.0 (1x). O leucócito dissolvido foi cuidadosamente transferido para um microtubo de 2,0 ml e inserido no equipamento de extração automatizado para purificação de DNA. A extração de DNA foi realizada no equipamento QIASymphony SP (QIAGEN, Hilden, Alemanha) usando o QIASymphony DNA Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) do Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. A concentração e a pureza do DNA de leucócitos foram avaliadas por espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, US).

O DNA das amostras de plasma foi extraído em parte no Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, em parte no nosso laboratório. As amostras de sangue periférico para extração de DNA de plasma foram coletadas em tubo *PAXgene Blood ccfDNA Tube* (Qiagen, Alemanha) e submetido a centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos em temperatura ambiente. O plasma

foi cuidadosamente transferido para um tubo cônico de 15 ml e submetido a outra centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente para remover os leucócitos remanescentes. O plasma foi recuperado em um tubo cônico de 15 ml e armazenado no Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center a -80°C até a extração do cfDNA. A extração foi realizada usando uma alíquota de 2 ml de plasma com o MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit (Thermo Fischer Scientific, USA) de acordo com as instruções do fabricante, ou de forma automatizada usando o equipamento King Fisher DUO Prime (Thermo Fischer Scientific, USA) no nosso laboratório. Após extração, as amostras de cfDNA de plasma foram submetidas à análise de qualidade por Bioanalyzer (Agilent, USA) ou TapeStation (Agilent, USA) (Apêndice 1). As amostras que continham pelo menos 75% de cfDNA em fragmentos de 120bp a 260bp foram selecionadas para avaliação por biópsia líquida.

3.4.3 Urina

O DNA das amostras de urina foi extraído no Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. As amostras de urina foram coletadas em um tubo cônico de 50 ml e mantidas em geladeira por até 2h, partindo então para o processamento da amostra. A urina foi centrifugada a 3000g durante 10 minutos em temperatura ambiente, então os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos cônicos de 50 ml. O sedimento celular (juntamente com um volume residual de urina de aproximadamente 100 μl) foi transferido para um tubo de 1,5 ml. Ambos os sedimentos e sobrenadantes foram congelados imediatamente a -80°C para posterior extração de DNA e cfDNA, respectivamente.

Para extração de DNA dos sedimentos de urina, estes foram descongelados à temperatura ambiente e passaram por pré-tratamento. Foram adicionados 20 μl de Proteinase K 20 mg/ml

(QIAGEN, Hilden, Alemanha), 20 µl de B-Mercaptoetanol (Sigma Aldrich Corporations, Missouri, USA) e 1000 µl do tampão de lise ATL (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Esta solução foi homogeneizada no vortex durante um minuto e mantida a 56 °C durante 2 horas a 900 rpm para lise inicial do material. O sedimento de urina foi então transferido para um tubo de 2,0 ml.

O sedimento de urina pré tratado e o sobrenadante de urina foram inseridos no equipamento de extração automatizado para purificação de DNA e cfDNA, respectivamente. A extração foi realizada no equipamento QIASymphony SP (QIAGEN, Hilden, Alemanha) usando o QIASymphony DNA Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center.

A concentração e a pureza dos DNAs foram avaliadas por espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, US).

Para a confecção das bibliotecas, as amostras de DNA de sedimento de urina e de cfDNA de sobrenadante de urina foram descongeladas em gelo e tiveram seu volume seco em 50% no SpeedVac (Thermo Fischer Scientific, USA).

3.5 Processamento e extração do DNA das amostras de tumor, plasma, urina e saliva de pacientes com TW coletadas em outras instituições

Para as coletas realizadas em outras instituições, o DNA de leucócitos foi substituído pelo DNA obtido a partir de saliva com o uso de swab bucal para a análise de variante somática no tecido tumoral, para a filtragem de variantes germinativas. Para a extração de DNA do swab bucal foi usado o protocolo de purificação do kit PrepIT-L2P (PT-L2P) (DNA Genotek Inc., Canadá) de acordo com o protocolo do fabricante.

Os tecidos tumorais coletados em outras instituições foram fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE, do inglês *formalin fixed, paraffin embeded*) e enviados para o Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center para extração do DNA, de acordo com o descrito no tópico 3.3.1. Lâminas foram submetidas à análise histológica por um patologista para avaliar a porcentagem do tecido de interesse. Amostras com pelo menos 70% de células malignas seguiram para extração do DNA através do método fenol-clorofórmio, de acordo com o procedimento operacional padrão (POP) do Banco de Macromoléculas do A.C. Camargo Cancer Center.

O sangue periférico para extração de cfDNA de plasma foi coletado em tubo *PAXgene Blood ccfDNA Tube* (Qiagen, Alemanha) e o procedimento para extração foi descrito previamente no tópico 3.3.2.

Nas instituições parceiras, as amostras de urina foram coletadas e mantidas refrigeradas por até 2h, sendo trazidas para o Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center em seguida para a extração dos DNAs de ambos os componentes, conforme descrito no tópico 3.3.3.

3.6 Elaboração do painel de genes frequentemente mutados em TW

Para a elaboração do painel foram selecionados genes identificados como mutados em TW através de revisão da literatura. Foram selecionados estudos que disponibilizam dados de sequenciamento de exoma ou de genes específicos. Esses dados foram tabulados e genes sequenciados em mais de um estudo tiveram o número total de amostras mutadas e amostras verificadas somados.

Foram selecionados os genes mutados em ao menos 0,5% das amostras nos estudos avaliados. No caso de hotspots, somente essas regiões foram selecionadas para inclusão no

painel. Já no caso de mutações distribuídas ao longo do gene, toda a região codificante foi incluída.

As mutações foram mapeadas nos genes para referência visual através da ferramenta Mutation Mapper do cBioPortal (http://www.cbioportal.org/mutation_mapper.jsp).

3.7 Sequenciamento paralelo para identificação de variantes somáticas em DNA de tecido tumoral

3.7.1 Tumor de Wilms – PAINEL TW-35 e sequenciamento de exoma (WES)

O preparo das bibliotecas foi realizado para as amostras de DNA de leucócito e de tumor utilizando o Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fischer Scientific, EUA), segundo as instruções do fabricante. As amostras foram sequenciadas na plataforma Ion Proton ou Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, EUA) utilizando o chip Ion P1v3 ou 540.

O painel de genes TW-35 contém 35 genes frequentemente mutados em TW e foi elaborado de acordo com o tópico anterior, “3.5 - *Elaboração do painel de genes frequentemente mutados em TW*”. Os genes contidos neste painel estão listados nos Apêndices 2 e 3.

Para as amostras de TW que não tiveram variante somática identificada nos genes do PAINEL TW-35 foi realizado o WES do DNA de tecido tumoral e DNA de leucócitos utilizando o kit xGen® Exome Research Panel (IDT Technologies, USA) e o equipamento NextSeq 500 (Illumina) conforme instruções do fabricante.

3.7.2 Carcinoma renal de células claras – PAINEL CCR-28 e CCP

Para os casos de ccRCC, as variantes somáticas foram previamente identificadas num estudo anterior do grupo (Meira, 2022) através do sequenciamento de genes do PAINEL CCR-28. Os genes que fazem parte do PAINEL CCR-28 encontram-se listados no Apêndice 2. Estas mutações foram então utilizadas para análise de urina e plasma dos pacientes de ccRCC do presente estudo.

Para as amostras de ccRCC que não tiveram variante somática identificada no estudo anterior através de PAINEL CCR-28 (Meira, 2022), foi realizado o sequenciamento do painel *Comprehensive Cancer Panel* (CCP) (Thermo Fischer Scientific, EUA) que contém 409 genes encontrados frequentemente mutados em tumores sólidos em adultos (Apêndice 2), de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas na plataforma Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, EUA) utilizando o chip Ion 540.

3.7.3 Chamada de variantes somáticas em DNA de tecido tumoral

Para o sequenciamento do PAINEL TW-35 e do PAINEL CCP, as variantes nos DNAs de tumor e leucócito foram identificadas e anotadas usando o plugin *Ion Torrent Variant Caller* (Thermo Fischer Scientific, USA). Destas, possíveis variantes somáticas foram selecionadas através do software VarSeq (Golden Helix, USA) utilizando os seguintes critérios: I) variante presente em pelo menos 5% dos reads no DNA de tumor e ausente no DNA de leucócito, II) variantes não-sinônimas em regiões codificantes (SNVs ou INDELS), III) ausência em bancos de dados populacionais (ExAC, dbSNP, 1000genomes) ou minor allele frequency (MAF) $\leq 0,01$.

Variantes selecionadas foram visualmente verificadas utilizando o software IGV - *Integrative Genomics Viewer* (Broad Institute, USA).

Para a análise dos dados de sequenciamento de exoma, foi utilizado o pipeline de chamada de variante somática definido pelo software do GATK (Genome Analysis Toolkit) para alinhamento, pré-processamento e chamada de variantes. Foi feito o alinhamento dos arquivos FASTQ com o software BWA no modo MEM contra a sequência referência do genoma humano GRCh37 (hg19) e os BAMs foram pré-processados a partir do GATK. Foi utilizado o Mutect2 de forma pareada (amostras de tumor e de leucócito) para filtragem das variantes germinativas e identificação das variantes somáticas. As variantes foram então anotadas com os softwares snpEff e SnpSift (v4.3) utilizando os bancos de dados dbnsfp (v3.5) e ABRaOM (v1.0.2). Por fim, foram aplicados os *hard filters* descritos na documentação do GATK Best Practices, incluindo filtro de strand bias (OxOG). O arquivo VCF com as variantes que passaram em todos os filtros foi avaliado no software VarSeq (Golden Helix) para anotações adicionais e filtragem de variantes. As variantes identificadas foram filtradas seguindo os seguintes critérios: I) qualidade >30; II) DP (Read Depth) >10; III) AD (Allele Depth) >5; IV) AF (Allele Frequency) $\leq 0,01$ ou ausente; V) variante presente em pelo menos 5% dos reads no DNA de tumor e ausente no DNA de leucócito VI) variantes não-sinônimas em regiões codificantes (SNVs ou INDELS), VII) ausência em bancos de dados populacionais (ExAC, dbSNP, 1000genomes) ou minor allele frequency (MAF) $\leq 0,01$.

3.8 Detecção de tDNA em amostras plasma e urina

O sequenciamento dos DNAs de plasma e de urina foi feito pelo método PATS (do inglês “*personalized amplicon target sequencing*”) de forma personalizada para cada paciente. Pares de primers que geram amplicons de 100 bp até 160 bp foram desenhados com a ferramenta Primer3

([http:// http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0)) para amplificar a região específica da variante no DNA extraído de fluidos corpóreos, gerando um painel específico para cada paciente para ser utilizado nas amostras de DNAs de plasma e de urina. A reação de PCR foi realizada utilizando o Multiplex PCR Kit (QIAGEN, EUA). Os produtos amplificados foram verificados em gel de agarose 2%.

Para os casos de TW, os DNAs do sobrenadante e do sedimento de urina seguiram para confecção de bibliotecas separadas. Já para os casos de ccRCC, os DNAs de sedimento e de sobrenadante da mesma amostra de urina foram agrupados de forma equimolar, gerando somente 1 biblioteca de urina para cada amostra. Tanto para as bibliotecas de DNA de urina quanto de cfDNA de plasma, o input de DNA foi de pelo menos 2,5 ng. Para algumas amostras de TW onde havia material disponível, as reações foram realizadas em duplicata e os resultados foram apresentados como média da FA na **Tabela 12**. Os resultados individuais de cada replicata podem ser conferidos no Apêndice 7.

Para a construção das bibliotecas, foi utilizado o kit Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Thermo Fischer Scientific, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram sequenciadas utilizando o chip Ion PI™ ChipV3 ou 540 nas plataformas Ion Proton ou Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, USA).

Para o sequenciamento de *amplicon* das amostras de fluidos corpóreos, os arquivos BAM gerados após o sequenciamento foram carregados para visualização no software IGV - *Integrative Genomics Viewer* (Broad Institute, USA). As variantes somáticas previamente identificadas em cada paciente foram diretamente avaliadas no arquivo .BAM do sequenciamento de *amplicon* de seus respectivos DNAs de plasma e urina, e a frequência alélica da variante (FA) e a cobertura de sequenciamento foram anotadas. Para cada variante somática foi realizado também um controle negativo através do sequenciamento de amplicon de DNA de leucócito controle, definindo assim

o ruído da reação. O ruído de sequenciamento obtido para cada variante pode ser verificado no Apêndice 4.

As variantes somáticas detectadas em DNA de plasma e urina foram consideradas positivas seguindo os seguintes critérios: I) $FA \geq 2x$ a FA do ruído de sequenciamento para a variante somática específica; II) $FA \geq 0,5\%$. Para considerar uma amostra negativa para tDNA, o número mínimo de leituras da variante foi de 20.000x, número já estabelecido pelo grupo e que garante alta sensibilidade na detecção de tDNA em fluidos corpóreos.

3.9 Rastreamento de variantes germinativas patogênicas utilizando painéis multigênicos de genes de predisposição ao câncer.

Amostras de DNA constitutivo (de leucócito ou de tecido não neoplásico adjacente ao tumor) de pacientes com TW e com CCR foram avaliadas utilizando um painel customizado de 126 genes de predisposição ao câncer criado anteriormente no nosso grupo (de Carvalho, 2022). Os genes deste painel encontram-se listados no Apêndice 2.

Foi adotada uma estratégia de pools de amostras com o intuito de reduzir os custos do sequenciamento e aumentar a quantidade de amostras analisadas. Essa estratégia permite a detecção de variantes germinativas com alta qualidade por meio de uma abordagem de amostragem em pools bidimensionais, semelhante ao método descrito por (Zuzarte et al. 2014). Resumidamente, esse método consiste em distribuir individualmente o DNA dos pacientes em placas de 96 poços e combiná-los em duas dimensões: uma considerando as linhas da placa, gerando 8 pools, e outra considerando as colunas, gerando 12 pools. No total, são gerados 20 pools que serão sequenciados para as 96 amostras. Essa estratégia bidimensional possibilita a identificação precisa das variantes presentes em cada paciente, pois a mesma variante é

detectada em um pool de linha e um de coluna, permitindo a identificação do paciente de acordo com o mapeamento das amostras na placa.

Cada um dos pools de linhas ou colunas seguiram para a construção da biblioteca e enriquecimento dos genes de interesse. O DNA genômico foi fragmentado por digestão enzimática e ligado a adaptadores e barcodes específicos com o kit QIAseq FX DNA Library Kit (Qiagen). A captura das regiões alvo foi realizada através de hibridização com sondas biotinizadas (xGen Gene Capture Pools - IDT Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado na plataforma NextSeq 500 (Illumina), utilizando os kits NextSeq 500/550 High Output Kit v2 (300 cycles) ou NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2 (300 cycles), visando obter uma cobertura mínima de 200X para 100% das bases alvo em cada biblioteca. Uma cobertura de 200x garante que, considerando um pool equimolar, todas as amostras do pool estejam bem representadas. Quando a cobertura é dividida pelo número de amostras em cada pool, pelo menos 25 leituras (para os pools de coluna, com 8 amostras) e aproximadamente 16 leituras (para pools de linha, com 12 amostras) estão presentes para cada indivíduo representado no pool.

3.9.1 Interpretação e classificação das variantes germinativas

Após o sequenciamento do painel de 126 genes, a ferramenta Isaac Enrichment v2.1, disponível no aplicativo BaseSpace (Illumina), foi utilizada para realizar o alinhamento e as chamadas variantes. As variantes identificadas foram anotadas e filtradas no software VarSeq (Golden Helix). Foram aplicados filtros específicos para seleção de variantes germinativas raras: I) Qualidade ≥ 30 ; II) cobertura da base $\geq 30X$; III) FA $\geq 25\%$; IV) frequência populacional [MAF] $\leq 0,02$ ou ausente nos bancos de dados populacionais (ExAC, ESP, 1000genomes). Foram

selecionadas apenas variantes em regiões codificantes ou em regiões adjacentes aos limites éxon-íntron (até 10 bp intrônicos). As variantes detectadas no estudo foram avaliadas quanto à sua classificação em bancos de dados e ferramentas de classificação clínica de variantes (ClinVar, VarSome) e foram classificadas segundo os critérios sugeridos pelo American College of Medical Genetics (ACMG) (Richards et al. 2015).

3.10 Validação de variantes somáticas e de variantes germinativas

Para a validação das variantes somáticas identificadas no DNA de tumor e das variantes germinativas identificadas em DNA de leucócito ou de tecido não neoplásico foi realizado o sequenciamento de amplicon por NGS (*Deep Amplicon Sequencing*) utilizando 10 ng de DNA genômico de leucócito ou de tecido não neoplásico e, para as variantes somáticas, também foi avaliado o DNA genômico de tecido tumoral congelado. A validação foi realizada através de sequenciamento de amplicon por NGS após PCR multiplex usando primers específicos para a região da variante. A reação de PCR multiplex foi feita utilizando o Multiplex PCR Kit (QIAGEN, EUA) conforme as instruções do fabricante. O produto seguiu para ligação de adaptadores e barcodes utilizando o kit Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Thermo Fischer Scientific, USA) e foi sequenciado na plataforma ION Proton ou Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, EUA).

Os arquivos BAM gerados após o sequenciamento foram carregados para visualização no software IGV - *Integrative Genomics Viewer* (Broad Institute, USA) para a confirmação da variante.

3.11 Análise cromossômica por microarranjo genômico (Chromosome Microarray Analysis - CMA)

A análise de alterações cromossômicas foi realizada em um único caso de TW do presente estudo, onde não houve variante somática identificada através do sequenciamento dos genes do PAINEL TW-35 e nem através do sequenciamento de exoma.

Foi realizada a investigação de alterações cromossômicas submicroscópicas por microarranjo genômico com a plataforma de Oligonucleotide Array-Based CGH (Agilent Technologies – California, EUA), contendo 180.000 sondas (180K). O procedimento e a análise foram realizados pela Dra. Silvia Souza da Costa, técnica especializada do Laboratório de Genética Humana do IBUSP, sob supervisão da Dra. Ana Krepischi.

Na análise, foram utilizados os programas Genomic Workbench (Agilent Technologies – California, EUA) e Nexus Copy Number (Biodiscovery), considerando apenas alterações de no mínimo três sondas consecutivas e com \log_2 teste/controlado $\geq 0,3$ para ganhos e $\leq -0,3$ para perdas. CNVs comuns, descritas em três ou mais estudos realizados em população controle depositados no banco de dados Database of Genomic Variants – DGV (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), foram desconsideradas.

3.12 Análise estatística

Foram realizadas análises de associação entre a detecção de tDNA em amostras de DNA de plasma e de urina e progressão de doença (ocorrência de metástase, recaída ou morte pela doença), variáveis clínicas e variáveis patológicas.

Para a análise de associação dos casos de ccRCC, os resultados das amostras de plasma e urina M1 (coletados de 6 a 8 semanas pós cirurgia) e M2 (6 meses pós cirurgia) foram agrupadas como M1+M2 (1º ano após a cirurgia) e os resultados das amostras M3 (18 meses pós cirurgia) e M4 (30 meses pós cirurgia) foram agrupadas como amostras M3+M4 (2º ano em diante), visando uma melhor análise ao aumentar o n para cada momento de coleta. Para a análise dos casos de TW, os resultados das amostras de sedimento e sobrenadante de urina foram agrupados como “URINA”, sendo considerado positivo para tDNA o agrupamento onde ao menos um dos dois componentes é positivo para tDNA.

Para avaliar a associação entre variáveis qualitativas, foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando apropriado. Para comparar variáveis qualitativas em relação à distribuição de variáveis quantitativas, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado. O estimador de Kaplan-Meier foi considerado para estimar as curvas de sobrevida livre de progressão e sobrevida global e a comparação dos grupos em relação à sobrevida foi realizada pelo teste de log-rank. O nível de significância adotado foi de 5% e as análises estatísticas foram realizadas por meio do software SPSS versão 28 e do GraphPad v9.5.1. Os testes foram realizados pelo departamento de Estatística do A.C.Camargo Cancer Center.

Para cada caso de TW e de ccRCC foi definido um status de progressão de doença positivo ou negativo, considerando positivo os pacientes que tiveram recaída, metástase ou óbito. Para os casos de TW, as variáveis patológicas analisadas foram:

- Subtipo tumoral (blastema / outros subtipos)
- Estadiamento tumoral (I ou II / III, IV ou V)
- Risco (intermediário / alto)
- Multifocalidade (ausente / presente)
- Anaplasia (ausente / presente)

- Necrose tumoral (ausente / presente)
- Infiltração de cápsula renal (ausente / presente)
- Infiltração de tecido peri-renal (ausente / presente)
- Infiltração de seio renal (ausente / presente)
- Infiltração microscópica sanguínea (ausente / presente)
- Infiltração microscópica linfática

Na casuística não havia casos de baixo risco; com infiltração de ureter, artéria renal e veia renal; com infiltração microscópica perineural; com margens cirúrgicas comprometidas. Sendo assim, estas variáveis não foram analisadas.

Para os casos de ccRCC, as variáveis patológicas analisadas foram:

- Tamanho do tumor (maior eixo, em cm)
- Componente sarcomatóide (ausente / presente)
- Componente rabdóide (ausente / presente)
- Infiltração de cápsula renal (ausente / presente)
- Infiltração de gordura peri-renal (ausente / presente)
- Invasão microscópica sanguínea (ausente / presente)
- Invasão microscópica linfática (ausente / presente)
- Invasão microscópica perineural (ausente / presente)
- Estadiamento patológico (pT1 e pT2 / pT3)
- Gradação ISUP (1-3 / 4)
- Necrose tumoral (ausente / presente)
- Margens cirúrgicas (livres / comprometidas)

3.13 Aprovação do projeto

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do A.C.Camargo Cancer Center sob o número 2559/18 (Anexos 1, 2, 3 e 4) e 2397/17 (Meira, 2022) (Anexos 5 e 6).

4. RESULTADOS

4.1 Elaboração do painel de genes frequentemente mutados em TW

Para a seleção dos genes mais frequentemente mutados em TW, foram avaliados 13 estudos, incluindo dados obtidos anteriormente em nosso grupo (Torrezan e Ferreira et al. 2014; Miguez et al. 2020). Os estudos selecionados encontram-se listados na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Bibliografia utilizada para seleção de genes e mapeamento de mutações.

Título	Autores	Ano	Revista	Tipo de seq.	n
An X chromosome gene, <i>WTX</i> , is commonly inactivated in Wilms tumor.	Rivera et al	2007	Science	Target	51
Wilms tumor genetics: mutations in <i>WT1</i> , <i>WTX</i> , and <i>CTNNB1</i> account for only about one-third of tumors.	Ruteshouser et al	2008	Genes Chromosomes Cancer	Target	125
Subtype-specific <i>FBXW7</i> mutation and <i>MYCN</i> copy number gain in Wilms' tumor.	Williams et al	2010	Clin Cancer Res	Target	99
<i>WT1</i> , <i>WTX</i> and <i>CTNNB1</i> mutation analysis in 43 patients with sporadic Wilms' tumor.	Cardoso et al	2013	Oncol Rep	Target	43
Biallelic <i>DICER1</i> mutations occur in Wilms tumours.	Wu et al	2013	J Pathol	Target	191
Recurrent somatic mutation in <i>DROSHA</i> induces microRNA profile changes in Wilms tumour.	Torrezan et al	2014	Nat Commun	Target e WES	66
Somatic mutations in <i>DROSHA</i> and <i>DICER1</i> impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours.	Rakheja et al	2014	Nat Commun	WES	15

Recurrent <i>DGCR8</i> , <i>DROSHA</i> , and <i>SIX</i> homeodomain mutations in favorable histology Wilms tumors.	Walz et al	2015	Cancer Cell	Target	77
Mutations in the <i>SIX1/2</i> pathway and the <i>DROSHA/DGCR8</i> miRNA microprocessor complex underlie high-risk blastemal type Wilms tumors.	Wegert et al	2015	Cancer Cell	WES	58
Chromosomal anomalies at 1q, 3, 16q, and mutations of <i>SIX1</i> and <i>DROSHA</i> genes underlie Wilms tumor recurrences.	Spreafico et al	2016	Oncotarget	Target	8
A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor.	Gadd et al	2017	Nat Genet	WES/WGS	117
Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours	Xiaotu et al	2018	Nature	WES/WGS	128
Assessment of somatic mutations in urine and plasma of Wilms tumor patients	Miguez et al	2020	Cancer Med	Target e WES	6

Fonte: autoria própria.

Legenda: *Target*, sequenciamento de genes específicos; *WES*, sequenciamento de exoma; *WGS*, sequenciamento de genoma completo.

No total, estes estudos apresentam dados de 978 amostras de TW, sendo 318 por sequenciamento completo de exoma (*WES*, do inglês “*whole exome sequencing*”) ou genoma (*WGS*, do inglês “*whole genome sequencing*”) e 660 por sequenciamento de genes específicos (*target*).

TP53 foi o gene mais mutado nestes estudos, apresentando variantes somáticas em 63 (14,75%) das 427 amostras de TW que tiveram esse gene avaliado, seguido por *DROSHA*, com 59 (11,75%) das 502 amostras avaliadas. O estudo de Gadd et al. (2017) avaliou uma casuística de TW enriquecida para casos de alto risco, com anaplasia, e para casos de baixo risco que apresentaram recidiva. TW com anaplasia costuma apresentar variante somática em *TP53*, o que justifica o alto número de casos com *TP53* mutado neste estudo. Os outros genes selecionados encontram-se listados na **Tabela 7** e na **Figura 6**.

Num trabalho anterior do grupo, dois genes foram identificados como mutados no caso de prova de conceito de biópsia líquida para TW (caso TW01, também presente neste estudo), *INTS1* e *TNRC18* (Miguez et al. 2020). Foi realizado o sequenciamento paralelo de 37 amostras

de TW utilizando um painel contendo a região codificante destes 2 genes, revelando 2 amostras com variante somática no *INTS1* (2/37, 2,7%) e 3 amostras mutadas no *TNRC18* (3/37, 8,1%) (Miguez, 2018). Ao somar a estes dados os outros casos de TW na literatura encontrados mutados nestes genes, temos que o gene *INTS1* está mutado em 1,1% dos TW (4/359) e o gene *TNRC18* em 2,5% (9/359) (**Tabela 8**). *TNRC18* é um gene ainda pouco caracterizado, mas evidências apontam que ele exerce atividade no processo de silenciamento da cromatina e que é expresso principalmente no tecido renal (Fagerberg et al. 2014). Já o *INTS1* media o processamento da região 3' dos pequenos RNAs nucleares U1 e U2, mediando o processamento das moléculas de RNA mensageiro (Baillat et al. 2005). Estes dois genes participam de vias relacionadas à regulação transcricional e pós transcricional, vias sabidamente relacionadas ao TW.

Tabela 7 - Variantes somáticas identificadas nos principais genes dos trabalhos avaliados.

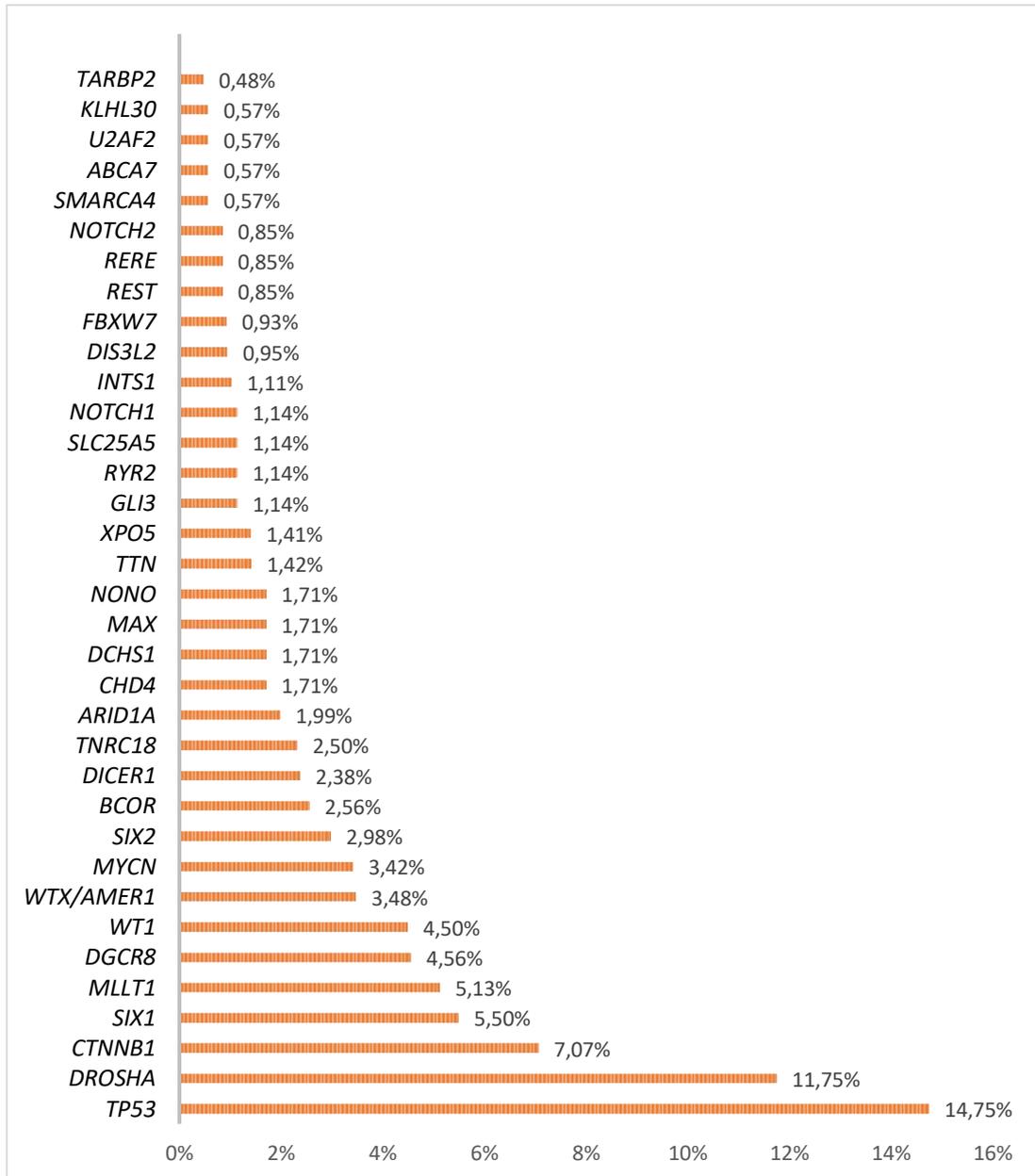
Referência	Torrezan 2014	Gadd 2017	Wegert 2015	Rakheja 2014	Miguez et al, 2020	Miguez et al, 2020	Miguez et al, 2020	Walz 2015	Spreafico 2016	Rivera 2007	Cardoso 2013	Williams 2010	Williams 2010	Ruteshouser 2008	Xiaotu 2018	
Abordagem utilizada	TARGET	WES/WGS	WES	WES	TARGET 1	WES	TARGET 2	TARGET	TARGET	TARGET	TARGET	TARGET (1)	TARGET (2)	TARGET	WES/WGS	
n avaliado	66	117	58	15	2	4	37	77	8	51	43	87	12	125	128	
Gene	Número de amostras mutadas em cada estudo														% casos mutados	
<i>DROSHA</i>	13	13	2	6		1		8	7						9	11,75
<i>DGCR8</i>	6	4	6	0	0	0		3	0						4	4,56
<i>XPO5</i>	1	3	0	0	0	0		1							2	1,41
<i>DICER1</i>	3	4	0	2	0	0		1	0						2	2,38
<i>TARBP2</i>	2	0	0	0	0	0									0	0,48
<i>CTNNB1</i>	5	7	1	6	2	0			2	9	3	2			6	7,07
<i>TP53</i>	2	28	5	3	0	0			1						24	14,75
<i>WT1</i>	5	7	1	4	0	0			0	2	0		1		4	4,50
<i>WTX/AMER1</i>	3	0	0	0	1	0			0	7	0			4	6	3,48

DIS3L2	2	1	0	0	0	0	1	0,95
FBXW7	2	0	1	0	0	0	1	0,93
INTS1	0	1	0	1	2		0	1,11
TNRC18	2	1	0	1	3		2	2,50
SIX1	5	4	0	0	4	7	4	5,50
SIX2	4	2	0	0	4	0	3	2,98
MYCN	3	3	2	0			4	3,42
SMARCA4	0	0	2	0			0	0,57
ARID1A	3	0	2	0			2	1,99
ABCA7	0	2	0	0			0	0,57
CHD4	2	2	0	0			2	1,71
GLI3	0	2	0	0			2	1,14
REST	1	2	0	0			0	0,85
RYR2	1	2	0	0			1	1,14
TTN	0	2	0	0			3	1,42
U2AF2	0	2	0	0			0	0,57
DCHS1	0	4	0	0			2	1,71
RERE	0	2	1	0			0	0,85
BCOR	5	0	0	0			4	2,56
MLLT1	10	0	0	0			8	5,13
MAX	3	1	0	0			2	1,71
NONO	3	0	0	0			3	1,71
KLHL30	0	1	0	1			0	0,57
SLC25A5	0	0	3	0			1	1,14
NOTCH1	0	0	3	0			1	1,14
NOTCH2	0	0	3	0			0	0,85

Fonte: autoria própria.

Legenda: Target (1), somente o gene *CTNNB1* foi analisado em uma coorte de 87 amostras em Williams et al. 2010; Target (2), somente os genes *WT1* e *FBXW7* foram analisados em uma coorte de 12 amostras em Williams et al. 2010.

Mutações hotspots importantes se destacaram, como em *TP53* (p.R342*/P, em 2,3% das amostras), *DROSHA* (p.E1147K, em 4% das amostras), *CTNNB1* (p.S45C/F/P/Y/del, em 2,5% das amostras), *SIX1* e *SIX2* (p.Q177R em 4,6% e 2,3% das amostras, respectivamente), *MLLT1* (p.117_118insNHL, em 1,4% das amostras), *DGCR8* (p.E518K, em 2,6% das amostras), *WTX* (p.R358*, em 0,8% das amostras), *MYCN* (p.P44L/T, em 3,4% das amostras) e *MAX* (p.R60Q, em 1,7% das amostras).



Fonte: autoria própria.

Figura 6 - Genes mais mutados em TW, segundo levantamento bibliográfico.

Esse estudo gerou um painel com 35 genes frequentemente mutados em TW, chamado PAINEL TW-35 (Apêndices 2 e 3), com cobertura horizontal de 65,79Kb. Este painel pode ser usado tanto em DNA genômico quanto em amostras de urina e plasma, sendo adequado para *cell free DNA* (cfDNA) ao gerar amplicons de 125bp a 140bp. Em comparação ao painel de genes mutados em TW desenvolvido anteriormente pelo grupo (Torrezan et al. 2014), foram incluídos

23 novos genes (**Tabela 8**) que apresentam funções no desenvolvimento embrionário, na regulação transcricional e pós transcricional, entre outros.

Tabela 8 - Funções dos genes incluídos no novo PAINEL TW-35.

Gene	% mutado	Via Wnt	Desenv. embrionário	Regulação transcricional e pós transcricional	Outras vias
TP53 (FL)	14,75	X			
DROSHA (FL)	11,75			X	
CTNNB1 (P)	7,07	X			
SIX1 (H)	5,5		X		
MLLT1 (P)	5,13			X	
DGCR8 (P)	4,56			X	
WT1 (FL)	4,5		X		
WTX/AMER1 (P)	3,48	X			
MYCN (H)	3,42		X		
SIX2 (H)	2,98		X		
BCOR (P)	2,56			X	
DICER1 (P)	2,38			X	
TNRC18 (P)	2,32			X	
ARID1A (P)	1,99			X	
CHD4 (P)	1,71			X	
DCHS1 (P)	1,71				X
MAX (H)	1,71			X	
NONO (H)	1,71			X	
TTN (P)	1,42				X
XPO5 (P)	1,41			X	
GLI3 (P)	1,14		X	X	
RYR2 (P)	1,14		X		X
SLC25A5 (P)	1,14				X
NOTCH1 (P)	1,14		X		
INTS1 (P)	1,03			X	
DIS3L2 (P)	0,95				
FBXW7 (P)	0,93			X	
REST (FL)	0,85		X	X	
RERE (P)	0,85		X	X	
NOTCH2 (P)	0,85		X		
SMARCA4 (P)	0,57			X	
ABCA7 (P)	0,57				X
U2AF2 (H)	0,57			X	
KLHL30 (P)	0,57				X
TARBP2 (P)	0,5			X	

Fonte: autoria própria.

Legenda: Em vermelho: genes novos, que não estavam presentes no painel de Torrezan e Ferreira et al. 2014; (FL), Full length; (P), Parcial; (H), Hotspot.

A capacidade deste novo painel para a identificação de variantes somáticas em amostras de TW foi avaliada através do sequenciamento de 14 amostras aleatórias pareadas (DNA de tumor e de leucócito) e 4 amostras aleatórias de tumor isoladas (amostras com prefixo COG, utilizadas em estudos anteriores do nosso grupo) usando o novo PAINEL TW-35 e também o painel desenvolvido anteriormente (Torrezan e Ferreira et al. 2014).

Com o novo painel foi possível identificar variantes somáticas em 11 das 18 amostras (61,1%), sendo que no painel anterior 4 dessas amostras tiveram variantes confirmadas como somáticas (22,2%) (**Tabela 9**). No caso P-TW-32, que apresentou variantes somáticas em *CTNNB1* e *WTX* identificadas pelo Painel de Torrezan et al. (2014), a variante em *WTX* c.1057G>T não foi detectada com o painel TW-35 devido à região correspondente não ter sido coberta por este novo painel dada a sua composição de primers.

Tabela 9 - Variantes somáticas identificadas em amostras de TW através do sequenciamento dos genes do painel anterior (Torrezan et al. 2014) e do novo PAINEL TW-35.

Painel Torrezan et al. (2014)					PAINEL TW-35			
Amostra	Gene	cDNA	Proteína	FA	Gene	cDNA	Proteína	FA
P-TW-01	<i>CTNNB1</i>	c.134C>T	p.Ser45Phe	55%	<i>CTNNB1</i>	c.134C>T	p.Ser45Phe	45%
P-TW-04								
P-TW-12	<i>DROSHA</i>	c.3439G>A	p.Glu1147Lys	35%	<i>DROSHA</i>	c.3439G>A	p.Glu1147Lys	35%
P-TW-15					<i>TNRC18</i>	c.1505C>T	p.Pro502Leu	47%
P-TW-15					<i>GLI3</i>	c.4609C>T	p.Arg1537Cys	50%
P-TW-15					<i>NOTCH1</i>	c.6853G>A	p.Val2285Ile	51%
P-TW-19					<i>MYCN</i>	c.131C>T	p.Pro44Leu	16%
P-TW-20								
P-TW-21								
P-TW-26					<i>INTS1</i>	c.2257G>A	p.Gly753Ser	44%
P-TW-26					<i>TNRC18</i>	c.3499del	p.Glu1167Argfs*40	49%
P-TW-27								
P-TW-28					<i>MYCN</i>	c.131C>T	p.Pro44Leu	47%
P-TW-32	<i>CTNNB1</i>	c.1149G>T	p.Trp383Cys	47%	<i>CTNNB1</i>	c.1149G>T	p.Trp383Cys	45%
P-TW-32	<i>WTX</i>	c.1057G>T	p.Arg353*	49%				
P-TW-35	<i>DROSHA</i>	c.3665A>G	p.Glu1222Gly	32%	<i>DROSHA</i>	c.3665A>G	p.Glu1222Gly	50%
P-TW-35					<i>KLHL30</i>	c.1253C>A	p.Ala418Asp	45%
P-TW-35					<i>SIX1</i>	c.530A>G	p.Gln177Arg	51%
COG246					<i>SIX2</i>	c.530A>G	p.Gln177Arg	51%
COG1060					<i>NOTCH2</i>	c.6094C>A	p.His2032Asn	49%
COG1060					<i>RYR2</i>	c.5120T>C	p.Ile1707Thr	31%

COG2113	
COG420	<i>NOTCH2</i> c.6223G>A p.Val2075Met 50%
TW09	
TW10	
Total:	4/18 amostras (22,2%) 11/18 amostras (61,1%)

Fonte: autoria própria.

Legenda: FA, frequência alélica da variante.

4.2 Detecção de DNA tumoral em amostras de plasma e urina de pacientes com tumor de Wilms

4.2.1 Casuística de TW

No presente estudo foram incluídos 6 pacientes avaliados anteriormente no nosso estudo de prova de conceito (TW01-TW06) (Miguez et al. 2020) e 4 novos pacientes recrutados durante a vigência do presente estudo (TW09-TW14), totalizando 10 casos. Destes, um é oriundo da colaboração com a Rede D'Or (TW11) (Tabela 10).

A média de idade dos pacientes recrutados é de 38 meses (3 anos e 2 meses) no momento do diagnóstico, variando de 8 meses a 5 anos e 11 meses. Nove casos são do sexo feminino (90%) e 1 é do sexo masculino (10%).

Tabela 10 - Informações gerais sobre os pacientes com TW recrutados para a análise de biópsia líquida.

Variável	Categoria	n	(%)
Sexo	Masculino	1	10,0%
	Feminino	9	90,0%
Risco	Baixo	0	0,0%
	Intermediário	8	80,0%
	Alto	2	20,0%
Subtipo	Regressivo	1	10,0%
	Misto	4	40,0%
	Epitelial	0	0,0%
	Estromal	2	20,0%

	Blastema	3	30,0%
Estadiamento	I	2	20,0%
	II	3	30,0%
	III	2	20,0%
	IV	2	20,0%
	V	1	10,0%

Fonte: autoria própria.

Quatro pacientes (40%) apresentaram metástase pulmonar, sendo 3 ao diagnóstico e 1 nove meses após o diagnóstico de TW. Dos 3 casos com metástase ao diagnóstico, um (TW04) foi a óbito por complicações da doença. O caso TW14 teve ruptura tumoral pré-operatória. Já o caso TW03 é de TW bilateral metacrônico, onde o 1º tumor foi tratado anteriormente em outra instituição.

As características clínicas e anatomopatológicas de cada paciente encontram-se no Apêndice 5.

4.2.2 Identificação de variante somática no TW

Foi possível identificar ao menos uma variante somática em 9 dos 10 casos recrutados (9/10, 90%) (**Tabela 11**), sendo 7 em genes do PAINEL TW-35 (7/10, 70%) e 1 através de seq. de exoma (1/10, 10%). Um dos casos teve variantes somáticas identificadas através de ambos os métodos (TW03). *WTX*, *SIX1* e *CTNNB1* foram os genes mais mutados, presentes em 2 casos cada (2/10, 20%).

O caso TW02 não teve variante somática identificada nem mesmo após sequenciamento de exoma. Para este caso, foi realizada uma investigação de alterações cromossômicas submicroscópicas por microarranjo genômico através de parceria com o Laboratório de Genética Humana do IBUSP, sob supervisão da Dra. Ana Krepischi. Os resultados foram negativos para

alterações cromossômicas (Apêndice 6) e esta paciente continua sob análise.

Para o caso TW1, conforme relatado anteriormente (Miguez et al. 2020), além do DNA do tumor primário também foi avaliado o DNA do tecido tumoral da metástase pulmonar, onde foram encontradas duas novas variantes somáticas nos genes *KRT80* e *TTI1*, além das mutações previamente identificadas no TW em *INTS1* e *TNRC18* (Tabela 12).

Tabela 11 - Variantes somáticas identificadas no tumor de Wilms através de sequenciamento do PAINEL TW-35 ou de WES.

ID	Tecido analisado	Gene	cDNA change	Protein change	Tipo	FA (%)	Método
TW01	TW/meta	<i>INTS1</i>	c.2257G>A	p.Gly753Ser	Missense	50%/85,19%	PAINEL TW-35
TW01	TW/meta	<i>TNRC18</i>	c.3499del	p.Glu1167Argfs*40	Frameshift del	37,29%/87,50%	PAINEL TW-35
TW01	Meta	<i>KRT80</i>	c.932C>T	p.Ser311Phe	Missense	38,80%	WES
TW01	Meta	<i>TTI1</i>	c.1516G>A	p.Asp506Asn	Missense	38,75%	WES
TW02	TW	-	-	-	-	-	-
TW03	TW	<i>DROSHA</i>	c.3665A>G	p.Glu1222Gly	Missense	32,00%	PAINEL TW-35 /WES
TW03	TW	<i>SUPT7L</i>	c.1217G>A	p.Arg406His	Missense	43,81%	WES
TW03	TW	<i>KLHL30</i>	c.1253C>A	p.Ala418Asp	Missense	47,56%	WES
TW03	TW	<i>EIF4G1</i>	c.2843C>T	p.Thr948Ile	Missense	39,39%	WES
TW03	TW	<i>RAD50</i>	c.3835C>T	p.Arg1279Cys	Missense	29,52%	WES
TW03	TW	<i>TMED9</i>	c.208_209del	p.Asp70Glnfs*47	Frameshift del	50,00%	WES
TW03	TW	<i>MTA2</i>	c.187G>T	p.Ala63Ser	Missense	53,01%	WES
TW03	TW	<i>PPP2R1A</i>	c.547C>T	p.Arg183Trp	Missense	55,00%	WES
TW04	TW	<i>SERBP1</i>	c.1117C>T	p.Arg373Ter	Nonsense	97,26%	WES
TW04	TW	<i>WTAP</i>	c.485G>A	p.Arg162Gln	Missense	98,63%	WES
TW04	TW	<i>PHF5A</i>	c.305G>A	p.Arg102His	Missense	97,22%	WES
TW05	TW	<i>CTNNB1</i>	c.1147T>G	p.Trp383Gly	Missense	48,60%	PAINEL TW-35
TW06	TW	<i>CTNNB1</i>	c.1149G>T	p.Trp383Cys	Missense	47,30%	PAINEL TW-35
TW06	TW	<i>WTX</i>	c.1057C>T	p.Arg353*	Nonsense	45,80%	PAINEL TW-35
TW09	TW	<i>PIK3CA</i>	c.2740G>A	p.Gly914Arg	Missense	23,00%	WES
TW09	TW	<i>BTK</i>	c.391+8T>C	-	Splice region	18,00%	WES
TW11	TW	<i>WT1</i>	c.1495delG	p.Ala499Profs*6	Frameshift del	89,64%	PAINEL TW-35
TW12	TW	<i>WTX</i>	c.565C>T	p.Gln189Ter	Nonsense	93,78%	PAINEL TW-35
TW12	TW	<i>SIX1</i>	c.530A>G	p.Gln177Arg	Missense	43,77%	PAINEL TW-35
TW14	TW	<i>SIX1</i>	c.530A>G	p.Gln177Arg	Missense	30,85%	PAINEL TW-35
TW14	TW	<i>DGCR8</i>	c.1552G>A	p.Glu518Lys	Missense	79,10%	PAINEL TW-35

Fonte: autoria própria.

Legenda: Meta, metástase (TW01); WES, sequenciamento de exoma completo; FA, fração alélica da variante; TW, tumor de Wilms.

4.2.3 Detecção de tDNA em plasma e urina dos casos com TW

Dos 9 casos com variante somática identificada no tumor, todos foram tDNA positivos em ao menos um fluido corpóreo baseline, coletado antes do início do tratamento, sendo 6 no plasma (6 de 8 avaliados, 75%) e 3 nos componentes da urina (3 de 7 avaliados, 43%).

Os fluidos corpóreos M1, coletados após o término da quimioterapia neoadjuvante, foram tDNA positivos em 5 dos 7 casos avaliados (5/7, 71%), sendo 5 no plasma (5/7, 71%) e 4 no sobrenadante da urina (4/6, 67%). Todos os casos foram negativos para tDNA nas amostras de sedimento de urina M1.

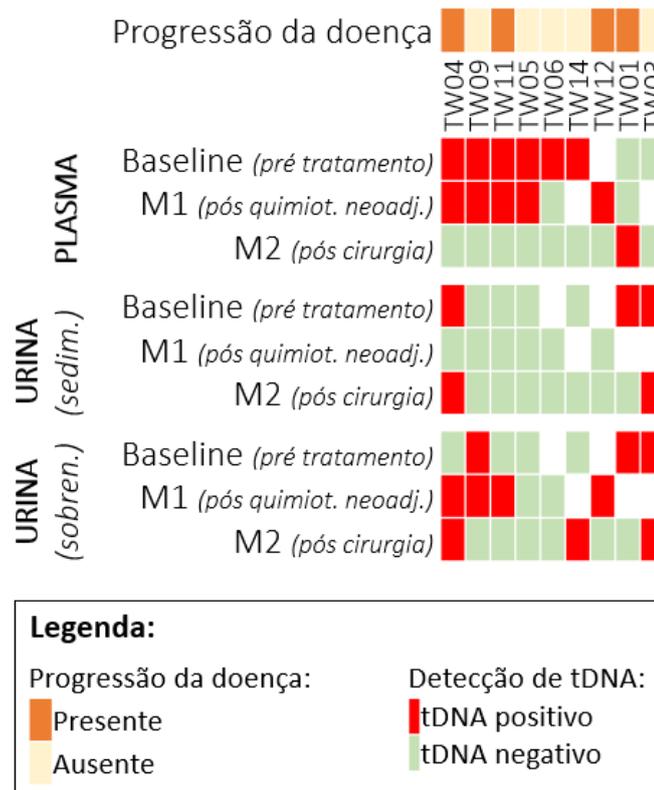
Quanto aos fluidos corpóreos M2, coletados após a cirurgia para remoção do rim afetado, 4 dos 9 casos avaliados foram tDNA positivos (4/9, 44%), sendo 1 no plasma (1/9, 11%), 2 no sedimento da urina (2/9, 22%) e 3 no sobrenadante da urina (3/9, 33%). Os resultados da detecção de tDNA nas amostras de plasma e urina encontram-se na **Tabela 12** e na **Figura 7**. Para algumas amostras o experimento foi realizado em duplicata (2 bibliotecas diferentes para a mesma amostra de DNA). Na **Tabela 12** consta a média da FA obtida nas replicatas e os resultados individuais de cada replicata podem ser verificados no Apêndice 7.

Tabela 12 - Variantes somáticas detectadas em amostras de plasma e componentes da urina de pacientes com TW.

Variante somática					Baseline (antes do início do tratamento)			M1 (após quimioterapia neoadjuvante)			M2 (após cirurgia)		
ID	Gene	cDNA change	Protein change	FA TW (%)	Plasma	Sed. Urina	Sobr. Urina	Plasma	Sed. Urina	Sobr. Urina	Plasma	Sed. Urina	Sobr. Urina
TW01	INTS1	c.2257G>A	p.Gly753Ser	50,00%	ND	46,00%	28,00%	ND	NC	NC	ND	ND	ND
TW01	TNRC18	c.3499del	p.Glu1167Argfs*40	37,29%	ND	47,00%	ND	ND	NC	NC	ND	ND	ND
TW01	KRT80	c.932C>T	p.Ser311Phe	38,80% (meta)	ND	ND	ND	ND	NC	NC	ND	ND	ND
TW01	TTI1	c.1516G>A	p.Asp506Asn	38,75% (meta)	ND	2,20%	ND	ND	NC	NC	2,60%	ND	ND
TW03	DROSHA	c.3665A>G	p.Glu1222Gly	32,00%	ND	*ND	ND	NC	NC	NC	ND	*ND	ND
TW03	SUPT7L	c.1217G>A	p.Arg406His	43,81%	ND	*ND	ND	NC	NC	NC	ND	*ND	ND
TW03	KLHL30	c.1253C>A	p.Ala418Asp	47,56%	ND	*ND	ND	NC	NC	NC	ND	*ND	ND
TW03	EIF4G1	c.2843C>T	p.Thr948Ile	39,39%	ND	*10,27%	20,13%	NC	NC	NC	ND	*5,37%	7,64%
TW03	RAD50	c.3835C>T	p.Arg1279Cys	29,52%	ND	*ND	ND	NC	NC	NC	ND	*ND	ND
TW03	TMED9	c.208_209del	p.Asp70Glnfs*47	50,00%	ND	*ND	ND	NC	NC	NC	ND	*ND	ND
TW03	MTA2	c.187G>T	p.Ala63Ser	53,01%	ND	*ND	ND	NC	NC	NC	ND	*ND	ND
TW03	PPP2R1A	c.547C>T	p.Arg183Trp	55,00%	ND	*ND	ND	NC	NC	NC	ND	*ND	ND
TW04	SERBP1	c.1117C>T	p.Arg373Ter	97,26%	*ND	ND	ND	*ND	ND	ND	ND	ND	ND
TW04	WTAP	c.485G>A	p.Arg162Gln	98,63%	*72,78%	2,24%	ND	*91,9%	ND	3,00%	ND	ND	ND
TW04	PHF5A	c.305G>A	p.Arg102His	97,22%	*65,39%	5,79%	ND	*86,05%	ND	7,60%	ND	1,00%	6,95%
TW05	CTNNB1	c.1147T>G	p.Trp383Gly	48,60%	29,17%	ND	ND	2,35%	ND	ND	ND	ND	ND
TW06	CTNNB1	c.1149G>T	p.Trp383Cys	47,30%	2,75%	NC	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TW06	WTX	c.1057C>T	p.Arg353*	45,80%	10,58%	NC	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TW09	PIK3CA	c.2740G>A	p.Gly914Arg	23,00%	4,44%	ND	15,22%	2,25%	ND	1,32%	ND	ND	ND
TW09	BTK	c.391+8T>C	-	18,00%	2,84%	ND	5,14%	2,23%	ND	ND	ND	ND	ND
TW11	WT1	c.1495delG	p.Ala499Profs*6	89,64%	16,50%	ND	ND	68,73%	ND	2,60%	ND	ND	ND
TW12	WTX	c.565C>T	p.Gln189Ter	93,78%	NC	NC	NC	82,47%	ND	2,99%	ND	ND	ND
TW12	SIX1	c.530A>G	p.Gln177Arg	43,77%	NC	NC	NC	1,04%	ND	ND	ND	ND	ND
TW14	SIX1	c.530A>G	p.Gln177Arg	30,85%	15,84%	ND	ND	NC	NC	NC	ND	ND	0,90%
TW14	DGCR8	c.1552G>A	p.Glu518Lys	79,10%	44,48%	ND	ND	NC	NC	NC	ND	ND	ND

Fonte: autoria própria.

Legenda: FA, fração alélica da variante; ND, não detectado; NC, não coletado; meta, FA na metástase pulmonar; *, média do valor de FA obtido em duplicatas (Apêndice 7).



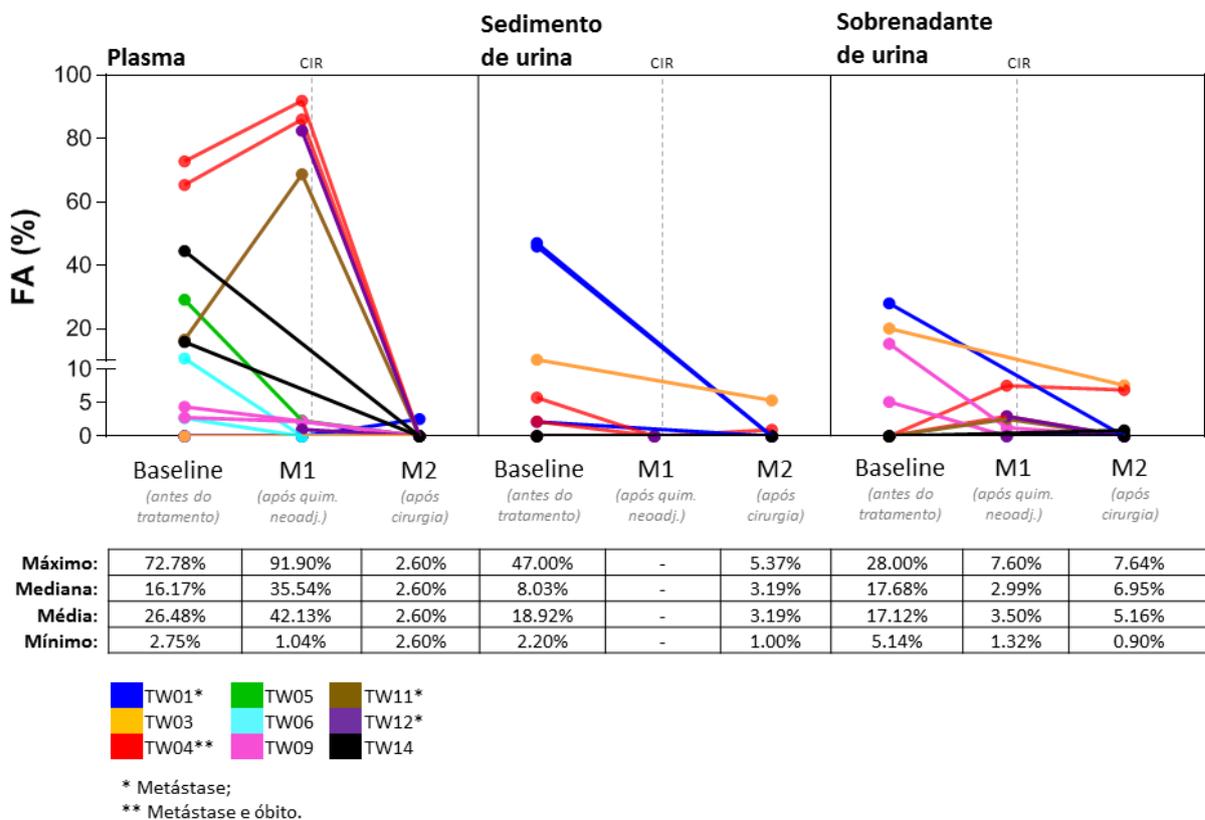
Fonte: autoria própria.

Figura 7 - Progressão de doença e detecção de DNA tumoral (tDNA) em amostras de plasma e componentes da urina de pacientes com TW.

A **Figura 8** mostra a fração de tDNA encontrada nas amostras de plasma e urina. É possível observar uma fração alta de tDNA principalmente no plasma antes do tratamento (baseline) e após a quimioterapia neoadjuvante (coleta M1), chegando a mais de 90% do DNA livre no plasma para a paciente TW04, que apresentou metástase pulmonar e veio a óbito. Após a cirurgia para a retirada do rim afetado (coleta M2), essa fração de tDNA diminuiu drasticamente. Isso mostra que o TW libera grandes quantidades de tDNA na urina e principalmente no sangue do paciente.

Nas amostras positivas para tDNA, no plasma baseline, a FA média foi de 26,48% e a mediana foi de 16,17% (mínima e máxima de 2,75% e 72,78%, respectivamente); no plasma M1, a FA média foi de 42,13% e a mediana foi de 35,54% (mínima e máxima de 1,04% e 91,90%, respectivamente); no plasma M2, somente uma variante somática foi detectada no

plasma de 1 paciente, com FA de 2,60%. Para o sedimento de urina baseline, a FA média foi de 18,92% e a mediana foi de 8,03% (mínima e máxima de 2,20% e 47,00%, respectivamente); para o sedimento de urina M1 não houve detecção de variantes somáticas em nenhum dos casos; no sedimento de urina M2, a FA média e a mediana foram de 3,19% (mínima e máxima de 1,00% e 5,37%, respectivamente). Para o sobrenadante de urina baseline, a FA média foi de 17,12% e a mediana foi de 17,68% (mínima e máxima de 5,14% e 28,00%, respectivamente); no sobrenadante de urina M1, a FA média foi de 3,50% e a mediana foi de 2,99% (mínima e máxima de 1,32% e 7,60%, respectivamente); por último, para o sobrenadante de urina M2, a FA média foi de 5,16% e a mediana foi de 6,95% (mínima e máxima de 0,90% e 7,64%, respectivamente) (Figura 8).



Fonte: autoria própria.

Figura 8 - Frequências alélicas (FA) das variantes somáticas identificadas em amostras de plasma e urina de pacientes com TW.

Uma análise preliminar não mostrou associação entre a presença de tDNA em plasma ou urina com progressão da doença e variáveis patológicas (Apêndice 8). As diferenças observadas na análise de sobrevida livre de progressão e de sobrevida global entre pacientes com tDNA positivo ou negativo em plasma e urina não atingiram significância estatística (Apêndice 9). Entretanto, é necessário aumentar a casuística de TW para ser possível a realização de uma análise robusta de associação e de sobrevida.

4.3 Detecção de DNA tumoral em amostras de plasma e urina de pacientes com ccRCC

4.3.1 Casuística de ccRCC

A etapa de recrutamento de pacientes com ccRCC foi realizado num estudo anterior (Meira 2022), totalizando 46 pacientes (Tabela 13). Para a análise de plasma e urina no presente estudo, foram avaliados somente os casos com variante somática identificada (ver tópico a seguir, “4.3.2 Identificação de variante somática no ccRCC”), totalizando 39 casos, e foram descartados mais 3 casos que não realizaram nenhuma coleta de plasma ou urina, totalizando então 36 pacientes com ccRCC elegíveis para a análise de biópsia líquida.

Estes 36 pacientes têm média de idade de 57 anos ao diagnóstico (variando de 37 a 82 anos), sendo a maioria do sexo masculino (27/36 – 75%).

Tabela 13 - Informações gerais sobre os 36 pacientes com ccRCC selecionados para a análise de biópsia líquida.

Variável	Categoria	n	(%)
Sexo	Masculino	27	80,4%
	Feminino	9	19,6%
ISUP	1	1	2,8%
	2	11	30,6%

	3	15	41,7%
	4	9	25,0%
Estadiamento patológico	pT1	24	66,7%
	pT2	2	5,6%
	pT3	10	27,8%
	pT4	0	0,0%

Fonte: autoria própria.

A maior parte dos casos (26/36 – 72,2%) apresentou doença localizada (gradação pT1 ou pT2), 5 casos são metastáticos (5/36, 13,9%) e 2 casos evoluíram a óbito durante o período de monitoramento (2/36, 5,5%). Todos os dados clínicos e patológicos dos 36 pacientes podem ser consultados no Apêndice 10.

4.3.2 Identificação de variante somática no ccRCC

A identificação de variantes somáticas nos tumores dos 46 casos de ccRCC usando o PAINEL CCR-28 foi realizada num estudo anterior (Meira, 2022), com 35 (35/46, 76%) positivos para variantes somáticas nos genes deste painel. Dos 11 outros tumores ccRCC, negativos para variantes somáticas nos genes do PAINEL CCR-28, 5 casos que tinham material remanescente disponível foram avaliados no presente estudo usando o PAINEL CCP. Destes, 1 caso teve variante somática identificada no gene *ROS1* (**Tabela 14**).

No total, *VHL* foi o gene mais frequentemente mutado na casuística de 46 ccRCCs, apresentando alteração em 27 amostras avaliadas (58,7%), seguido por *PBRM1*, mutado em 15 amostras (32,6%) (Meira, 2022).

Tabela 14 - Variantes somáticas identificadas nos ccRCC através de sequenciamento do painel de genes customizado ou do PAINEL CCP.

ID	Gene	cDNA change	Protein change	Tipo	FA (%)	Método de detecção
ccRCC 29	VHL	c.287A>C	p.Gln96Pro	Missense	31,8	PAINEL CCR-28
ccRCC 32	VHL	c.464-1G>A	-	Splice site	45,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 33	PBRM1	c.2608C>T	p.Gln870Ter	Nonsense	61,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 34	VHL	c.262T>A	p.Trp88Arg	Missense	32,7	PAINEL CCR-28
ccRCC 34	PBRM1	c.3092T>A	p.Val1031Asp	Missense	32,2	PAINEL CCR-28
ccRCC 37	VHL	c.262T>A	p.Trp88Arg	Missense	37,5	PAINEL CCR-28
ccRCC 37	BAP1	c.41T>G	p.Leu14Arg	Missense	41,8	PAINEL CCR-28
ccRCC 37	SMARCA4	c.3566G>T	p.Arg1189Leu	Missense	28,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 38	VHL	c.362_363insT	p.Ala122Cysfs	Frameshift INS	40,6	PAINEL CCR-28
ccRCC 38	PBRM1	c.2012delA	p.Asn671Thrfs	Frameshift DEL	42,9	PAINEL CCR-28
ccRCC 38	KDM6A	c.2116C>A	p.Pro706Thr	Missense	57,6	PAINEL CCR-28
ccRCC 39	VHL	c.349T>C	p.Trp117Arg	Missense	17,3	PAINEL CCR-28
ccRCC 39	PBRM1	c.457C>T	p.Gln153Ter	Nonsense	19,9	PAINEL CCR-28
ccRCC 42	VHL	c.444delT	p.Phe148Leufs*11	Frameshift DEL	46,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 42	PBRM1	c.3253G>T	p.Glu1085Ter	Nonsense	50,5	PAINEL CCR-28
ccRCC 42	AR	c.170T>A	p.Leu57Gln	Missense	7,1	PAINEL CCR-28
ccRCC 43	VHL	c.162_172delGG AGGCCGGGC	p.Glu55Alafs	Frameshift DEL	53,3	PAINEL CCR-28
ccRCC 43	SETD2	c.4917+1G>A	-	Splice site	54,2	PAINEL CCR-28
ccRCC 43	PBRM1	c.3079C>T	p.Arg1027*	Nonsense	50,3	PAINEL CCR-28
ccRCC 44	VHL	c.257C>A	p.Pro86His	Missense	46,6	PAINEL CCR-28
ccRCC 46	VHL	c.344_345insC	p.Leu116Profs	Frameshift INS	28,5	PAINEL CCR-28
ccRCC 46	PBRM1	c.813+1G>A	-	Splice site	31,8	PAINEL CCR-28
ccRCC 46	KDM5C	c.503A>C	p.Gln168Pro	Missense	46,9	PAINEL CCR-28
ccRCC 57	ROS1	c.2672A>G	p.Tyr891Cys	Missense	14,6	PAINEL CCP
ccRCC 60	VHL	c.458T>C	p.Leu153Pro	Missense	21,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 60	BAP1	c.38G>T	p.Gly13Val	Missense	20,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 60	FAT1	c.5178delC	p.Phe1727Leufs*9	Frameshift DEL	17,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 63	VHL	c.257_270delCCG TATGGCTCAAC	p.Pro86Leufs*41	Frameshift DEL	24,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 63	PBRM1	c.1649C>T	p.Pro550Leu	Missense	20,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 64	VHL	c.469_480delACT CTGAAAGAG	p.Thr157_Glu160del	Inframe DEL	29,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 65	VHL	c.433C>T	p.Gln145Ter	Nonsense	53,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 66	SETD2	c.1111delA	p.Thr371Glnfs*113	Frameshift DEL	21,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 69	VHL	c.397dupA	p.Thr133Asnfs*2	Frameshift INS	43,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 69	PBRM1	c.2033G>A	p.Arg678His	Missense	40,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 70	PBRM1	c.36delC	p.Ser13Alafs*32	Frameshift DEL	8,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 76	-	-	-	-	-	-
ccRCC 79	-	-	-	-	-	-
ccRCC 85	SETD2	c.2613T>G	p.Tyr871Ter	Nonsense	7,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 88	VHL	c.317delG	p.Gly106Alafs*53	Frameshift DEL	39,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 91	-	-	-	-	-	-
ccRCC 92	VHL	c.326T>A	p.Ile109Asn	Missense	18,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 92	BAP1	c.2034dupT	p.Ile679Tyrf*38	Frameshift INS	10,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 93	BAP1	c.150_155delCAA ATG	p.Phe50_Trp52del nsLeu	Inframe DEL	3,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 97	MTOR	c.5930C>A	p.Thr1977Lys	Missense	10,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 98	ARID1A	c.5651_5661delC AGCAGAGGGT	p.Thr1884Asnfs*13	Frameshift DEL	38,0	PAINEL CCR-28

ccRCC 100	<i>PTEN</i>	c.372_379delTAA AGCTG	p.Cys124Trpfs*53	Frameshift DEL	31,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 101	<i>VHL</i>	c.351G>T	p.Trp117Cys	Missense	19,3	PAINEL CCR-28
ccRCC 101	<i>PBRM1</i>	c.2824C>T	p.Arg942Ter	Missense	27,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 101	<i>KDM5C</i>	c.1013delA	p.Lys338Serfs*92	Frameshift DEL	56,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 102	<i>VHL</i>	c.221T>A	p.Val74Asp	Missense	21,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 103	<i>VHL</i>	c.524_533delACA GGAGACT	p.Tyr175Trpfs*24	Frameshift DEL	43,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 103	<i>PBRM1</i>	c.1844T>A	p.Phe615Tyr	Missense	42,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 103	<i>KDM5C</i>	c.3937C>T	p.Gln1313Ter	Nonsense	60,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 104	<i>ARID1A</i>	c.862C>T	p.Gln288Ter	Nonsense	27,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 104	<i>PBRM1</i>	c.1743_1744delA A	p.Lys581Asnfs*12	Frameshift DEL	31,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 105	-	-	-	-	-	-
ccRCC 106	<i>VHL</i>	c.534_539delGG ACAT	p.Asp179_Ile180de I	Inframe DEL	17,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 109	<i>VHL</i>	c.343C>T	p.His115Tyr	Missense	38,8	PAINEL CCR-28
ccRCC 109	<i>PBRM1</i>	c.2966-18delC		Frameshift DEL	40,2	PAINEL CCR-28
ccRCC 110	<i>VHL</i>	c.280G>T	p.Glu94Ter	Nonsense	40,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 110	<i>SETD2</i>	c.1265C>G	p.Ser422Ter	Nonsense	11,1	PAINEL CCR-28
ccRCC 110	<i>PBRM1</i>	c.778-1G>A		Splice site	33,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 111	-	-	-	-	-	-
ccRCC 112	<i>VHL</i>	c.182_183delCC	p.Pro61Argfs*70	Frameshift DEL	27,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 120	<i>VHL</i>	c.472C>G	p.Leu158Val	Missense	19,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 120	<i>BAP1</i>	c.91G>A	p.Glu31Lys	Missense	26,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 121	<i>VHL</i>	c.458T>C	p.Leu153Pro	Missense	37,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 121	<i>SETD2</i>	c.4918-2A>G		Splice site	16,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 121	<i>BAP1</i>	c.1044delC	p.Asn349Thrfs*13	Frameshift DEL	5,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 121	<i>KDM6A</i>	c.771T>A	p.Asp257Glu	Missense	6,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 122	-	-	-	-	-	-
ccRCC 123	<i>VHL</i>	c.340+1G>A		Splice site	34,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 124	-	-	-	-	-	-
ccRCC 127	<i>SETD2</i>	c.6837dupT	p.Val2280Cysfs*89	Frameshift INS	31,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 127	<i>KDM5C</i>	c.1883_1903del	p.Gln628_Arg634d el	Inframe DEL	27,0	PAINEL CCR-28
ccRCC 130	<i>TP53</i>	c.511G>A	p.Glu171Lys	Missense	33,0	PAINEL CCR-28

Fonte: autoria própria.

4.3.3 Detecção de tDNA em plasma e urina dos casos com ccRCC

No total, para os casos de ccRCC, foram avaliadas 111 amostras de plasma (32 da coleta baseline, 20 da coleta M1, 26 da coleta M2, 17 da coleta M3 e 16 da coleta M4) e 98 amostras de urina (32 da coleta baseline, 16 da coleta M1, 23 da coleta M2, 14 da coleta M3 e 13 da coleta M4). As amostras de cfDNA de sobrenadante e de sedimento de urina de cada paciente com ccRCC foram agrupadas de forma equimolar em uma única análise para cada coleta.

Os resultados da detecção de tDNA nas amostras de plasma e urina encontram-se na **Tabela 15** e na **Figura 9**. Quanto à coleta baseline, realizada antes da cirurgia, a detecção de tDNA em plasma e urina foi realizada num estudo anterior (Meira, 2022), sendo tDNA positiva em 4 amostras de plasma e 4 amostras urina (4/32, 12,5% cada), com plasma e urina baseline tDNA positivos simultaneamente em 2 casos.

Quanto ao período de monitoramento, na coleta M1, realizada de 6 a 8 semanas após a cirurgia, o plasma foi tDNA positivo em 2 casos (2/20, 10%) e em nenhuma das 16 amostras de urina; na coleta M2, 6 meses após a cirurgia, tanto o plasma quanto a urina foram tDNA negativos em 26 e 23 amostras, respectivamente; na coleta M3, 18 meses após a cirurgia, o plasma foi tDNA positivo em 2 de 17 casos (2/17, 11,8%) e a urina foi tDNA positiva em 1 de 14 casos (1/14, 7,1%); na coleta M4, 30 meses após a cirurgia, as 16 amostras de plasma e as 13 amostras de urina foram tDNA negativas.

Tabela 15 - Detecção de variantes somáticas em amostras de plasma e urina de pacientes com ccRCC.

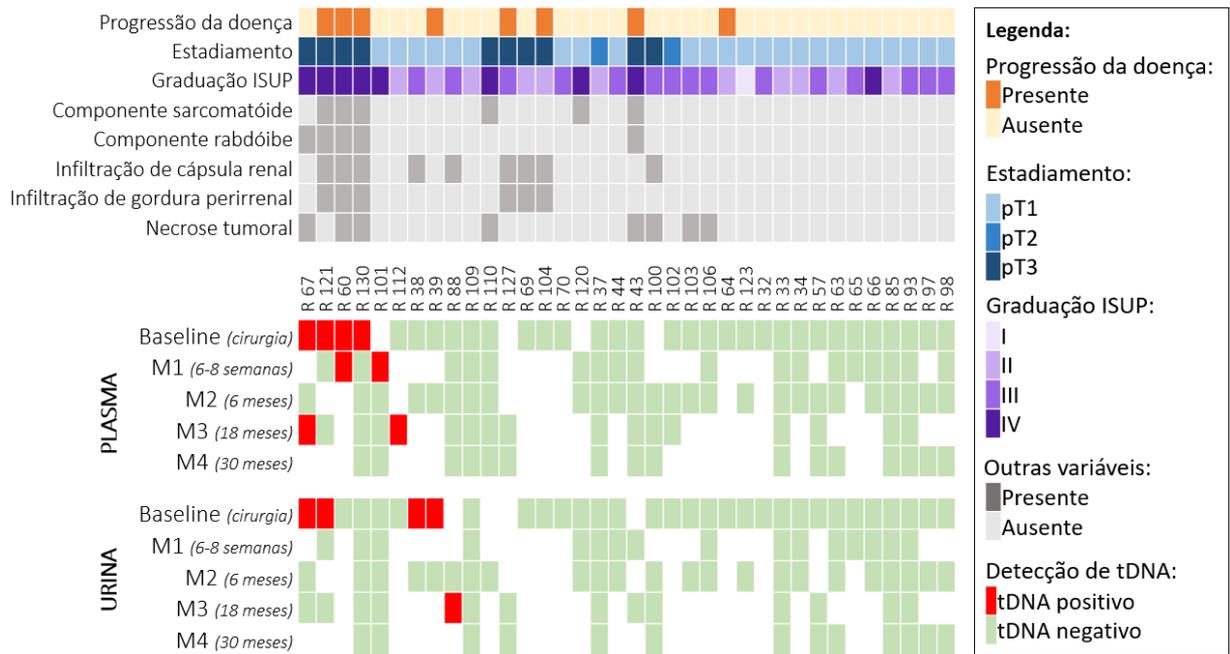
Variante somática no tumor					Baseline (antes da cirurgia)		M1 (6 a 8 semanas pós cirurgia)		M2 (6 meses pós cirurgia)		M3 (18 meses pós cirurgia)		M4 (30 meses pós cirurgia)	
ID	Gene	cDNA change	Protein change	FA (%)	Plasma	Urina	Plasma	Urina	Plasma	Urina	Plasma	Urina	Plasma	Urina
ccRCC 32	VHL	c.464-1G>A	-	45	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ccRCC 33	PBRM1	c.2608C>T	p.Gln870Ter	61	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 34	VHL	c.262T>A	p.Trp88Arg	32,73	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 34	PBRM1	c.3092T>A	p.Val1031Asp	32,20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 37	VHL	c.262T>A	p.Trp88Arg	37,50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 37	BAP1	c.41T>G	p.Leu14Arg	41,84	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 37	SMARCA4	c.3566G>T	p.Arg1189Leu	28,00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 38	VHL	c.362_363insT	p.Ala122Cysfs	40,59	ND	ND	NC	NC	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 38	PBRM1	c.2012delA	p.Asn671Thrfs	42,90	ND	0,82%	NC	NC	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 38	KDM6A	c.2116C>A	p.Pro706Thr	57,59	ND	2,06%	NC	NC	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 39	VHL	c.349T>C	p.Trp117Arg	17,33	ND	4,95%	NC	NC	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 39	PBRM1	c.457C>T	p.Gln153Ter	19,87	ND	5,98%	NC	NC	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 43	VHL	c.162_172delGG AGGCCGGGC	p.Glu55Alafs	53,32	ND	NA	ND	ND	ND	NA	ND	ND	ND	NA
ccRCC 43	SETD2	c.4917+1G>A	-	54,23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 43	PBRM1	c.3079C>T	p.Arg1027*	50,26	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 44	VHL	c.257C>A	p.Pro86His	46,65	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 57	ROS1	c.2672A>G	p.Tyr891Cys	14,58	ND	ND	NC	NC	ND	NA	ND	ND	ND	ND
ccRCC 60	VHL	c.458T>C	p.Leu153Pro	21	4,00%	ND	5,13%	NA	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ccRCC 60	BAP1	c.38G>T	p.Gly13Val	20	2,67%	ND	2,04%	NA	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ccRCC 60	FAT1	c.5178delC	p.Phe1727Leufs*9	17	2,31%	ND	2,37%	NA	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ccRCC 63	VHL	c.257_270delCC GTATGGCTCAAC	p.Pro86Leufs*41	24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC	ND	ND
ccRCC 63	PBRM1	c.1649C>T	p.Pro550Leu	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC	ND	ND
ccRCC 64	VHL	c.469_480delACT CTGAAAGAG	p.Thr157_Glu160de I	29	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ccRCC 65	VHL	c.433C>T	p.Gln145Ter	53	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ccRCC 66	SETD2	c.1111delA	p.Thr371Glnfs*113	21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	NC

ccRCC 69	VHL	c.397dupA	p.Thr133Asnfs*2	43	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ccRCC 69	PBRM1	c.2033G>A	p.Arg678His	40	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ccRCC 70	PBRM1	c.36delC	p.Ser13Alafs*32	8	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ccRCC 85	SETD2	c.2613T>G	p.Tyr871Ter	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 88	VHL	c.317delG	p.Gly106Alafs*53	39	ND	NA	ND	NA	ND	ND	ND	1,35%	ND	NA
ccRCC 92	VHL	c.326T>A	p.Ile109Asn	18	NA	ND	NC	NC	ND	ND	ND	ND	NC	NC
ccRCC 92	BAP1	c.2034dupT	p.Ile679Tyrfs*38	10	0,78%	0,60%	NC	NC	ND	ND	0,68%	ND	NC	NC
ccRCC 93	BAP1	c.150_155delCA AATG	p.Phe50_Trp52deli nsLeu	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 97	MTOR	c.5930C>A	p.Thr1977Lys	10	ND	ND	NC	NC	ND	ND	NC	NC	ND	ND
ccRCC 98	ARID1A	c.5651_5661delC AGCAGAGGGT	p.Thr1884Asnfs*13	38	ND	ND	ND	NA	ND	ND	NC	NC	ND	ND
ccRCC 100	PTEN	c.372_379delTA AAGCTG	p.Cys124Trpfs*53	31	NC	ND	NC	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 101	VHL	c.351G>T	p.Trp117Cys	19	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 101	PBRM1	c.2824C>T	p.Arg942Ter	27	NC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 101	KDM5C	c.1013delA	p.Lys338Serfs*92	56	NC	ND	0,85%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 102	VHL	c.221T>A	p.Val74Asp	21	ND	ND	NC	NC	ND	NA	ND	NC	NC	NC
ccRCC 103	VHL	c.524_533delAC AGGAGACT	p.Tyr175Trpfs*24	43	ND	ND	NC	NC	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 103	PBRM1	c.1844T>A	p.Phe615Tyr	42	ND	ND	NC	NC	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 103	KDM5C	c.3937C>T	p.Gln1313Ter	60	ND	ND	NC	NC	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 104	ARID1A	c.862C>T	p.Gln288Ter	27	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ccRCC 104	PBRM1	c.1743_1744delA A	p.Lys581Asnfs*12	31	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ccRCC 106	VHL	c.534_539delGG ACAT	p.Asp179_Ile180del	17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 109	VHL	c.343C>T	p.His115Tyr	38,81	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 109	PBRM1	c.2966-18delC	-	40,22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 110	VHL	c.280G>T	p.Glu94Ter	40	ND	ND	ND	NA	ND	ND	ND	NA	ND	NA
ccRCC 110	SETD2	c.1265C>G	p.Ser422Ter	11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 110	PBRM1	c.778-1G>A	-	33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ccRCC 112	VHL	c.182_183delCC	p.Pro61Argfs*70	27	ND	ND	NC	NC	NC	NC	2,64%	NA	NC	NC
ccRCC 120	VHL	c.472C>G	p.Leu158Val	19	NC	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 120	BAP1	c.91G>A	p.Glu31Lys	26	NC	ND	ND	ND	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 121	VHL	c.458T>C	p.Leu153Pro	37	ND	ND	ND	ND	NC	NC	ND	ND	NC	NC

ccRCC 121	SETD2	c.4918-2A>G	-	16	0,68%	ND	ND	ND	NC	NC	ND	ND	NC	NC
ccRCC 121	BAP1	c.1044delC	p.Asn349Thrfs*13	5	ND	1,54%	ND	ND	NC	NC	ND	ND	NC	NC
ccRCC 121	KDM6A	c.771T>A	p.Asp257Glu	6	ND	ND	ND	ND	NC	NC	ND	ND	NC	NC
ccRCC 123	VHL	c.340+1G>A	-	34	ND	ND	NC	NC	ND	ND	NC	NC	NC	NC
ccRCC 127	SETD2	c.6837dupT	p.Val2280Cysfs*89	31	NC	NC	NC	NC	NC	NC	ND	ND	ND	ND
ccRCC 127	KDM5C	c.1883_1903del	p.Gln628_Arg634de I	27	NC	NC	NC	NC	NC	NC	ND	ND	ND	ND
ccRCC 130	TP53	c.511G>A	p.Glu171Lys	33	0,53%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Fonte: autoria própria.

Legenda: FA, frequência alélica da variante; ND, não detectado; NC, não coletado; NA, não avaliado por conta de material insuficiente para análise.



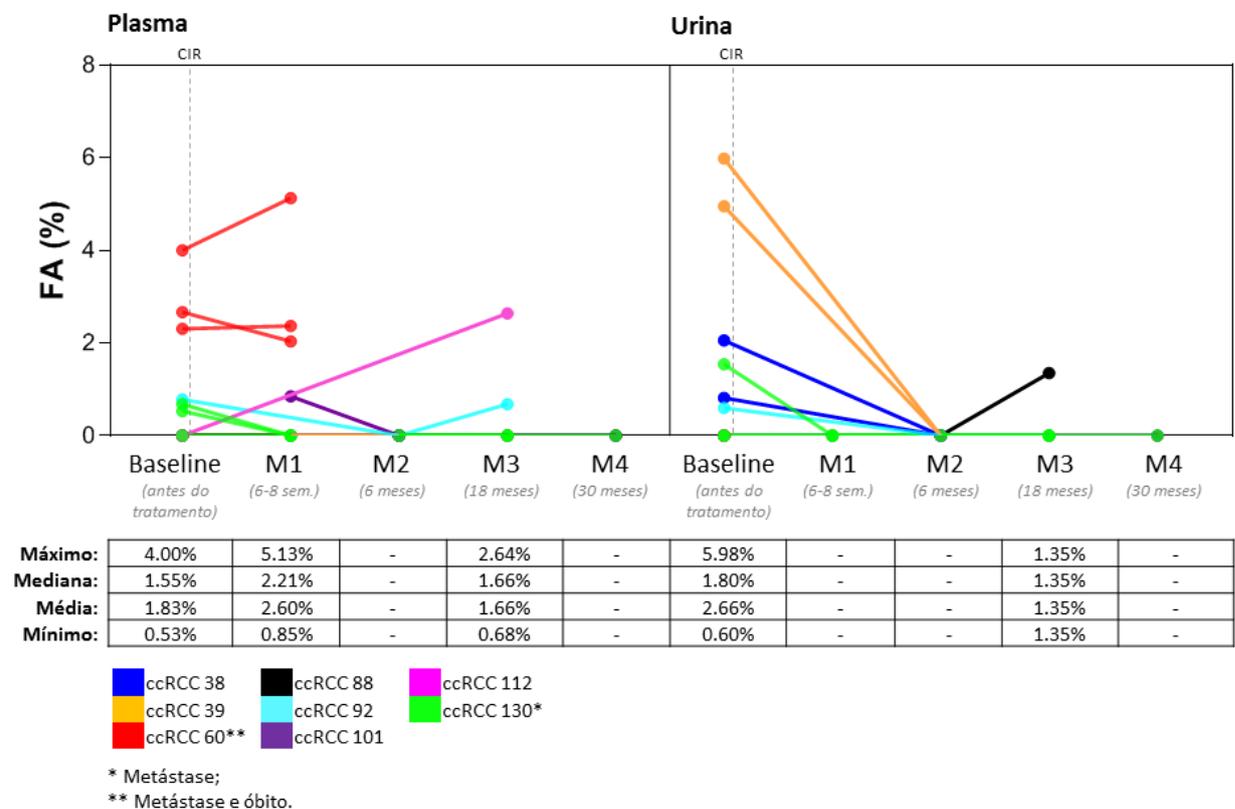
Fonte: autoria própria.

Figura 9 - Dados clínicos e anatomopatológicos e detecção de DNA tumoral (tDNA) em amostras de plasma e urina de pacientes com ccRCC.

A **Figura 10** mostra que o tDNA foi encontrado em uma pequena fração do DNA livre total dos plasmas e urinas, muitos com FA abaixo de 1%. Os valores máximos de fração de tDNA não ultrapassam a FA de 6% tanto no plasma quanto na urina, muito abaixo do observado nos casos de TW. As frações mais altas de tDNA foram observadas na coleta baseline, realizada antes da cirurgia. No plasma, a paciente ccRCC60, que veio a óbito por causa da doença, teve os níveis mais altos de DNA tumoral, representado por 3 variantes somáticas do tumor dessa paciente. Ela faleceu antes da coleta M2. De forma geral, os níveis de DNA tumoral diminuíram durante as coletas de monitoramento.

Nas amostras de plasma e urina positivas para tDNA, nos plasmas baseline, a FA média foi de 1,83% e a mediana foi de 1,55% (mínima e máxima de 0,53% e 4,0%, respectivamente); nos plasmas M1, a FA média foi de 2,6% e a mediana foi de 2,21% (mínima e máxima de 0,85% e 5,13%, respectivamente); nos plasmas M2 não houve detecção de tDNA em nenhuma

amostra; na coleta M3, os plasmas de dois pacientes foram tDNA positivos, com média de 1,66%, mínima de 0,68% e máxima de 2,64%; e todos os plasmas M4 foram tDNA negativos. Para as amostras de urina baseline, a FA média foi de 2,66% e a mediana foi de 1,80% (mínima e máxima de 0,60% e 5,98%, respectivamente); para as urinas M1 e M2 não houve detecção de tDNA em nenhuma das amostras; nas urinas M3, somente uma amostra foi tDNA positiva, com FA de 1,35%. Nenhuma amostra de urina foi positiva para tDNA na coleta M4 (**Figura 10**).



Fonte: autoria própria.

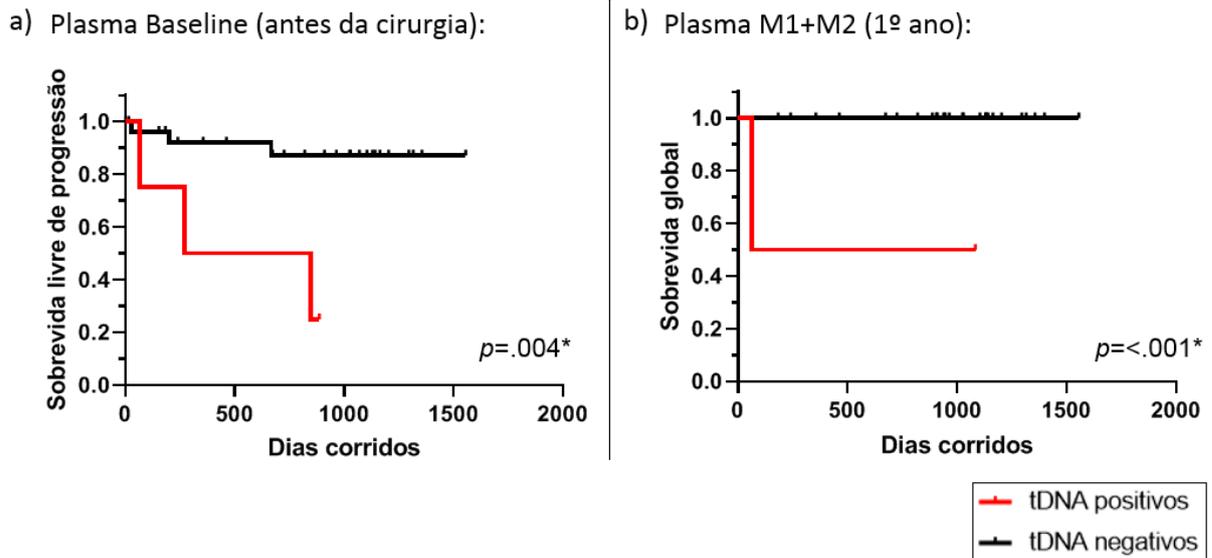
Figura 10 - Frequências alélicas (FA) das variantes somáticas identificadas em amostras de plasma e urina de pacientes com ccRCC.

Foram realizadas análises de associação entre presença de tDNA em plasma ou urina e variáveis patológicas e desfecho clínico. Destacaram-se as associações entre tDNA positivo em plasma coletado antes da cirurgia (baseline) de alta confiança com a progressão da doença ($p=0.0155$), estadiamento tumoral $\geq pT3$ ($p=0.002$), graduação ISUP 4 ($p=0.001$), presença de

necrose tumoral ($p=0.039$), infiltração de cápsula renal ($p=0.025$) e de gordura perirrenal ($p=0.008$), infiltração microscópica sanguínea ($p=0.035$) e linfática ($p=0.012$), além da presença de componente sarcomatóide ($p=0.008$) e rabdoide ($p<0.001=0.0004$). Todos os resultados de associação detalhados estão disponíveis no Apêndice 11.

A sobrevida livre de progressão foi reduzida em casos de ccRCC com tDNA positivo no plasma coletado antes da cirurgia (baseline) ($p=.004$) (**Figura 11a**). Além disso, a sobrevida global foi menor em casos com tDNA positivo em amostras de plasma coletadas no 1º ano após a cirurgia (amostras M1 ou M2) ($p<.001$) (**Figura 11b**). As curvas de sobrevida detalhadas podem ser encontradas no Apêndice 12.

Além disso, observou-se que os pacientes com tDNA positivo em amostras de plasma coletadas durante o primeiro ano após a cirurgia (amostras M1 ou M2) apresentaram uma média maior no tamanho do tumor (medido pelo maior eixo, em centímetros), com 8,75 cm em comparação com os casos tDNA negativos, que apresentaram uma média de 4,8 cm. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=.059$). De forma semelhante, os pacientes com resultados positivos para tDNA em amostras de plasma coletadas antes da cirurgia (baseline) apresentaram uma média maior no tamanho do tumor, com 11,16 cm em comparação com os casos tDNA negativos, que apresentaram uma média de 4,0 cm. No entanto, essa diferença também não foi estatisticamente significativa ($p=.07$). Os detalhes destas análises podem ser conferidos no Apêndice 11.



Fonte: autoria própria.

Legenda: (a) Curva de sobrevida livre de progressão de pacientes com tDNA positivo no plasma baseline comparado à pacientes com tDNA negativo; (b) Curva de sobrevida global de pacientes com tDNA positivo no plasma coletado durante o 1º ano após cirurgia (M1 + M2) comparado à pacientes com tDNA negativo.

Figura 11 – Curvas de sobrevida livre de progressão e sobrevida global para os casos de ccRCC.

4.4 Teste genético multigênico em pacientes com TW e com CCR

4.4.1 Teste genético em pacientes com TW

Foram analisados 59 casos de TW para identificação de VP e variantes provavelmente patogênicas (VPP) em genes de predição a este tumor, dentro do espectro de genes já sabidamente relacionados ao câncer hereditário. Dos casos analisados, 9 foram através de DNA de tecido não neoplásico (borda tumoral) e 50 através de DNA de leucócitos.

A maioria dos casos incluídos nessa análise é composta por pacientes do sexo feminino (62,7%), com TW do tipo blastematoso (27,1%), estadiamento III (23,7%) e risco intermediário (55,9%). Nessa amostragem, foi observado que 9 casos (15,3%) apresentaram TW bilateral, uma característica frequentemente associada à predisposição genética para a doença (**Tabela 16**).

Tabela 16 - Informações gerais sobre os casos de TW recrutados para a análise de genes de risco.

Variável	Categoria	n	%
Sexo	Masculino	21	35,6%
	Feminino	37	62,7%
	Desconhecido	1	1,7%
Subtipo	Blastema	16	27,1%
	Estromal	10	16,9%
	Epitelial	4	6,8%
	Misto	10	16,9%
	Regressivo	10	16,9%
	Desconhecido	9	15,3%
	Lateralidade	Unilateral	50
Bilateral		9	15,3%
Estadiamento	I	13	22,0%
	II	8	13,6%
	III	14	23,7%
	IV	5	8,5%
	V	9	15,3%
	Desconhecido	10	16,9%
Risco	Intermediário	33	55,9%
	Alto	17	28,8%
	Desconhecido	9	15,3%

Fonte: autoria própria.

Após sequenciamento usando o painel de 126 genes de predisposição ao câncer (GPC), foram priorizadas 11 variantes germinativas raras detectadas em 9 pacientes (15,2%) (**Tabela 17**). Os genes do painel encontram-se listados no Anexo 2. Nenhum dos pacientes com tumor bilateral apresentou variantes VP, VPP ou mesmo variantes de significado clínico incerto (VUSp) nos GPC nos genes do painel.

Das 11 variantes priorizadas, 6 são VP pelos critérios da ACMG, nos genes *BRCA1*, *CHEK2*, *WT1* (2 amostras), *ERBB2* e *SDHA*.

Para 8 das 11 variantes priorizadas foi possível avaliar se houve perda de heterozigose (LOH, do inglês “*loss of heterozigosity*”) no DNA do tecido tumoral. Destas, somente a variante

VP *nonsense* c.1157C>A em *WT1* da amostra N07 apresentou perda, reforçando o envolvimento desse gene no desenvolvimento do TW.

Entre os 9 casos positivos para variantes germinativas em genes de risco para o desenvolvimento de tumores, 80% apresentaram restos nefrogênicos no tumor (4 de 5 casos que tem esta informação disponível nos laudos). Quanto aos 9 casos de TW bilateral desta casuística, nenhum apresentou variantes relevantes nos genes do painel.

A ausência de variantes em casos de tumores bilaterais sugere que a predisposição ao TW bilateral envolve outros genes que ainda precisam ser investigados.

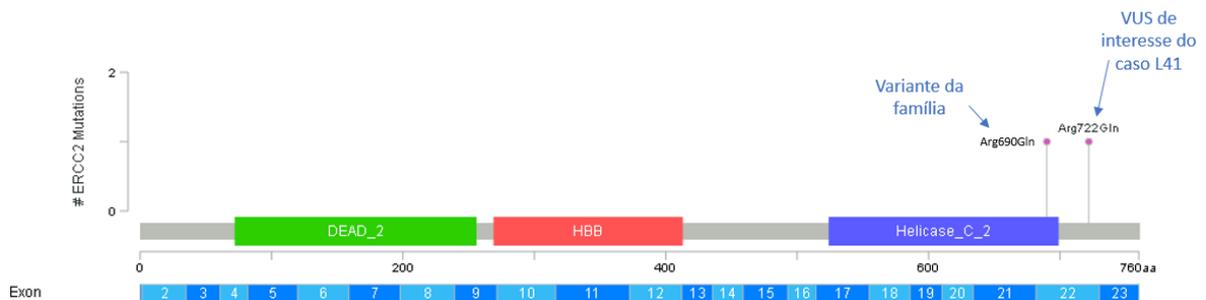
Tabela 17 - Priorização de variantes germinativas em 52 amostras de TW.

id	Sexo	Idade ao diagn.	GENE	TIPO	Chr (hg37)	cDNA	Prot	FA% leucócito	dbSNP	MAF GnomeAD	ClinVar	ACMG	Revel score	LOH no tumor
L12	M	5a, 6m	BRCA1	nonsense	17:41245861	c.1687C>T	p.Gln563Ter	54,30%	rs80356898	0.0000279	Pathogenic	VP	-	Ausente
L05	F	1a, 11m	DICER1	Frameshift INS	14:95562851	c.4405_4406dup CT	p.Ser1470Phefs*21	40,40%	-	-	-	VUSp	-	Ausente
L25	M	1a	CHEK2	missense	22:29121087	c.470T>C	p.Ile157Thr	45,10%	rs17879961	0.00412	Conflicting: risk factor, Likely pathogenic(8); Pathogenic(6); VUS (4)	VP/alelo de risco	0.53	Ausente
L28	F	2a	WT1	nonsense	11:32450058	c.769C>T	p.Gln257Ter	45,00%	-	-	-	VP	-	NA
L36	F	3a, 3m	ERBB2	nonsense	17:37883986	c.3457C>T	p.Arg1153Ter	54,10%	rs1364766454	0.0000043	-	VP	-	Ausente
N07	F	1a, 4m	WT1	nonsense	11:32417910	c.1157C>A	p.Ser386Ter	41,20%	-	-	-	VP	-	Presente
L41	M	3a, 8m	ERCC2	missense	19:45855492	c.2165G>A	p.Arg722Gln	52,50%	rs138569838	0.000057	VUS	VUSp	0.72	Ausente
L41	M	3a, 8m	BARD1	missense	2:215610502	c.1754T>C	p.Leu585Pro	50,50%	rs786201905	0.000004	VUS	VUSp	0.87	Ausente
GRY 202	F	4a	MSH6	missense	2:48026852	c.1730G>A	p.Arg577His	40%	rs376220212	0.00004	VUS	VUSp	0.68	NA
GRY 202	F	4a	SDHA	frameshift DEL	5:228344	c.667delG	p.Asp223Ilefs*3	45%	rs587782077	0.0000239	Pathogenic	VP	-	NA
TW 14	F	4a, 10m	MSH2	missense	2:47635614	c.286C>T	p.Arg96Cys	50%	rs1443234544	0.000014	VUS	VUSp	0.789	Ausente

Fonte: autoria própria.

Legenda: LOH, loss of heterogeneity/perda de heterozigose; NA, não avaliado por não haver DNA de tecido tumoral disponível; VP, variante patogênica; VUSp, variante de significado incerto priorizada.

Nesse estudo incluímos um caso com 3 membros de uma família afetados com TW (pai e dois filhos afetados) através da análise do DNA de saliva. Detectamos uma variante no gene *ERCC2* (c.2069G>A, p.Arg690Gln, Chr19:45855588) nos três membros, que está potencialmente segregando com o fenótipo nos 3 casos, todas em heterozigose. Esta é uma variante rara (MAF=0,000068 no GnomeAD), classificada como variante de significado incerto na ferramenta Varsome e não reportada no ClinVar, com um score de 0.768 na ferramenta *in silico* Revel de predição de patogenicidade. Ela se encontra no mesmo exon da variante c.2165G>A, identificada no mesmo gene na amostra L41 da coorte de 52 amostras de TW apresentada anteriormente (**Figura 12**). Esses dados indicam a necessidade de uma investigação mais aprofundada desse gene uma vez que ainda não há nada na literatura sobre seu potencial envolvimento na predisposição de pacientes ao TW ou no processo tumorigênico desse tumor.



Fonte: autoria própria.

Figura 12 - Variantes germinativas potencialmente patogênicas identificadas em casos de TW.

4.4.2 Teste genético em pacientes com CCR

Para análise de genes de predisposição ao CCR, foram selecionadas 72 amostras de diferentes subtipos de CCR na idade adulta (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Informações gerais sobre os casos de tumores renais do tipo CCR recrutados para a análise de genes de risco.

Variável	Categoria	n	(%)
Sexo	Masculino	56	77,8%
	Feminino	16	22,2%
Subtipo	Carcinoma de células renais tipo células claras	30	41,7%
	Cromóforo	12	16,7%
	Papilífero	22	30,6%
	CCR associado a translocação da família <i>MIT (TFE3)</i>	1	1,4%
	Inclassificável	6	8,3%
	CCR associado à Translocação Xp11.2	1	1,4%
Lateralidade	Unilateral	70	97,2%
	Bilateral	2	2,8%
Estadiamento patológico	pT1	55	74,3%
	pT2	3	4,1%
	pT3	14	18,9%
	pT4	0	0,0%

Fonte: autoria própria.

Foram priorizadas 20 variantes germinativas raras em GPC que foram detectadas em 16 dos 72 pacientes avaliados (22,2%) (**Tabela 19**). Os genes foram *MET*, *CASR*, *MUTYH* (2 amostras), *GALNT12*, *SDHA*, *MLH1*, *TSC1*, *SDHB*, *PMS2* (2 amostras), *WT1* (2 amostras), *FH* (2 amostras), *MSH6*, *MITF*, *EGFR* e *BRCA2*.

Dos diferentes subtipos de CCR analisados com o painel de 126 genes, os que mais apresentaram variantes germinativas foram o ccRCC e o Papilífero, com 7 de 22 amostras positivas em cada subtipo (31,8%).

O caso 215945, com o subtipo papilífero e 1 dos 2 casos de CCR bilateral desta casuística, apresentou uma VP no gene *MET* (rs786202724). Este mesmo caso também apresentou um sarcoma pleiomórfico de alto grau na clavícula alguns anos após o CCR. Outros

2 casos (Xeno-rim 32 e Xeno-rim 85, ambos com o subtipo ccRCC) tem uma mesma variante no gene *FH* (p.Lys477dup, rs367543046), com classificação de patogenicidade conflitante nos bancos de dados.

Tabela 19 - Priorização de variantes germinativas em 72 amostras de CCR.

id	Sexo	Idade ao diagn.	Subtipo	GENE	TIPO	Chr (hg37)	cDNA	Prot	FA% leucócito	dbSNP	MAF GnomeAD	ClinVar	ACMG	Revel score	LOH no tumor
56389	M	65	Papilífero	<i>SDHA</i>	missense	5:231043	c.823G>A	p.Asp275Asn	49,0%	rs1553998629	NA	VUS	VUSp	0.657	NA
56390	M	47	Papilífero	<i>MLH1</i>	missense	3:37092086	c.2213G>A	p.Gly738Glu	39,0%	rs148317871	A=0.000008	VUS	VUSp	0.886	NA
56390	M	47	Papilífero	<i>TSC1</i>	missense	9:135779813	c.2026T>A	p.Trp676Arg	47,9%	rs748901883	T=0.000007	Uncertain Significance(2), Likely Benign(3)	VUSp	0.741	NA
215942	M	80	Inclassificável	<i>SDHB</i>	missense	1:17350472	c.638T>C	p.Met213Thr	46,8%	rs202014362	G=0.000008	VUS	VUSp	0.918	NA
215945	M	53	Papilífero	<i>MET</i>	missense	7:116417457	c.3328G>A	p.Val1110Ile	47,9%	rs786202724	A=0.000007	Pathogenic	VP	0.509	NA
215967	M	56	Papilífero	<i>MLH1</i>	missense	3:37067433	c.1344G>T	p.Glu448Asp	52,0%	rs587779952	T=0.000007	VUS	VUSp	0.537	NA
216022	F	36	Papilífero	<i>CASR</i>	missense	3:121973074	c.38T>C	p.Leu13Pro	42,0%	rs104893717	NA	Pathogenic	VP	0.559	NA
216022	F	36	Papilífero	<i>PMS2</i>	missense	7:6031660	c.932A>G	p.His311Arg	50,0%	rs1562651786	C=0.000007	VUS	VUSp	0.566	NA
Xeno-rim 106	M	62	ccRCC	<i>PMS2</i>	missense	7:6043624	c.229G>A	p.Glu77Lys	52,7%	rs751235177	T=0.000014	VUS	VUSp	0.506	NA
Xeno-rim 111	M	27	ccRCC	<i>WT1</i>	missense	11:32456380	c.527C>T	p.Thr176Ile	60,1%	rs1853442157	NA	VUS	VUSp	0.68	Ausente
Xeno-rim 32	M	43	ccRCC	<i>FH</i>	inframe INS	1:241661228	c.1431_1433dup AAA	p.Lys477dup	65,9%	rs367543046	TTT=0.001055	Pathogenic(3), Likely Pathogenic(4), Uncertain Significance(6), Likely Benign(1)	VPP	-	Ausente
Xeno-rim 60	F	64	ccRCC	<i>MSH6</i>	missense	2:48026852	c.1730G>A	p.Arg577His	51,2%	rs376220212	A=0.000093	VUS	VUSp	0.682	Ausente
Xeno-rim 60	F	64	ccRCC	<i>MITF</i>	missense	3:70014091	c.952G>A	p.Glu318Lys	62,9%	rs149617956	A=0.001598	Pathogenic/Likely pathogenic; risk factor	P/Alelo de risco	0.438	Ausente
Xeno-rim 69	F	61	ccRCC	<i>EGFR</i>	missense	7:55259434	c.2492G>A	p.Arg831His	51,8%	rs150036236	A=0.000029	Pathogenic(2), Uncertain Significance(3)	VUSp	0.564	Ausente

Xeno-rim 71	F	35	Carcinoma de células renais associado a translocação da família MIT (TFE3)	<i>WT1</i>	missense	11:32421544	c.1063T>C	p.Cys355Arg	37,2%	rs142059681	G=0.000442	Uncertain Significance(2), Likely Benign(2)	VUSp	0.807	Ausente
Xeno-rim 77	M	54	Papilífero	<i>MUTYH</i>	missense	1:45797228	c.1187G>A	p.Gly396Asp	41,1%	rs36053993	T=0.003415	Pathogenic/Likely pathogenic	VP	0.954	Ausente
Xeno-rim 77	M	54	Papilífero	<i>BRCA2</i>	missense	13:32930688	c.7559G>C	p.Arg2520Pro	44,6%	rs80358982	A=0.000021	VUS	VUSp	0.741	Ausente
Xeno-rim 85	M	44	ccRCC	<i>FH</i>	inframe INS	1:241661228	c.1431_1433dup AAA	p.Lys477dup	64,7%	rs367543046	TTT=0.001055	Pathogenic(3), Likely Pathogenic(4), Uncertain Significance(6), Likely Benign(1)	VPP	-	Ausente
Xeno-rim 93	M	49	ccRCC	<i>MUTYH</i>	nonsense	1:45799121	c.312C>A	p.Tyr104Ter	51,8%	rs121908380	A=0.0006	Pathogenic	VP	-	Ausente
Xeno-rim 95	M	69	Papilífero	<i>GALNT12</i>	nonsense	9:101569985	c.5G>A	p.Trp2Ter	51,1%	rs898798901	T=0.00014	VUS	VUSp	-	NA

Fonte: autoria própria.

Legenda: *ccRCC*, carcinoma de células renais tipo células claras; *LOH*, loss of heterogeneity/perda de heterozigose; *NA*, não avaliado por não haver DNA de tecido tumoral disponível; *VP*, variante patogênica; *VPP*, variante provavelmente patogênica; *VUSp*, variante de significado incerto priorizada.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou diferentes aspectos genéticos de TW e ccRCC, principalmente de pacientes que foram tratados durante o período desse estudo. O objetivo foi avaliar o potencial da detecção de tDNA em plasma e urina como ferramenta auxiliar na estratificação de prognóstico desses pacientes, com o potencial apoiar a conduta clínica. Especialmente para os pacientes com TW, o objetivo é identificar precocemente os pacientes de alto risco para progressão da doença e diminuir a intensidade ou necessidade do tratamento quimioterápico para pacientes de baixo risco, sem comprometer a excelente taxa de sobrevida e diminuindo as taxas de pacientes com efeitos colaterais tardios. Realizamos também uma análise exploratória de VPs germinativas em GPC em pacientes de TW e ccRCC, com o objetivo de melhorar a compreensão do processo de tumorigênese, auxiliar no tratamento e contribuir com o entendimento sobre o risco genético herdável para o desenvolvimento desses tumores.

Em relação aos pacientes com TW, a literatura reporta que há uma incidência ligeiramente maior de TW em crianças do sexo feminino (Libes et al. 2023). Nesse estudo, a casuística de TW usada tanto para análise de biópsia líquida quanto para análise de VPs germinativas em genes de predisposição demonstrou forte predominância de pacientes do sexo feminino (90% e 63% dos casos eram do sexo feminino, respectivamente). Infelizmente, a casuística de TW obtida para análise de biópsia líquida nesse estudo foi limitada, impedindo uma análise robusta da associação entre tDNA em fluidos corpóreos e a progressão da doença.

Em relação à casuística de biópsia líquida de ccRCC e da análise de VP germinativas em GPC, no presente estudo houve uma predominância de pacientes do sexo masculino (80,4% e 77,8%, respectivamente), estando de acordo com a tendência observada na literatura (Lipworth et al. 2006).

Na casuística de biópsia líquida de ccRCC deste estudo, a maioria dos casos apresentou a doença em estágios iniciais, com 72,2% dos casos (26/36) sendo diagnosticados com tumores de estadiamento patológico pT1 ou pT2. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que muitos casos de CCR são descobertos incidentalmente durante exames de imagem realizados por outros motivos, o que possibilita um diagnóstico precoce (Campbell et al. 2009; Rini et al. 2009).

Tanto o TW quanto o ccRCC são considerados tumores geneticamente heterogêneos, entre diferentes pacientes (Gadd et al. 2017; Gerlinger et al. 2014; Gerlinger et al. 2012; Sankin et al. 2014; Smith et al. 2020). No levantamento de dados da literatura para o desenvolvimento do PAINEL TW-35, que conta com o sequenciamento genético do tumor de 978 casos de TW, o gene mais frequentemente mutado foi *TP53*, que ainda representa menos de 20% dos casos – mesmo com o enriquecimento no estudo de Gadd et al. (2017) para casos com anaplasia, que geralmente apresentam variante somática em *TP53*. Sabendo que o painel tem cerca de 60% de capacidade para identificação de variantes somáticas em TW, estima-se então que 40% dos casos terão variante somática em outros genes, estimados como mutados em menos de 0,5% dos TW (ou seja, abaixo do *cutoff* de frequência estipulado para um gene ser incluso no PAINEL TW-35). Foi possível observar que os genes envolvidos no TW vão além das vias envolvidas na nefrogênese, com mais de 40 genes relatados na literatura como alterados nesta neoplasia (Treger et al. 2019). A elucidação do repertório mutacional do TW continua sendo um importante desafio e alvo frequente de pesquisas, com grande impacto no desenvolvimento de novas terapias.

Para os casos de ccRCC o cenário do repertório de variações somáticas é um pouco menos heterogêneo, com *VHL* apresentando alteração em dois terços dos casos deste estudo (66,7%), seguido por *PBRM1*, alterado em um terço deles (36,11%) (Meira, 2022). Ambos os

genes se encontram no braço curto do cromossomo 3, junto aos genes *SETD2* e *BAP1*, também frequentemente alterados em ccRCC. A perda do 3p é característica frequente em casos de ccRCC, sendo considerado um dos principais eventos responsáveis pela sua tumorigênese (Turajlic et al. 2018).

Em relação à modificação no repertório mutacional que ocorre durante a formação e progressão do ccRCC, um estudo que avaliou múltiplas porções do tumor mostra que novas mutações driver de menor frequência se originam a partir de clonalidade em diferentes regiões de um mesmo tumor (Gerlinger et al. 2014), demonstrando o perfil dinâmico e a heterogeneidade intratumoral desta doença. Neste aspecto, a biópsia líquida vem se mostrando uma abordagem interessante para a caracterização genética do tumor, superando a heterogeneidade intratumoral. Estudos recentes têm demonstrado que a análise da presença de tDNA em fluidos corpóreos, principalmente no plasma de pacientes com diversos tipos de câncer, é capaz de ilustrar de forma temporal a expansão da clonalidade de diversos tumores (Kavan et al. 2022; Murtaza et al. 2015; Smith et al. 2020; Venesio et al. 2018), aspecto que também foi discutido num trabalho anterior do grupo (Miguez, 2018). Por exemplo, Rodon Font et al. (2022) avaliaram amostras de DNA do tumor e do plasma de casos de câncer colorretal (CRC) e de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC). Em 27,1% dos casos foi identificada no plasma uma nova variante somática não detectada anteriormente no tumor correspondente, das quais 11,9% tinham potencial de impactar decisões clínicas, além de demonstrar que essas novas variantes podem ter um desenvolvimento temporal durante o tratamento.

Um aspecto interessante demonstrado neste estudo foi a diferença entre a quantidade de tDNA detectado no tumor renal adulto e no pediátrico. Para os casos de ccRCC, nos fluidos corpóreos coletados antes da cirurgia (baseline), as FAs médias foram de 1,83% no plasma e

2,66% na urina. Nas coletas de monitoramento em que houve detecção de tDNA, as médias para plasma foram de 2,60% (coleta M1) e 1,66% (M3). Nas amostras de urina de monitoramento, somente uma amostra teve detecção de tDNA, com FA de 1,35% (M3). Já para os casos de TW as médias foram consideravelmente maiores, principalmente na coleta realizada antes do início do tratamento, com FA média de 26,48%, 18,92% e 17,12% no plasma, sedimento e sobrenadante de urina baseline, respectivamente. Nas coletas posteriores, a FA média para plasma continuou se mostrando maior do que em ccRCC na maioria das análises, com FA média de 42,13% (coleta M1) e 2,60% (M2). Nas amostras de urina coletadas após o início do tratamento a FA média cai consideravelmente, sendo 3,50% no sobrenadante de urina M2 e 3,19%/5,16% no sedimento/sobrenadante de urina M3. As razões biológicas para essa diferença entre a quantidade de tDNA liberado no sangue e na urina entre pacientes com ccRCC e TW, principalmente antes do início do tratamento (baseline), ainda não foram determinadas.

Sabe-se que o cfDNA presente no plasma geralmente é composto de células que passaram por apoptose, necrose ou foram ativamente liberadas e, portanto, costuma encontrar-se em estado fragmentado (Jahr et al. 2001; Mouliere et al. 2011). Além disso, nos pacientes com câncer, a quantidade de tDNA na circulação é influenciada pelas características do tumor, tais como sua taxa mitótica, vascularização, necrose, dentre outras, bem como pelo estágio da doença (Jahr et al. 2001; Stroun et al. 2001). Já o DNA identificado na urina pode vir de células intactas (que formam o sedimento urinário), ou do cfDNA presente no sobrenadante. O sedimento urinário é constituído por células esfoliadas do trato geniturinário e seu DNA geralmente se encontra intacto (Su, 2004; Botezatu, 2000). Já o cfDNA presente no sobrenadante da urina é altamente degradado e provém da circulação sanguínea, após a ocorrência de apoptose celular e filtração glomerular (Su, 2004).

Dentro dessas variações quanto à origem do cfDNA encontrado em fluidos corpóreos, sabe-se ainda que a sensibilidade das células de um tumor ao tratamento pode variar e resultar na apoptose ou necrose de subpopulações específicas de clones celulares (Burrell et al. 2013), o que pode alterar a arquitetura mutacional de tumores sólidos e, conseqüentemente, afetar a capacidade de liberação de tDNA em fluidos corpóreos. Esses fatores, juntos com a variação de estadiamento e outros fatores individuais da doença de cada paciente, podem explicar em parte as notáveis diferenças nas FAs do tDNA detectado nos casos de TW e de ccRCC. O mesmo se aplica às discrepâncias observadas no perfil das variantes somáticas detectadas em amostras de fluidos corpóreos em comparação com o DNA do tecido tumoral correspondente, já que em ambas as casuísticas nem todas as variantes identificadas no tumor são observadas nas amostras de plasma ou urina, mesmo em casos de doença mais avançada. De forma geral, ainda são necessárias maiores elucidações sobre os mecanismos de liberação de tDNA em fluidos corpóreos.

Quanto à detecção de tDNA em plasma e urina com TW, os 4 novos casos adicionados ao presente estudo (TW9, TW11, TW12 e TW14) seguem o padrão dos casos apresentados no estudo anterior (TW1 a TW6) (Miguez, 2018; Miguez et al. 2020), onde foi observada presença de tDNA em plasma e/ou urina em todos os pacientes antes do início do tratamento (coleta baseline). Esse achado abre possibilidades concretas para utilizar fluidos corpóreos de pacientes com TW como meio precoce de acesso às características genéticas do tumor, antes mesmo de obter o tecido tumoral após cirurgia.

Quanto a isso, outros estudos também apresentaram resultados promissores para o rastreamento de variantes somáticas específicas em fluidos corpóreos de pacientes com TW. O uso de marcadores de prognóstico já bem estabelecidos para TW, como variantes somáticas em *TP53* e a presença de ganhos de cópia de 1q e perda de heterozigose em 1p e 16q, foram

avaliados no cfDNA de fluidos corpóreos desses pacientes em estudos recentes. Em uma pesquisa realizada por Treger et al. (2018), foram detectadas variantes somáticas no gene *TP53* em amostras de soro, plasma e urina coletadas de quatro casos de TW com anaplasia difusa antes da cirurgia, usando a técnica de ddPCR (do inglês “*digital droplet PCR*”). Os autores observaram que nem todas as amostras de urina apresentaram variantes somáticas em *TP53*, enquanto todas as amostras de soro e/ou plasma analisadas foram positivas. Alterações em *TP53* estão presentes em 50% a 90% dos casos de TW com anaplasia difusa (Maschietto et al. 2014; Ooms et al. 2016; Wegert et al. 2017), o que indica maiores chances de doença mais agressiva, permitindo uma estratificação de prognóstico precoce. Ainda, no estudo de Madanat-Harjuoja et al. (2022), 50 pacientes com TW com estadiamento III ou IV tratados de acordo com o protocolo COG tiveram o DNA de plasma, urina e tumor avaliados para alterações no número de cópias (ganhos de cópia de 1q e perda de heterozigose em 1p e 16q). O tDNA foi detectado no plasma de 82% e na urina de 27% dos pacientes. A presença de tDNA no plasma foi associada a pacientes com tumor de maior estadiamento e não houve associação com a presença de tDNA na urina. A FA máxima de tDNA no plasma e na urina foi de 66% e 90%, respectivamente, de acordo com os achados do presente estudo que mostra níveis acima de 90% de tDNA em plasma de pacientes com doença mais avançada (como o caso TW04, uma paciente metastática que evoluiu a óbito) e de 46% na urina (como no caso TW01, que viria a apresentar metástase meses depois).

A análise por biópsia líquida de forma personalizada, buscando identificar variantes somáticas no tumor de cada paciente diretamente nos fluidos corpóreos, também tem se mostrado uma estratégia promissora. No estudo de Jiménez et al. (2018) foi realizado o sequenciamento de exoma (SNVs) e análise de alterações no número de cópias (CNAs) no cfDNA do plasma, do DNA do tecido tumoral e do DNA de leucócitos de pacientes com diversos

tipos de tumores renais pediátricos, visando obter o diagnóstico preciso de TW antes do acesso à peça tumoral. Dos 18 pacientes recrutados, 14 tinham TW. Ao todo, os autores foram capazes de detectar alterações genéticas somáticas e específicas das células tumorais, como CNAs, SNVs ou ambos, no cfDNA em 10 (55,6%), 17 (94,4%) e 17 (94,4%) dos 18 pacientes avaliados, respectivamente. Dos 14 casos de TW, 12 (85,7%) apresentaram alterações somáticas em genes frequentemente alterados em TW, como variantes em *DROSHA*, *CTNNB1*, *MYCN* e *WT1*. A biópsia líquida pode ser extremamente útil em casos de tumores em que é difícil obter amostras tumorais ou quando a biópsia não é realizada no momento do diagnóstico, o que é frequente em uma considerável proporção de pacientes pediátricos com tumores renais tratados seguindo os protocolos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (SIOP).

Entretanto, em concordância com Jiménez et al. (2018), o presente estudo e nosso estudo anterior (Miguez et al. 2020) mostrou que nem todas as mutações identificadas no fragmento de tumor analisado através do painel TW-35 ou do sequenciamento de exoma foram detectadas em fluidos corpóreos, reforçando a necessidade de mais investigações sobre a biologia do tDNA.

Uma limitação do presente estudo foi a pequena casuística de TW que pôde ser analisada e prejudicou a avaliação da associação da presença de tDNA em plasma e urina com as variáveis clínicas. Por outro lado, para a casuística de ccRCC, foi possível avaliar associações entre estes fatores. Este estudo produziu resultados coerentes com outros trabalhos, sobretudo quanto à relação de tDNA em plasma de pacientes com ccRCC avançado e com tumores maiores. Apesar de não alcançar significância estatística, nossos resultados mostram que quando tDNA positivo, o plasma coletado antes da cirurgia (baseline) e o coletado durante o primeiro ano após cirurgia (M1 + M2) parecem indicar pacientes com massa tumoral de

maior volume ($p=.07$ e $p=.059$, respectivamente). Smith et al. (2020) analisou a presença de tDNA em plasma e urina de pacientes com diferentes subtipos e graus de CCR usando sWGS (do inglês “*shallow whole genome sequencing*”) ou o sequenciamento de um painel de genes mutados em CCR. Os autores observaram que, dentre 12 casos com tDNA positivo em plasma coletado antes da nefrectomia, 10 eram ccRCC, e desses, 9 tinham os maiores tumores da casuística (7,4-23cm). A detecção de tDNA também foi mais comum em pacientes com CCR localmente avançado, caracterizado pela obstrução da veia renal ou trombo tumoral na veia cava inferior. Esses achados estão em consonância com o presente estudo, que também mostrou uma relação entre tDNA presente no plasma coletado antes da cirurgia (baseline) e ccRCC avançado, com graduação pT3. Ainda, nenhum dos dois estudos obteve uma associação entre a detecção de tDNA em amostras de urina e doença avançada ou tamanho tumoral.

Um outro estudo (Yamamoto et al. 2019) avaliou a presença de tDNA no plasma de 53 pacientes com ccRCC através de sequenciamento *target* do cfDNA de plasma e dos DNAs de leucócitos e de tecido tumoral (para 5 casos somente) utilizando um painel de 48 genes frequentemente mutados neste tumor. Os plasmas foram coletados ou antes do tratamento, ou durante ou em ambos os momentos. Foi possível detectar tDNA diretamente no plasma em 16 casos (16/53, 30%) e houve associação entre a presença de tDNA no plasma e tumores com maior tamanho. Ainda, os autores concluíram que pacientes com amostras de plasma com tamanhos de fragmentos de cfDNA menores tendem a apresentar desfechos clínicos piores.

Num terceiro estudo (Pal et al. 2017), que avaliou pacientes com CCR metastáticos em primeira linha de tratamento ou posteriores, foi possível detectar tDNA no plasma de 78,6% dos 220 casos avaliados usando o ensaio Guardant360. Este painel comercial conta com 74 genes frequentemente alterados em tumores sólidos e tem sensibilidade para detectar

variantes com FA de até 0,1%. A alta taxa de detecção se deve aos casos de CCR avançados, o que também é observado em outros tumores. As variantes somáticas observadas no plasma destes pacientes durante terapia de primeira linha e pós-primeira linha sugerem possíveis mecanismos de resistência terapêutica, como variantes em *TP53*, mostrando o potencial da biópsia líquida em casos avançados de CCR como ferramenta para facilitar a seleção de novas terapias direcionadas. Os mesmos autores realizaram um outro estudo para elucidar a presença de correlação entre tDNA no plasma e fatores clínicos destes mesmos pacientes (Maia et al. 2017). Conforme observado no presente estudo e nos estudos anteriores, os autores concluíram que existe uma possível associação entre a detecção de tDNA em plasma e o diâmetro do tumor.

No presente estudo também foi avaliada a predisposição genética ao TW e ao CCR através do sequenciamento de um painel de 126 genes de predisposição ao câncer. Nos 59 casos de TW avaliados, 9 (15,2%) tinham doença bilateral. No entanto, nenhum desses casos bilaterais apresentou variante germinativa com potencial de aumentar o risco genético ao câncer. Em relação aos casos de TW unilaterais, o paciente N07 apresentou uma variante germinativa *nonsense* (que causa um códon de parada prematuro na proteína) no gene *WT1* e que apresentou perda de heterozigose no DNA do tumor, sugerindo a associação do TW com a perda bialélica de *WT1*. Embora seja um caso de doença unilateral, esta paciente passou por uma nefrectomia parcial no rim contralateral ao afetado por TW devido à presença de nefroblastomatose difusa com restos nefrogênicos, embora não tenham sido identificados sinais de malignidade. Os restos nefrogênicos são aglomerados anormalmente persistentes de células embrionárias no tecido renal e são considerados precursores de TW (Beckwith 1998; Fukuzawa e Reeve 2007). Estudos já observaram alterações em *WT1* e também em *WTX* tanto no tecido renal com restos nefrogênicos quanto nos respectivos TW, sugerindo que

estes poderiam ser eventos genéticos precoces relevantes (Bánki et al. 2023). Num outro caso desta casuística (L25), a variante patogênica missense p.Ile157Thr em *CHEK2* é associada a um risco aumentado de câncer de mama, câncer de cólon, câncer de rim, câncer de próstata e câncer de tireóide, porém com baixa penetrância (Cybulski et al. 2004).

Cerca de 2% dos casos de TW tem um histórico familiar (Ruteshouser e Huff 2004). Esses clusters familiares envolvem variantes hereditárias diferentes, como *WT1* e *TRIM28* (Diets et al. 2019), mas algumas famílias ainda não tiveram um gene responsável identificado. No presente estudo identificamos uma variante de significado incerto em *ERCC2* em 3 casos de TW de uma mesma família (c.2069G>A, p.Arg690Gln), sendo o pai afetado e dois filhos também afetados, além de 1 caso da coorte de 59 casos de TW com uma variante no mesmo exon (exon 22 - c.2165G>A, p.Arg722Gln). O gene *ERCC2* (*ERCC Excision Repair 2*), também conhecido como *XPD* (*Xeroderma Pigmentosum Group D*), faz parte do *TFIIH Core Complex Helicase Subunit*. Esse complexo é composto por 9 subunidades e atua na maquinaria de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês “*nucleotide excision repair*”), principal mecanismo de reparo de DNA dos seres vivos, onde regiões defeituosas de uma fita são removidas e ressintetizadas a partir da sequência de nucleotídeos da fita complementar. O *ERCC2* também tem atividade quinase participando da iniciação da transcrição do RNA, fosforilando o domínio C terminal da RNA Polimerase II, que leva ao escape da região promotora e início da transcrição (Greber et al. 2019). Outras funções biológicas também já foram associadas ao *ERCC2*, incluindo regulação do ciclo celular, mitose e função mitocondrial (Houten et al. 2016). Alterações bialélicas em *ERCC2* são associadas ao xeroderma pigmentoso (XP), um conjunto de doenças genéticas que se caracterizam pela alta sensibilidade à radiação ultravioleta (UV), aumentando significativamente o risco de desenvolver câncer de pele em idade precoce. Já alterações monoalélicas, como as observada nos casos deste estudo, foram

descritas como possivelmente relacionadas ao aumento de risco de sarcomas (Ballinger et al. 2016). Até o momento este gene ainda não foi descrito como envolvido na tumorigênese do TW e são necessários mais estudos para esclarecer o papel do *ERCC2* na predisposição a esse tumor.

Já a variante germinativa *missense* p.Ile157Thr no caso L25 da casuística de TW é relativamente comum em populações europeias e norte-americanas e é também associada a um risco aumentado de câncer de mama, câncer de cólon, câncer de rim, câncer de próstata e câncer de tireóide, porém com baixa penetrância (Cybulski et al. 2004). O gene *CHEK2* (*Checkpoint Kinase 2*) codifica uma proteína que regula o checkpoint do ciclo celular, atuando como um supressor tumoral importante em resposta a danos no DNA.

Neste estudo também foram avaliados 72 casos de CCR para variantes germinativas em genes de risco. Em dois casos de ccRCC foi encontrada a variante c.1431_1433dupAAA no gene *FH* (*Fumarate Hydratase*). Este gene, quando alterado de forma constitutiva e monoalélica, está relacionado à síndrome de Leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais (HLRCC) predispondo os pacientes afetados ao CCR com tumores conhecidos por serem altamente agressivos e que, com frequência, apresentam metástases precoces. O gene *FH* codifica a enzima fumarato hidratase do ciclo do ácido cítrico. A perda da função de *FH* por variantes genéticas causa um estado pró-oncogênico complexo por causa do acúmulo de fumarato e 2-succinocisteína (2SC), levando a alterações no potencial migratório de células tumorais, a resposta ao estresse oxidativo e a resposta a danos ao DNA (Kancherla et al. 2020). Entretanto, a variante germinativa c.1431_1433dupAAA em *FH*, encontrada em 2 dos 72 casos deste estudo, tem relatos conflitantes de patogenicidade na literatura. Zhang et al. (2020) sugeriram que, quando em heterozigose, esta alteração não está associada a uma predisposição hereditária aumentada para CCR nem para qualquer outro tipo de câncer, pois

em 7571 casos de pacientes com câncer avaliados, 24 apresentaram esta mesma variante e nenhum deles tinha câncer renal, e de 372 pacientes com câncer renal, nenhum tinha esta variante em *FH*. No entanto, esta variante está associada à Deficiência da fumarato hidratase (FHD) de forma recessiva, o que mostra que a variante apresenta algum nível de impacto na proteína.

A variante c.1431_1433dupAAA está presente em 0,1% da população avaliada no GnomAD e 0,03% no 1000Genomes (rs367543046). Nos 2 casos deste estudo com a variante c.1431_1433dupAAA, o acometimento por ccRCC aconteceu em idade precoce (<45 anos de idade) porém sem apresentar doença agressiva, ambos com tumor de graduação pT1. Ainda, nenhum dos 2 casos apresentou variante somática em *FH* no DNA do tecido tumoral. Um outro autor também relatou 2 casos de CCR que apresentam a variante c.1431_1433dupAAA em *FH*, também com idade precoce (13 e 40 anos de idade), ambos com tumor pT1, e sugere que mais dados são necessários para esclarecer o papel patogênico dessa variante em pacientes com CCR e recomenda sua classificação como de significado incerto (VUS) (Gupta et al. 2021).

Num estudo recente foram analisados os dados de sequenciamento de genoma completo de 1336 casos de CCR e 5834 controles para a identificação de variantes de risco em genes de predisposição ao câncer (Yngvadottir et al. 2022). Dos 1336 casos, 6,4% apresentaram uma ou mais variantes patogênicas (VP) ou provavelmente patogênicas (VPP) em uma gama variada de genes de risco, um número similar aos casos com variantes P ou PP encontrados no presente estudo (7/72 pacientes avaliados, 9,7%). Ainda em Yngvadottir et al. (2022), também foram identificadas 64 variantes de significado incerto em genes previamente relacionados ao CCR e a maioria dos pacientes com variantes P em genes bem estabelecidos por predispor ao CCR tinha idade <50 anos. Esse dado está de acordo com o presente estudo,

onde a média de idade nos casos com variantes germinativas P foi de 46 anos de idade (36–53, mediana de 49 anos). Em Yngvadottir et al. (2022) o gene já relacionado ao CCR com mais variantes P ou PP foi *CHEK2*, numa casuística enriquecida para casos de CCR em europeus, seguido por *MITF* e *SDHA*. No presente estudo não houve nenhum caso com variante P ou VUSp (VUS priorizada) em *CHEK2* ou em *MITF*, talvez pela alta miscigenação da população brasileira. Porém identificamos uma variante VUSp em *SDHA*, em 1 caso de CCR do subtipo Papilífero.

Reconhecemos as limitações do presente estudo, como a casuística muito pequena para a análise de associação de presença de tDNA em urina e plasma e prognóstico de pacientes com TW. Esses pacientes continuarão a ser recrutados em um próximo projeto. Além disso, houve um número elevado de falhas de coleta de amostras de plasma e urina em diferentes momentos na casuística de ccRCC, o que é um risco em projetos prospectivos de longa duração.

De forma geral, o presente estudo mostra o grande potencial da análise da presença de tDNA no plasma de pacientes com TW e ccRCC, principalmente antes do tratamento para os casos de ccRCC, como uma ferramenta auxiliar na estratificação de prognóstico desses pacientes de forma precoce. Em relação à investigação de VPs germinativas em GPC nos pacientes com TW, a perda bialélica de *WT1* em um dos pacientes reforça o envolvimento deste gene na predisposição ao TW. Nos casos de ccRCC, apesar de identificarmos VPs em 5 dos 72 pacientes avaliados, não houve LOH em nenhum deles, não sendo possível inferir uma relação direta destas VPs com o tumor.

6. CONCLUSÕES

- No presente estudo foi desenvolvido um painel contendo 35 genes frequentemente mutados em TW com capacidade de detecção de variantes somáticas em 61,1% dos casos. A continuidade da estratégia de WES nas amostras negativas para variante somática avaliadas com painel de genes associados com TW e simultâneo acompanhamento da literatura se mostrou eficiente na geração de um painel com alta sensibilidade para detectar marcas tumorais específicas em TW.

- A estratégia de biopsia líquida personalizada (PATS) para detecção de tDNA em urina e plasma reforçou a constatação de que DNA tumoral de TW é frequentemente liberado no plasma ou urina sendo uma medida útil e precisa para monitoramento de reposta ao tratamento desses pacientes. O valor da presença de tDNA como biomarcador complementar para estratificação de prognóstico necessita da avaliação de um maior número de casos de TW. Para pacientes com ccRCC, a estratégia PATS para detecção de tDNA no plasma coletado antes da cirurgia apresentou potencial de apoiar a estratificação de prognóstico de pacientes em estágios mais avançados da doença, com graduação pT3.

- A análise germinativa em pacientes com TW revelou que 10,2% (6/59) eram portadores de VPs. A análise de perda do alelo selvagem (LOH) em tumores de 7 pacientes revelou variante bialélica do gene *WT1* no DNA do tumor, confirmando o seu envolvimento com a tumorigênese nesse paciente. O gene *ERCC2* foi revelado como um candidato importante envolvido na predisposição ao TW. A análise germinativa em pacientes com CCR revelou que 7% são portadores de VP (5/72). No entanto, não foi observada a perda do alelo selvagem em nenhum dos 9 tumores em que a análise LOH foi realizada, revelando

complexidade na detecção da inativação dos GPC como desencadeador do processo tumorigênico nos tumores renais adultos e pediátricos (TW).

7. REFERÊNCIAS

- Akhavanfard S, Padmanabhan R, Yehia L, Cheng F, Eng C. Comprehensive germline genomic profiles of children, adolescents and young adults with solid tumors. *Nat. Commun. Nature Research*; 1º de dezembro de 2020;11(1):1–13.
- ALANEE S, CLEMONS J, ZAHND W, SADOWSKI D, DYNDA D. Trichloroethylene Is Associated with Kidney Cancer Mortality: A Population-based Analysis. *Anticancer Res.* 2015;35(7).
- Al-Hussain T, Ali A, Akhtar M. Wilms Tumor: An Update. *Adv. Anat. Pathol.* maio de 2014;21(3):166–73.
- Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA. Cancer J. Clin.* março de 2017;67(2):93–9.
- Astuti D, Morris MR, Cooper WN, Staals RHJ, Wake NC, Fews GA, et al. Germline mutations in *DIS3L2* cause the Perlman syndrome of overgrowth and Wilms tumor susceptibility. *Nat. Genet.* 5 de fevereiro de 2012;44(3):277–84.
- Baillat D, Hakimi MA, Näär AM, Shilatifard A, Cooch N, Shiekhattar R. Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. *Cell.* outubro de 2005;123(2):265–76.
- Ballinger ML, Goode DL, Ray-Coquard I, James PA, Mitchell G, Niedermayr E, et al. Monogenic and polygenic determinants of sarcoma risk: an international genetic study. *Lancet Oncol.* 1º de setembro de 2016;17(9):1261–71.
- Bánki T, Drost J, van den Heuvel-Eibrink MM, Mavinkurve-Groothuis AMC, de Krijger RR. Somatic, Genetic and Epigenetic Changes in Nephrogenic Rests and Their Role in the Transformation to Wilms Tumors, a Systematic Review. *Cancers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; janeiro de 2023;15(5):1363.
- Bardeesy N, Falkoff D, Petruzzi MJ, Nowak N, Zabel B, Adam M, et al. Anaplastic Wilms’ tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nat. Genet.* maio de 1994;7(1):91–7.
- Beckwith JB. Histopathological aspects of renal tumors in children. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1982;100:1–14.
- Beckwith JB. Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations. *Am. J. Med. Genet.* 2 de outubro de 1998;79(4):268–73.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 19 de fevereiro de 2014;6(224):224ra24.
- Birch JM, Breslow N. Epidemiologic features of Wilms tumor. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* dezembro de 1995;9(6):1157–78.

Birkenkamp-Demtröder K, Nordentoft I, Christensen E, Høyer S, Reinert T, Vang S, et al. Genomic Alterations in Liquid Biopsies from Patients with Bladder Cancer. *Eur. Urol.* julho de 2016;70(1):75–82.

Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: A new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin. Chem.* 2000;46(8 I):1078–84.

Breslow N, Olshan A, Beckwith JB, Green DM. Epidemiology of Wilms tumor. *Med. Pediatr. Oncol.* 1993;21(3):172–81.

Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature.* 2013;501(7467):338–45.

Campbell SC, Novick AC, Belldgrun A, Blute ML, Chow GK, Derweesh IH, et al. Guideline for management of the clinical T1 renal mass. *J. Urol.* outubro de 2009;182(4):1271–9.

Carril-Ajuria L, Santos M, Roldán-Romero JM, Rodríguez-Antona C, de Velasco G. Prognostic and Predictive Value of PBRM1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancers.* 19 de dezembro de 2019;12(1):16.

de Carvalho N de A. Investigação de causas genéticas associadas ao desenvolvimento de sarcomas em idade jovem. [Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia]: Fundação Antônio Prudente; 2022.

Chan KCA, Jiang P, Zheng YWL, Liao GJW, Sun H, Wong J, et al. Cancer Genome Scanning in Plasma: Detection of Tumor-Associated Copy Number Aberrations, Single-Nucleotide Variants, and Tumoral Heterogeneity by Massively Parallel Sequencing. *Clin. Chem.* 1º de janeiro de 2013;59(1):211–24.

Cybulski C, Górski B, Huzarski T, Masojć B, Mierzejewski M, Debniak T, et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am. J. Hum. Genet.* dezembro de 2004;75(6):1131–5.

Dagliesh GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature.* 21 de janeiro de 2010;463(7279):360–3.

Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 28 de março de 2013;368(13):1199–209.

De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH, Ng CKY, Nuciforo P, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 1º de setembro de 2014;25(9):1729–35.

Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* setembro de 2008;14(9):985–90.

Diets IJ, Hoyer J, Ekici AB, Popp B, Hoogerbrugge N, van Reijmersdal SV, et al. TRIM28 haploinsufficiency predisposes to Wilms tumor. *Int. J. Cancer.* Wiley-Liss Inc.; 15 de agosto de 2019;145(4):941–51.

Dome JS, Fernandez CV, Mullen EA, Kalapurakal JA, Geller JI, Huff V, et al. Children’s Oncology Group’s 2013 blueprint for research: renal tumors. *Pediatr. Blood Cancer.* NIH Public Access; junho de 2013;60(6):994–1000.

Dome JS, Perlman EJ, Graf N. Risk Stratification for Wilms Tumor: Current Approach and Future Directions. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book. American Society of Clinical Oncology*; 30 de maio de 2014;(34):215–23.

Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. Ann Oncol*; 1º de maio de 2019;30(5):706–20.

Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP*. fevereiro de 2014;13(2):397–406.

Ferreira EN, Barros BDF, de Souza JE, Almeida RV, Torrezan GT, Garcia S, et al. A genomic case study of desmoplastic small round cell tumor: comprehensive analysis reveals insights into potential therapeutic targets and development of a monitoring tool for a rare and aggressive disease. *Hum. Genomics. BioMed Central*; 18 de novembro de 2016;10(1):36.

Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DWY, Kaper F, et al. Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA. *Sci. Transl. Med.* 30 de maio de 2012;4(136):136ra68-136ra68.

Foster KL, Salehabadi SM, Green DM, Xing M, Ness KK, Krull KR, et al. Clinical Assessment of Late Health Outcomes in Survivors of Wilms Tumor. *Pediatrics*. 1º de novembro de 2022;150(5):e2022056918.

Foulkes WD, Bahubeshi A, Hamel N, Pasini B, Asioli S, Baynam G, et al. Extending the phenotypes associated with DICER1 mutations. *Hum. Mutat.* dezembro de 2011;32(12):1381–4.

Fukuzawa R, Reeve AE. Molecular pathology and epidemiology of nephrogenic rests and Wilms tumors. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* setembro de 2007;29(9):589–94.

Gadd S, Huff V, Walz AL, Ooms AHAG, Armstrong AE, Gerhard DS, et al. A Children’s Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. *Nat. Genet.* [Internet]. 21 de agosto de 2017 [citado 29 de agosto de 2017]; Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28825729>

Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat. Genet.* março de 2014;46(3):225–33.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS)*; 8 de março de 2012;366(10):883–92.

Gleason JM, Lorenzo AJ, Bowlin PR, Koyle MA. Innovations in the management of Wilms’ tumor. *Ther. Adv. Urol. SAGE Publications*; agosto de 2014;6(4):165–76.

Gray RE, Harris GT. Renal Cell Carcinoma: Diagnosis and Management. *Am. Fam. Physician.* 1º de fevereiro de 2019;99(3):179–84.

Greber BJ, Toso DB, Fang J, Nogales E. The complete structure of the human TFIID core complex. *eLife*. 12 de março de 2019;8:e44771.

- Gröbner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, Buchhalter I, Kleinheinz K, Rudneva VA, et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*. Nature Publishing Group; 15 de março de 2018;555(7696):321–7.
- Guo G, Gui Y, Gao S, Tang A, Hu X, Huang Y, et al. Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Nat. Genet.* Nat Genet; janeiro de 2011;44(1):17–9.
- Guo N, Lou F, Ma Y, Li J, Yang B, Chen W, et al. Circulating tumor DNA detection in lung cancer patients before and after surgery. *Sci. Rep.* 19 de setembro de 2016;6:33519.
- Gupta S, Shen W, Jimenez RE, Cheville JC. Fumarate Hydratase (FH) c.1431_1433dupAAA (p.Lys477dup) variant is not associated with FH protein deficiency and increased 2SC in two separate patients with renal neoplasia. *Hum. Mutat.* 2021;42(10):1362–4.
- van den Heuvel-Eibrink MM, Hol JA, Pritchard-Jones K, van Tinteren H, Furtwängler R, Verschuur AC, et al. Position paper: Rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP–RTSG 2016 protocol. *Nat. Rev. Urol.* 31 de outubro de 2017;14(12):743–52.
- Hohenstein P, Pritchard-Jones K, Charlton J. The yin and yang of kidney development and Wilms' tumors. *Genes Dev.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1º de março de 2015;29(5):467–82.
- Houten BV, Kuper J, Kisker C. Role of XPD in cellular functions: To TFIIH and beyond. *DNA Repair.* agosto de 2016;44:136–42.
- Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer.* 9 de março de 2017;3:17009.
- Huang WC, Levey AS, Serio AM, Snyder M, Vickers AJ, Raj GV, et al. Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumours: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* setembro de 2006;7(9):735–40.
- Huff V, Jaffe N, Saunders GF, Strong LC, Villalba F, Ruteshouser EC. WT1 exon 1 deletion/insertion mutations in Wilms tumor patients, associated with di- and trinucleotide repeats and deletion hotspot consensus sequences. *Am. J. Hum. Genet.* janeiro de 1995;56(1):84–90.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 15 de fevereiro de 2001;61(4):1659–65.
- Jiménez I, Chicard M, Colmet-Daage L, Clément N, Danzon A, Lapouble E, et al. CIRCULATING TUMOR DNA ANALYSIS ENABLES MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PEDIATRIC RENAL TUMORS AT DIAGNOSIS. *Int. J. Cancer [Internet].* 19 de junho de 2018 [citado 26 de junho de 2018]; Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29923174>
- Kancherla P, Daneshvar M, Sager RA, Mollapour M, Bratslavsky G. Fumarate hydratase as a therapeutic target in renal cancer. *Expert Opin. Ther. Targets.* setembro de 2020;24(9):923–36.
- Karami S, Lan Q, Rothman N, Stewart PA, Lee KM, Vermeulen R, et al. Occupational trichloroethylene exposure and kidney cancer risk: A meta-analysis. *Occup. Environ. Med.* dezembro de 2012;69(12):858–67.

- Kavan S, Kruse TA, Vogsen M, Hildebrandt MG, Thomassen M. Heterogeneity and tumor evolution reflected in liquid biopsy in metastatic breast cancer patients: a review. *Cancer Metastasis Rev.* junho de 2022;41(2):433–46.
- Kelsh MA, Alexander DD, Mink PJ, Mandel JH. Occupational trichloroethylene exposure and kidney cancer: a meta-analysis. *Epidemiol. Camb. Mass.* janeiro de 2010;21(1):95–102.
- Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, Betts D, Adams V, Niggli F, et al. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res.* 15 de agosto de 1999;59(16):3880–2.
- Kroeze SGC, Bijenhof AM, Bosch JLHR, Jans JJM. Diagnostic and prognostic tissue markers in clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers.* 2010;7(6):261–8.
- Leibovich BC, Blute ML, Chevillie JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. Nephron sparing surgery for appropriately selected renal cell carcinoma between 4 and 7 cm results in outcome similar to radical nephrectomy. *J. Urol.* março de 2004;171(3):1066–70.
- Li C-M, Guo M, Borczuk A, Powell CA, Wei M, Thaker HM, et al. Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am. J. Pathol.* junho de 2002;160(6):2181–90.
- Libes J, Hol J, Neto JC de A, Vallance KL, Tinteren H van, Benedetti DJ, et al. Pediatric renal tumor epidemiology: Global perspectives, progress, and challenges. *Pediatr. Blood Cancer.* janeiro de 2023;70(1):e30006.
- Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carcinoma. *J. Urol.* dezembro de 2006;176(6 Pt 1):2353–8.
- Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PFA, Patard JJ, et al. Renal cell carcinoma guideline. *Eur. Urol.* 2007;51(6):1502–10.
- Loo RK, Lieberman SF, Slezak JM, Landa HM, Mariani AJ, Nicolaisen G, et al. Stratifying risk of urinary tract malignant tumors in patients with asymptomatic microscopic hematuria. *Mayo Clin. Proc.* 2013;88(2):129–38.
- Madanat-Harjuoja LM, Renfro LA, Klega K, Tornwall B, Thorner AR, Nag A, et al. Circulating Tumor DNA as a Biomarker in Patients With Stage III and IV Wilms Tumor: Analysis From a Children's Oncology Group Trial, AREN0533. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 10 de setembro de 2022;40(26):3047–56.
- Mahamdallie S, Yost S, Poyastro-Pearson E, Holt E, Zachariou A, Seal S, et al. Identification of new Wilms tumour predisposition genes: an exome sequencing study. *Lancet Child Adolesc. Health.* Elsevier B.V.; 1º de maio de 2019;3(5):322–31.
- Maia MC, Bergerot PG, Dizman N, Hsu J, Jones J, Lanman RB, et al. Association of Circulating Tumor DNA (ctDNA) Detection in Metastatic Renal Cell Carcinoma (mRCC) with Tumor Burden. *Kidney Cancer Clifton Va.* 26 de julho de 2017;1(1):65–70.
- Maschietto M, de Camargo B, Brentani H, Grundy P, Sredni ST, Torres C, et al. Molecular Profiling of Isolated Histological Components of Wilms Tumor Implicates a Common Role for the Wnt Signaling Pathway in Kidney and Tumor Development. *Oncology.* 2008;75(1–2):81–91.

Maschietto M, Williams RD, Chagtai T, Popov SD, Sebire NJ, Vujanic G, et al. TP53 Mutational Status Is a Potential Marker for Risk Stratification in Wilms Tumour with Diffuse Anaplasia. *PLoS ONE*. 14 de outubro de 2014;9(10):e109924.

Meira ITJ e. Utilização de biópsia líquida baseada em detecção de DNA tumoral em urina e plasma em pacientes com carcinoma renal de células claras. [Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia]: Fundação Antônio Prudente; 2022.

Miguez ACK. Uso de urina como biópsia líquida para detecção de DNA tumoral livre em paciente com Tumor de Wilms: Estratégia não invasiva para diagnóstico e monitoramento de resposta à quimioterapia. [Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia]: Fundação Antônio Prudente; 2018.

Miguez ACK, Barros BD de F, Souza JES, Costa CML, Cunha IW, Barbosa PNVP, et al. Assessment of somatic mutations in urine and plasma of Wilms tumor patients. *Cancer Med*. *Cancer Med*; 26 de junho de 2020;cam4.3236.

Millholland JM, Li S, Fernandez CA, Shuber AP. Detection of low frequency FGFR3 mutations in the urine of bladder cancer patients using next-generation deep sequencing. *Res. Rep. Urol*. junho de 2012;4:33–40.

Motzer RJ, Jonasch E, Agarwal N, Bhayani S, Bro WP, Chang SS, et al. Kidney Cancer, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN. J Natl Compr Canc Netw*; 1º de junho de 2017;15(6):804–34.

Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. Lee T, organizador. *PloS One*. 6 de setembro de 2011;6(9):e23418.

Murtaza M, Dawson S-J, Pogrebniak K, Rueda OM, Provenzano E, Grant J, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat. Commun*. 4 de novembro de 2015;6:8760.

Nakata K, Colombet M, Stiller CA, Pritchard-Jones K, Steliarova-Foucher E, IICC-3 Contributors. Incidence of childhood renal tumours: An international population-based study. *Int. J. Cancer*. 15 de dezembro de 2020;147(12):3313–27.

Ohlsson R, Nyström A, Pfeifer-Ohlsson S, Töhönen V, Hedborg F, Schofield P, et al. IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith–Wiedemann syndrome. *Nat. Genet*. 1º de maio de 1993;4(1):94–7.

Olivieri EHR, de Andrade Franco L, Pereira RG, Carvalho Mota LD, Campos AHJFM, Carraro DM. Biobanking Practice: RNA Storage at Low Concentration Affects Integrity. *Biopreservation Biobanking*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers; fevereiro de 2014;12(1):46–52.

Ooms AHAG, Gadd S, Gerhard DS, Smith MA, Guidry Auvil JM, Meerzaman D, et al. Significance of TP53 Mutation in Wilms Tumors with Diffuse Anaplasia: A Report from the Children’s Oncology Group. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 15 de novembro de 2016;22(22):5582–91.

Pal SK, Sonpavde G, Agarwal N, Vogelzang NJ, Srinivas S, Haas NB, et al. Evolution of Circulating Tumor DNA Profile from First-line to Subsequent Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur. Urol*. 1º de outubro de 2017;72(4):557–64.

Pastore G, Znaor A, Spreafico F, Graf N, Pritchard-Jones K, Steliarova-Foucher E. Malignant renal tumours incidence and survival in European children (1978–1997): Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur. J. Cancer*. setembro de 2006;42(13):2103–14.

Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, et al. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell*. 18 de outubro de 1991;67(2):437–47.

Perkins G, Yap TA, Pope L, Cassidy AM, Dukes JP, Riisnaes R, et al. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. Perez-Gracia JL, organizador. *PLoS One*. 7 de novembro de 2012;7(11):e47020.

Petejova N, Martinek A. Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* junho de 2016;160(2):183–94.

Petitprez F, Ayadi M, de Reyniès A, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Job S. Review of Prognostic Expression Markers for Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front. Oncol.* 2021;11:643065.

Rabeh W, Akel S, Eid T, Muwakkit S, Abboud M, Solh HE, et al. Wilms tumor: Successes and challenges in management outside of cooperative clinical trials. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* março de 2016;9(1):20–5.

Rabjerg M. Identification and validation of novel prognostic markers in Renal Cell Carcinoma. *Dan. Med. J.* outubro de 2017;64(10):B5339.

Rakheja D, Chen KS, Liu Y, Shukla AA, Schmid V, Chang T-C, et al. Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nat. Commun.* 5 de setembro de 2014;2:4802.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* maio de 2015;17(5):405–24.

Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, Smith CC, Lang M, Reznik E, et al. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep. Cell Rep*; 3 de abril de 2018;23(1):313–326.e5.

Riediger AL, Dietz S, Schirmer U, Meister M, Heinzmann-Groth I, Schneider M, et al. Mutation analysis of circulating plasma DNA to determine response to EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy of lung adenocarcinoma patients. *Sci. Rep.* 19 de setembro de 2016;6:33505.

Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *The Lancet*. 28 de março de 2009;373(9669):1119–32.

Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Driscoll DR, Brannigan BW, Han M, et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science*. 2 de fevereiro de 2007;315(5812):642–5.

Rodon Font N, No Garbarino Y, Díaz Castillo O, Moya Amoros J, Barrios Sánchez P, Coroleu Lletget D, et al. Concordance analysis between liquid biopsy (ctDNA) and tumor DNA molecular profiles from panel-based next-generation sequencing. *Rev. Espanola Patol. Publicacion Of. Soc. Espanola Anat. Patol. Soc. Espanola Citol.* 2022;55(3):156–62.

Ruteshouser EC, Huff V. Familial Wilms tumor. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 15 de agosto de 2004;129C(1):29–34.

Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: Mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. *Genes. Chromosomes Cancer.* junho de 2008;47(6):461–70.

Samaratunga H, Gianduzzo T, Delahunt B. The ISUP system of staging, grading and classification of renal cell neoplasia. *J. Kidney Cancer VHL.* 20 de julho de 2014;1(3):26–39.

Sankin A, Hakimi AA, Mikkilineni N, Ostrovnaya I, Silk MT, Liang Y, et al. The impact of genetic heterogeneity on biomarker development in kidney cancer assessed by multiregional sampling. *Cancer Med.* dezembro de 2014;3(6):1485–92.

Schmidt LS, Linehan WM. Genetic predisposition to kidney cancer. *Semin. Oncol.* outubro de 2016;43(5):566–74.

Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer.* 12 de junho de 2011;11(6):426–37.

Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* [Internet]. 12 de janeiro de 2022 [citado 14 de janeiro de 2022]; Recuperado de: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2022.html>

Smith CG, Moser T, Mouliere F, Field-Rayner J, Eldridge M, Riediger AL, et al. Comprehensive characterization of cell-free tumor DNA in plasma and urine of patients with renal tumors. *Genome Med. BioMed Central Ltd.;* 28 de fevereiro de 2020;12(1):1–17.

Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clin. Chim. Acta.* 2001. p. 139–42.

Su Y-H, Wang M, Block TM, Landt O, Botezatu I, Serdyuk O, et al. Transrenal DNA as a diagnostic tool: important technical notes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* junho de 2004a;1022(1):81–9.

Su Y-H, Wang M, Brenner DE, Ng A, Melkonyan H, Umansky S, et al. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J. Mol. Diagn. JMD.* maio de 2004b;6(2):101–7.

Suh E, Stratton KL, Leisenring WM, Nathan PC, Ford JS, Freyer DR, et al. Late mortality and chronic health conditions in long-term survivors of early-adolescent and young adult cancers: a retrospective cohort analysis from the Childhood Cancer Survivor Study. *Lancet Oncol.* março de 2020;21(3):421–35.

Tan H-J, Norton EC, Ye Z, Hafez KS, Gore JL, Miller DC. Long-term survival following partial vs radical nephrectomy among older patients with early-stage kidney cancer. *JAMA.* 18 de abril de 2012;307(15):1629–35.

Termuhlen AM, Tersak JM, Liu Q, Yasui Y, Stovall M, Weathers R, et al. Twenty-five year follow-up of childhood Wilms tumor: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Pediatr. Blood Cancer.* 15 de dezembro de 2011;57(7):1210–6.

Thompson RH, Boorjian SA, Lohse CM, Leibovich BC, Kwon ED, Chevillie JC, et al. Radical nephrectomy for pT1a renal masses may be associated with decreased overall survival compared with partial nephrectomy. *J. Urol.* fevereiro de 2008;179(2):468–71; discussion 472-473.

Togneri FS, Ward DG, Foster JM, Devall AJ, Wojtowicz P, Alyas S, et al. Genomic complexity of urothelial bladder cancer revealed in urinary cfDNA. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* agosto de 2016;24(8):1167–74.

Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, Barros BDF, Castro MTM, Correa BR, et al. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nat. Commun.* 9 de junho de 2014;5:4039.

Treger TD, Chagtai T, Butcher R, Cresswell GD, Al-Saadi R, Brok J, et al. Somatic TP53 Mutations Are Detectable in Circulating Tumor DNA from Children with Anaplastic Wilms Tumors. *Transl. Oncol.* 29 de dezembro de 2018;11(6):1301–6.

Treger TD, Chowdhury T, Pritchard-Jones K, Behjati S. The genetic changes of Wilms tumour. *Nat. Rev. Nephrol.* abril de 2019;15(4):240–51.

Turajlic S, Xu H, Litchfield K, Larkin J. Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. 2018 [citado 26 de novembro de 2019]; Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.043>

Varanasi R, Bardeesy N, Ghahremani M, Petrucci MJ, Nowak N, Adam MA, et al. Fine structure analysis of the WT1 gene in sporadic Wilms tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 26 de abril de 1994;91(9):3554–8.

Varela I, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Stephens P, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature.* Nature; 27 de janeiro de 2011;469(7331):539–42.

Venesio T, Siravegna G, Bardelli A, Sapino A. Liquid Biopsies for Monitoring Temporal Genomic Heterogeneity in Breast and Colon Cancers. *Pathobiology.* 2018;85(1–2):146–54.

Verma N, Kumar A. Clinicoepidemiological Profile and Outcome of Children With Wilms Tumor in a Developing Country. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* outubro de 2016;38(7):e213–6.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 29 de março de 2013;339(6127):1546–58.

Vujanic GM, Sandstedt B. The pathology of Wilms' tumour (nephroblastoma): the International Society of Paediatric Oncology approach. *J. Clin. Pathol.* 1º de fevereiro de 2010;63(2):102–9.

Wegert J, Ishaque N, Vardapour R, Geörg C, Gu Z, Bieg M, et al. Mutations in the SIX1/2 Pathway and the DROSHA/DGCR8 miRNA Microprocessor Complex Underlie High-Risk Blastemal Type Wilms Tumors. *Cancer Cell.* 9 de fevereiro de 2015;27(2):298–311.

Wegert J, Vokuhl C, Ziegler B, Ernestus K, Leuschner I, Furtwängler R, et al. TP53 alterations in Wilms tumour represent progression events with strong intratumour heterogeneity that are closely linked but not limited to anaplasia. *J. Pathol. Clin. Res.* Wiley-Blackwell Publishing Ltd; 1º de outubro de 2017;3(4):234–48.

Williams RD, Al-Saadi R, Chagtai T, Popov S, Messahel B, Sebire N, et al. Subtype-specific FBXW7 mutation and MYCN copy number gain in Wilms' tumor. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 1º de abril de 2010;16(7):2036–45.

WM L, PT S, CJ R, CJ C, SS F, C D, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med. N Engl J Med*; 14 de janeiro de 2016;374(2):135–45.

World Health Organisation (OMS). Cancer today [Internet]. 2021 [citado 14 de abril de 2023]. Recuperado de: <http://gco.iarc.fr/today/home>

Wright KD, Green DM, Daw NC. Late effects of treatment for wilms tumor. *Pediatr. Hematol. Oncol.* setembro de 2009;26(6):407–13.

Wu MK, Sabbaghian N, Xu B, Addidou-Kalucki S, Bernard C, Zou D, et al. Biallelic DICER1 mutations occur in Wilms tumours. *J. Pathol.* junho de 2013;230(2):154–64.

Yamamoto Y, Uemura M, Fujita M, Maejima K, Koh Y, Matsushita M, et al. Clinical significance of the mutational landscape and fragmentation of circulating tumor DNA in renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* fevereiro de 2019;110(2):617–28.

Yngvadottir B, Andreou A, Bassaganyas L, Larionov A, Cornish AJ, Chubb D, et al. Frequency of pathogenic germline variants in cancer susceptibility genes in 1336 renal cell carcinoma cases. *Hum. Mol. Genet.* 25 de agosto de 2022;31(17):3001–11.

Zhang J, Nichols KE, Downing JR. Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *N. Engl. J. Med.* 7 de abril de 2016;374(14):1390–1.

Zhang L, Walsh MF, Jairam S, Mandelker D, Zhong Y, Kemel Y, et al. Fumarate hydratase FH c.1431_1433dupAAA (p.Lys477dup) variant is not associated with cancer including renal cell carcinoma. *Hum. Mutat.* janeiro de 2020;41(1):103–9.

Zuzarte PC, Denroche RE, Fehringer G, Katzov-Eckert H, Hung RJ, McPherson JD. A Two-Dimensional Pooling Strategy for Rare Variant Detection on Next-Generation Sequencing Platforms. *PLoS ONE.* 11 de abril de 2014;9(4):e93455.

Apêndice 1. Perfil dos fragmentos de DNA livre presentes nas amostras de plasma.

Caso	Coleta	Tamanho do fragmento (bp)	Concentração do fragmento (pg/uL)	Fração do total (%)
TW01	Baseline	NA	NA	NA
	M1	NA	NA	NA
	M2	NA	NA	NA
TW03	Baseline	170	22,35	100,00%
	M2	169	463,6	91,50%
TW04	Baseline	NA	NA	NA
	M1	NA	NA	NA
	M2	NA	NA	NA
TW05	Baseline	147	175,06	100,00%
	M1	NA	NA	NA
	M2	161	1022,01	98,20%
TW06	Baseline	166	7,07	100,00%
	M1	171	2,74	100,00%
	M2	NA	NA	NA
TW09	Baseline	167	240,45	84,90%
	M1	169	511,37	96,70%
	M2	175	64,97	84,30%
TW11	Baseline	167	1162,67	81,30%
	M1	169	568,25	93,00%
	M2	NA	NA	NA
TW12	M1	170	5,55	100,00%
	M2	NA	NA	NA
TW14		161	3108,91	72,90%
	Baseline	258	28,47	0,80%
		296	163,63	4,60%
	M2	NA	NA	NA
ccRCC 32	Baseline	176	286,56	100,00%
ccRCC 33	Baseline	NA	NA	NA
	M1	169	19,8	100,00%
	M2	172	23,96	100,00%
	M3	174	6,12	100,00%
	M4	175	93,13	100,00%
ccRCC 34	Baseline	176	8,57	100,00%
	M1	173	10,08	100,00%
	M2	NA	NA	NA
ccRCC 37	Baseline	172	82,37	100,00%
	M1	NA	NA	NA
	M2	172	47,2	100,00%
	M3	175	96,08	100,00%
	M4	170	50,05	47,70%

		175	51,77	49,80%
ccRCC 38	Baseline	173	82,02	100,00%
	M2	NA	NA	NA
ccRCC 39	Baseline	171	188	100,00%
	M2	NA	NA	NA
ccRCC 43	Baseline	170	62,96	100,00%
	M1	162	1483,58	96,40%
	M2	169	414,35	100,00%
	M3	168	110,62	100,00%
	M4	167	1109,55	91,90%
ccRCC 44	Baseline	174	171	100,00%
	M1	171	28,31	49,90%
		177	28,19	50,10%
	M2	170	156,25	100,00%
ccRCC 57	Baseline	169	11,9	58,50%
		178	6,77	33,70%
	M2	NA	NA	NA
	M3	174	47,05	100,00%
	M4	171	111,42	100,00%
ccRCC 60	Baseline	169	455,61	98,30%
	M1	168	543,65	100,00%
ccRCC 63	Baseline	NA	NA	NA
	M1	176	1,6	100,00%
	M2	165	15,31	100,00%
	M4	168	7,07	100,00%
ccRCC 64	Baseline	175	2,46	100,00%
ccRCC 65	Baseline	NA	NA	NA
	M1	175	244,95	100,00%
ccRCC 66	Baseline	NA	NA	NA
	M1	NA	NA	NA
	M2	179	3,79	100,00%
ccRCC 69	Baseline	NA	NA	NA
ccRCC 70	Baseline	NA	NA	NA
ccRCC 74	Baseline	167	185,5	50,10%
ccRCC 85	Baseline	NA	NA	NA
	M1	170	70,47	100,00%
	M2	170	129,74	100,00%
	M3	170	124,01	100,00%
	M4	169	93,66	100,00%
ccRCC 88	Baseline	NA	NA	NA
	M1	173	1,63	100,00%
	M2	170	72,78	100,00%
	M3	172	7,08	100,00%
	M4	171	46,96	100,00%
ccRCC 92	Baseline	NA	NA	NA
	M1	172	324,12	90,40%

	M2	169	385,37	100,00%
ccRCC 93	Baseline	174	34,71	100,00%
	M1	176	131,4	100,00%
	M2	172	99,98	100,00%
	M3	171	28,65	49,40%
		176	29,04	50,60%
	M4	172	40,28	35,30%
		177	73,16	64,70%
ccRCC 97	Baseline	177	52,19	89,70%
	M2	181	3,31	100,00%
	M4	175	35,61	100,00%
ccRCC 98	Baseline	NA	NA	NA
	M1	173	222,05	100,00%
	M2	168	90,21	48,30%
		174	95,58	51,70%
	M4	171	79,2	100,00%
ccRCC 100	M2	165	134,85	100,00%
	M3	174	44,76	100,00%
	M4	132	17,35	15,50%
		161	91,85	84,50%
ccRCC 101	M1	177	33,46	100,00%
	M2	177	32,37	100,00%
	M3	175	2,13	100,00%
	M4	168	26,34	100,00%
ccRCC 102	Baseline	NA	NA	NA
	M2	169	20,6	40,70%
		175	25,55	51,10%
	M3	NA	NA	NA
ccRCC 103	Baseline	NA	NA	NA
	M2	167	822,46	95,20%
ccRCC 104	Baseline	NA	NA	NA
ccRCC 106	Baseline	172	6,41	100,00%
	M1	168	83,64	100,00%
	M2	171	130,47	100,00%
ccRCC 109	Baseline	171	44,66	48,70%
		174	46,74	51,30%
	M1	174	204,78	100,00%
	M2	170	42,9	50,50%
		177	41,61	49,50%
	M3	180	0,89	100,00%
	M4	NA	NA	NA
ccRCC 110	Baseline	NA	NA	NA
	M1	170	165,94	100,00%
	M2	176	2,75	100,00%
	M3	178	2,22	100,00%
	M4	172	3,63	100,00%

ccRCC 112	Baseline	NA	NA	NA
	M3	NA	NA	NA
ccRCC 120	M1	175	135,89	100,00%
	M2	174	107,98	100,00%
ccRCC 121	Baseline	NA	NA	NA
	M1	172	56,4	100,00%
	M3	171	25,23	56,40%
		176	14,22	32,10%
		267	4,58	11,50%
ccRCC 123	Baseline	NA	NA	NA
	M2	NA	NA	NA
ccRCC 127	M3	NA	NA	NA
	M4	173	248,06	98,60%
ccRCC 130	Baseline	NA	NA	NA
	M1	173	104,48	100,00%
	M2	175	26,29	100,00%
	M3	176	126,78	100,00%
	M4	169	177,25	100,00%

NA, amostra não avaliável por não ter volume suficiente.

Apêndice 2. Genes contidos nos painéis TW, CCR, CCP e 126 genes.

a) PAINEL TW-35: Genes frequentemente mutados em TW – 35 genes (customizado)

<i>ABCA7</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>DGCR8</i>	<i>INTS1</i>	<i>MYCN</i>	<i>RERE</i>	<i>SIX2</i>	<i>TNRC18</i>	<i>XPO5</i>
<i>ARID1A</i>	<i>DCHS1</i>	<i>DROSHA</i>	<i>KLHL30</i>	<i>NONO</i>	<i>REST</i>	<i>SLC25A5</i>	<i>TP53</i>	<i>WT1</i>
<i>BCOR</i>	<i>DICER1</i>	<i>FBXW7</i>	<i>MAX</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>RYR2</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>TTN</i>	<i>WTX</i>
<i>CHD4</i>	<i>DIS3L2</i>	<i>GLI3</i>	<i>MLL1</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>SIX1</i>	<i>TARBP2</i>	<i>U2AF2</i>	

Preto, cobertura de todos os exons do gene; Verde, cobertura parcial dos exons do gene.

b) PAINEL CCR-28: Genes frequentemente mutados em CCR – 28 genes (Meira, 2022) (customizado)

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

Preto, cobertura de todos os exons do gene; Verde, cobertura parcial dos exons do gene.

c) PAINEL CCP: Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel (Thermo Fisher Scientific, USA)

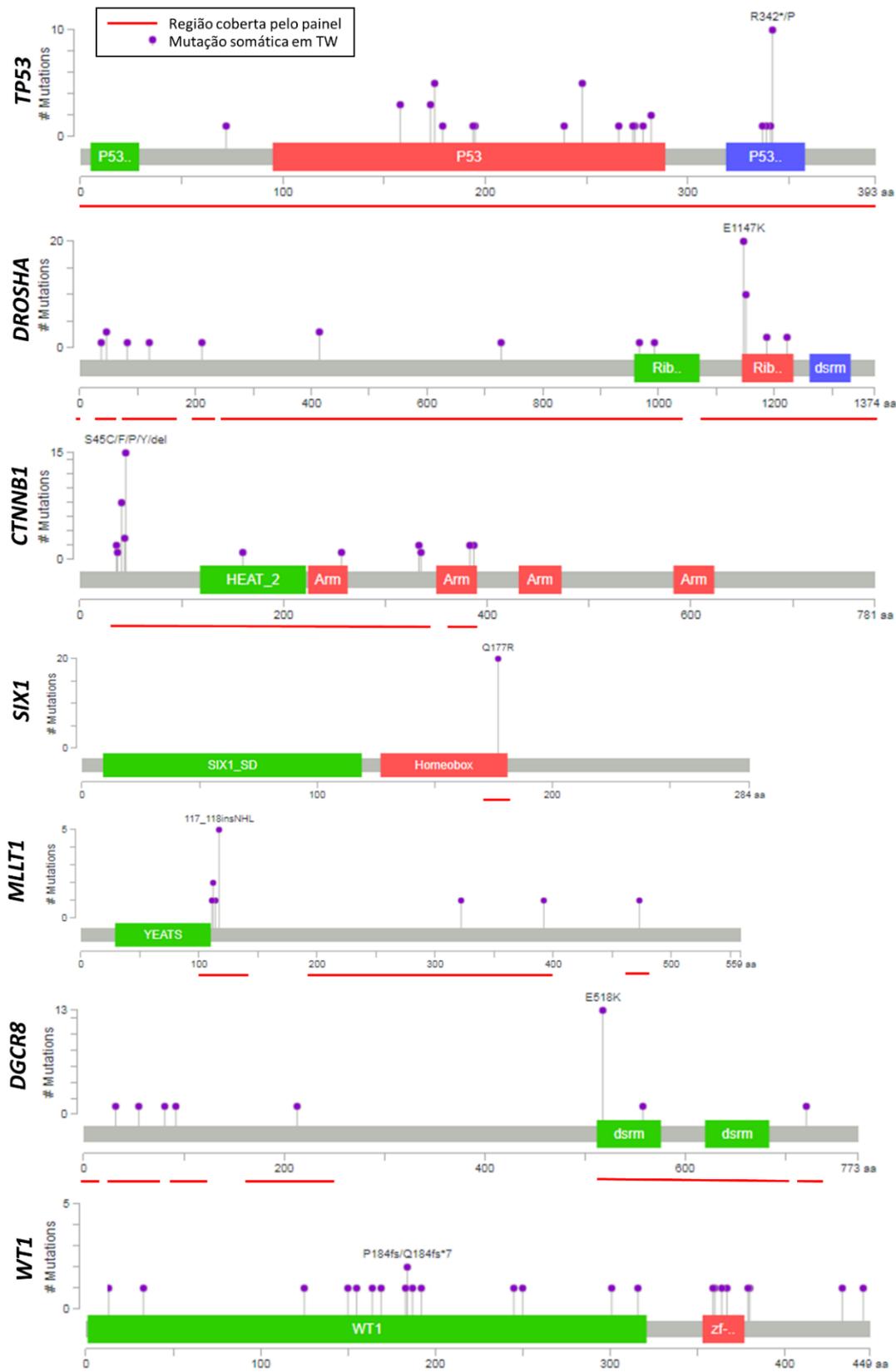
<i>ABL1</i>	<i>BTK</i>	<i>DDR2</i>	<i>FLT1</i>	<i>ITGA9</i>	<i>MLH1</i>	<i>PAK3</i>	<i>RALGDS</i>	<i>TCF12</i>
<i>ABL2</i>	<i>BUB1B</i>	<i>DEK</i>	<i>FLT3</i>	<i>ITGB2</i>	<i>MLL</i>	<i>PALB2</i>	<i>RARA</i>	<i>TCF3</i>
<i>ACVR2A</i>	<i>CARD11</i>	<i>DICER1</i>	<i>FLT4</i>	<i>ITGB3</i>	<i>MLL2</i>	<i>PARP1</i>	<i>RB1</i>	<i>TCF7L1</i>
<i>ADAMTS20</i>	<i>CASC5</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>FN1</i>	<i>JAK1</i>	<i>MLL3</i>	<i>PAX3</i>	<i>RECQL4</i>	<i>TCF7L2</i>
<i>AFF1</i>	<i>CBL</i>	<i>DPYD</i>	<i>FOXL2</i>	<i>JAK2</i>	<i>MLL10</i>	<i>PAX5</i>	<i>REL</i>	<i>TCL1A</i>
<i>AFF3</i>	<i>CCND1</i>	<i>DST</i>	<i>FOXO1</i>	<i>JAK3</i>	<i>MMP2</i>	<i>PAX7</i>	<i>RET</i>	<i>TET1</i>
<i>AKAP9</i>	<i>CCND2</i>	<i>EGFR</i>	<i>FOXO3</i>	<i>JUN</i>	<i>MN1</i>	<i>PAX8</i>	<i>RHOH</i>	<i>TET2</i>
<i>AKT1</i>	<i>CCNE1</i>	<i>EML4</i>	<i>FOXP1</i>	<i>KAT6A</i>	<i>MPL</i>	<i>PBRM1</i>	<i>RNASEL</i>	<i>TFE3</i>
<i>AKT2</i>	<i>CD79A</i>	<i>EP300</i>	<i>FOXP4</i>	<i>KAT6B</i>	<i>MRE11A</i>	<i>PBX1</i>	<i>RNF2</i>	<i>TGFBR2</i>
<i>AKT3</i>	<i>CD79B</i>	<i>EP400</i>	<i>FZR1</i>	<i>KDM5C</i>	<i>MSH2</i>	<i>PDE4DIP</i>	<i>RNF213</i>	<i>TGM7</i>
<i>ALK</i>	<i>CDC73</i>	<i>EPHA3</i>	<i>G6PD</i>	<i>KDM6A</i>	<i>MSH6</i>	<i>PDGFB</i>	<i>ROS1</i>	<i>THBS1</i>
<i>APC</i>	<i>CDH1</i>	<i>EPHA7</i>	<i>GATA1</i>	<i>KDR</i>	<i>MTOR</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>RPS6KA2</i>	<i>TIMP3</i>
<i>AR</i>	<i>CDH11</i>	<i>EPHB1</i>	<i>GATA2</i>	<i>KEAP1</i>	<i>MTR</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>RRM1</i>	<i>TLR4</i>
<i>ARID1A</i>	<i>CDH2</i>	<i>EPHB4</i>	<i>GATA3</i>	<i>KIT</i>	<i>MTRR</i>	<i>PER1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>TLX1</i>
<i>ARID2</i>	<i>CDH20</i>	<i>EPHB6</i>	<i>GDNF</i>	<i>KLF6</i>	<i>MUC1</i>	<i>PGAP3</i>	<i>RUNX1T1</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>ARNT</i>	<i>CDH5</i>	<i>ERBB2</i>	<i>GNA11</i>	<i>KRAS</i>	<i>MUTYH</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>SAMD9</i>	<i>TNFRSF14</i>
<i>ASXL1</i>	<i>CDK12</i>	<i>ERBB3</i>	<i>GNAQ</i>	<i>LAMP1</i>	<i>MYB</i>	<i>PIK3C2B</i>	<i>SBDS</i>	<i>TNK2</i>
<i>ATF1</i>	<i>CDK4</i>	<i>ERBB4</i>	<i>GNAS</i>	<i>LCK</i>	<i>MYC</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SDHA</i>	<i>TOP1</i>
<i>ATM</i>	<i>CDK6</i>	<i>ERCC1</i>	<i>GPR124</i>	<i>LIFR</i>	<i>MYCL1</i>	<i>PIK3CB</i>	<i>SDHB</i>	<i>TP53</i>
<i>ATR</i>	<i>CDK8</i>	<i>ERCC2</i>	<i>GRM8</i>	<i>LPHN3</i>	<i>MYCN</i>	<i>PIK3CD</i>	<i>SDHC</i>	<i>TPR</i>
<i>ATRX</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>ERCC3</i>	<i>GUCY1A2</i>	<i>POT1</i>	<i>MYD88</i>	<i>PIK3CG</i>	<i>SDHD</i>	<i>TRIM24</i>
<i>AURKA</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>ERCC4</i>	<i>HCAR1</i>	<i>LPP</i>	<i>MYH11</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>SEPT9</i>	<i>TRIM33</i>

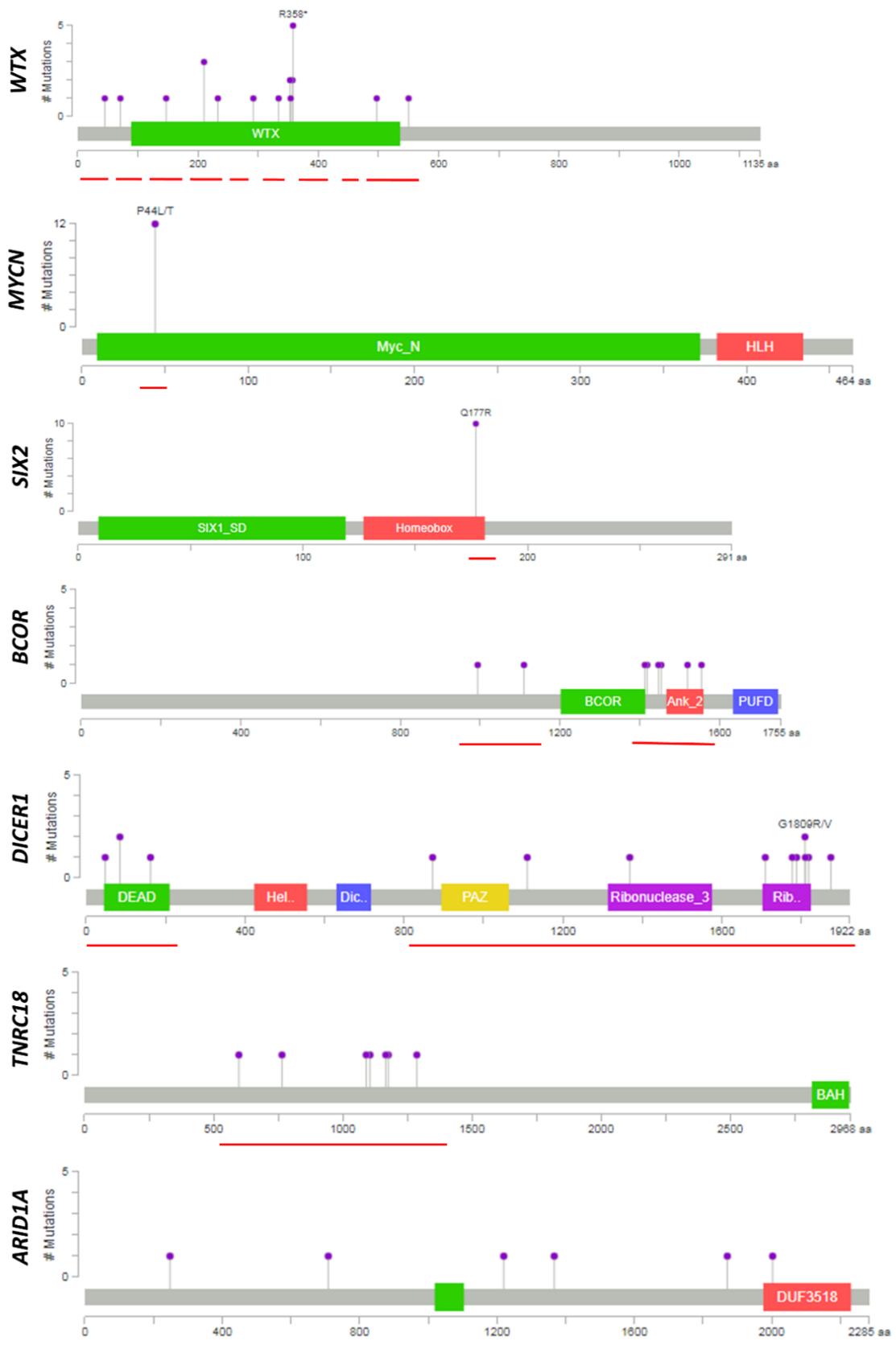
AURKB	CDKN2C	ERCC5	HIF1A	LRP1B	MYH9	PIK3R2	SETD2	TRIP11
AURKC	CEBRA	ERG	HLF	LTF	NBN	PIM1	SF3B1	TRRAP
AXL	CHEK1	ESR1	HNF1A	LTK	NCOA1	PKHD1	SGK1	TSC1
BAI3	CHEK2	ETS1	HOOK3	MAF	NCOA2	PLAG1	SH2D1A	TSC2
BAP1	CIC	ETV1	HRAS	MAFB	NCOA4	PLCG1	SMAD2	TSHR
BCL10	CKS1B	ETV4	HSP90AA1	MAGEA1	NF1	PLEKHG5	SMAD4	UBR5
BCL11A	CMPK1	EXT1	HSP90AB1	MAGI1	NF2	PML	SMARCA4	UGT1A1
BCL11B	COL1A1	EXT2	ICK	MALT1	NFE2L2	PMS1	SMARCB1	USP9X
BCL2	CRBN	EZH2	IDH1	MAML2	NFKB1	PMS2	SMO	VHL
BCL2L1	CREB1	FAM123B	IDH2	MAP2K1	NFKB2	POU5F1	SMUG1	WAS
BCL2L2	CREBBP	FANCA	IGF1R	MAP2K2	NIN	PRARG	SOCS1	WHSC1
BCL3	CRKL	FANCC	IGF2	MAP2K4	NKX2-1	PTCH1	SOX11	WRN
BCL6	CRTC1	FANCD2	IGF2R	MAP3K7	NLRP1	PRDM1	SOX2	WT1
BCL9	CSF1R	FANCF	IKBKB	MAPK1	NOTCH1	PRKAR1A	SRC	XPA
BCR	CSMD3	FANCG	IKBKE	MAPK8	NOTCH2	PRKADC	SSX1	XPC
BIRC2	CTNNA1	FAS	IKZF1	MARK1	NOTCH4	PSIP1	STK11	XPO1
BIRC3	CTNNB1	FBXW7	IL2	MARK4	NPM1	PTGS2	STK36	XRCC2
BIRC5	CYLD	FGFR1	IL21R	MBD1	NRAS	PTEN	SUFU	ZNF384
BLM	CYP2C19	FGFR2	IL6ST	MCL1	NSD1	PTGS2	SYK	ZNF521
BLNK	CYP2D6	FGFR3	IL7R	MDM2	NTRK1	PTPN11	SYNE1	
BMPR1A	DAXX	FGFR4	ING4	MDM4	NTRK3	PTPRD	TAF1	
BRAF	DCC	FH	IRF4	MEN1	NUMA1	PTPRT	TAF1L	
BRD3	DDB2	FLCN	IRS2	MET	NUP214	RAD50	TAL1	
BRIP1	DDIT3	FLI1	ITGA10	MITF	NUP98	RAF1	TBX22	

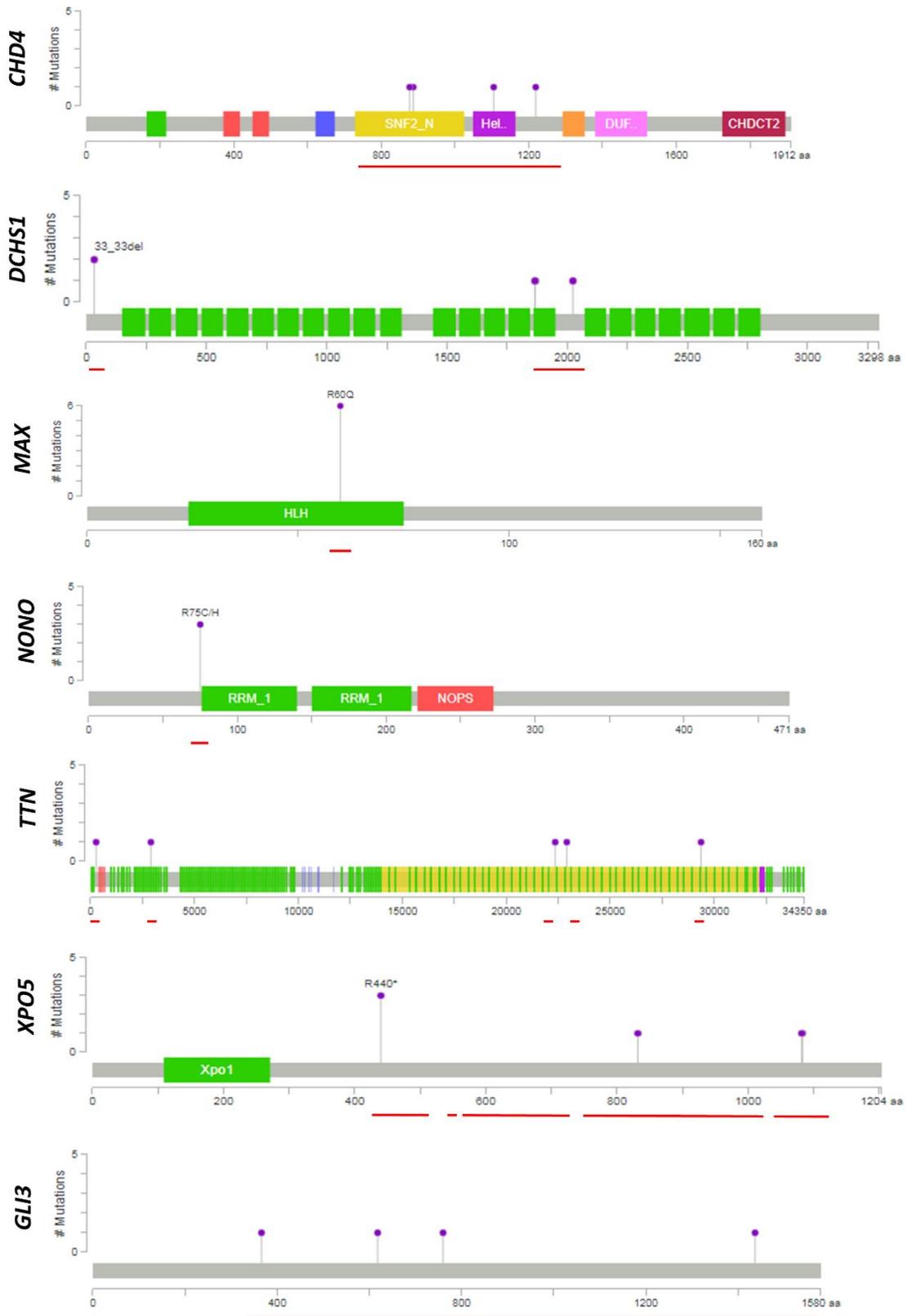
d) Painel 126 genes: Genes de predisposição hereditária ao câncer (de Carvalho, 2022) (customizado)

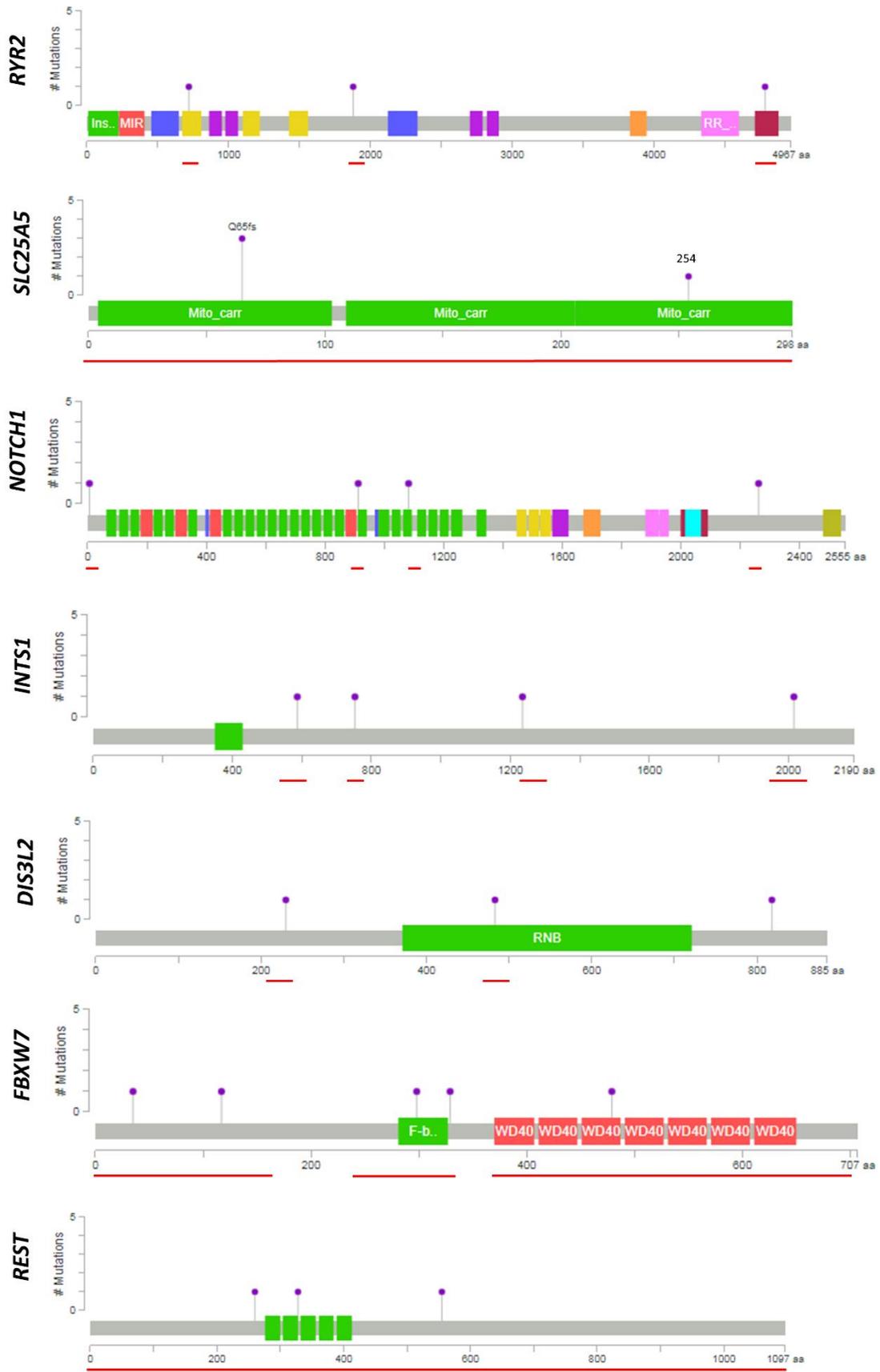
ACD	BUB1	CTR9	ERCC5	HOXB13	MSH3	POLD1	RET	SUFU
AIP	BUB1B	CYLD	EXT1	HRAS	MSH6	POLE	RHBDF2	TERF2IP
AKT1	BUB3	DDB2	EXT2	KIF1B	MSR1	POLH	RUNX1	TERT
ALK	CASR	DICER1	EZH2	KIT	MTAP	POT1	SDHA	TMEM127
APC	CDC73	DIS3L2	FANCC	LZTR1	MUTYH	PRKAR1A	SDHAF2	TP53
ATM	CDH1	EGFR	FANCG	MAX	NBN	PRSS1	SDHB	TSC1
AXIN2	CDK4	EGLN1	FANCM	MC1R	NF1	PTCH1	SDHC	TSC2
BAP1	CDKN1B	ENG	FH	MEN1	NF2	PTEN	SDHD	VHL
BARD1	CDKN1C	EP300	FLCN	MET	NSD1	RAD50	SLX4	WRN
BLM	CDKN2A	EPCAM	GALNT12	MITF	NTHL1	RAD51C	SMAD4	WT1
BMPR1A	CEBPA	ERBB2	GATA2	MLH1	PALB2	RAD51D	SMARCA4	XPA
BRCA1	CHEK2	ERCC2	GPC3	MLH3	PDGFRA	RB1	SMARCB1	XPC
BRCA2	CREBBP	ERCC3	GREM1	MRE11A	PHOX2B	RECQL4	SMARCE1	XRCC2
BRIP1	CTNNA1	ERCC4	HNF1A	MSH2	PMS2	REST	STK11	YAP1

Apêndice 3. Variantes somáticas em 978 amostras de TW, de acordo com levantamento bibliográfico, e regiões cobertas pelo painel de genes.









Apêndice 4. Ruído de sequenciamento para as variantes somáticas avaliadas nas coortes de biópsia líquida usando DNA de leucócito controle (Controles Negativos).

Casuística	Gene	cDNA	Proteína	AF do ruído de sequenciamento (%)
TW	<i>BTK</i>	c.391+8T>C		0,093
TW	<i>CTNNB1</i>	c.1147T>G	p.Trp383Gly	0,117
TW	<i>CTNNB1</i>	c.1149G>T	p.Trp383Cys	0,133
TW	<i>DGCR8</i>	c.1552G>A	p.Glu518Lys	0,098
TW	<i>DROSHA</i>	c.3665A>G	p.Glu1222Gly	0,220
TW	<i>EIF4G1</i>	c.2843C>T	p.Thr948Ile	0,053
TW	<i>INTS1</i>	c.2257G>A	p.Gly753Ser	0,160
TW	<i>KLHL30</i>	c.1253C>A	p.Ala418Asp	0,002
TW	<i>KRT80</i>	c.932C>T	p.Ser311Phe	0,005
TW	<i>MTA2</i>	c.187G>T	p.Ala63Ser	0,020
TW	<i>PHF5A</i>	c.305G>A	p.Arg102His	0,009
TW	<i>PIK3CA</i>	c.2740G>A	p.Gly914Arg	0,028
TW	<i>PPP2R1A</i>	c.547C>T	p.Arg183Trp	0,120
TW	<i>RAD50</i>	c.3835C>T	p.Arg1279Cys	0,090
TW	<i>SERBP1</i>	c.1117C>T	p.Arg373Ter	0,097
TW	<i>SIX1</i>	c.530A>G	p.Gln177Arg	0,288
TW	<i>SUPT7L</i>	c.1217G>A	p.Arg406His	0,053
TW	<i>TMED9</i>	c.208_209del	p.Asp70Glnfs*47	0,130
TW	<i>TNRC18</i>	c.3499del	p.Glu1167Argfs*40	0,120
TW	<i>TTI1</i>	c.1516G>A	p.Asp506Asn	0,007
TW	<i>WT1</i>	c.1495delG	p.Ala499Profs*6	0,245
TW	<i>WTAP</i>	c.485G>A	p.Arg162Gln	0,220
TW	<i>WTX</i>	c.1057C>T	p.Arg353*	0,180
TW	<i>WTX</i>	c.565C>T	p.Gln189Ter	1,392
ccRCC	<i>ARID1A</i>	c.358C>T	p.Pro120Ser	0,010
ccRCC	<i>ARID1A</i>	c.5651_5661delCAGC AGAGGGT	p.Thr1884Asnfs*13	0,000
ccRCC	<i>BAP1</i>	c.41T>G	p.Leu14Arg	0,019
ccRCC	<i>BAP1</i>	c.38G>T	p.Gly13Val	0,018
ccRCC	<i>BAP1</i>	c.37G>C	p.Gly13Arg	0,018
ccRCC	<i>BAP1</i>	c.91G>A	p.Glu31Lys	0,052
ccRCC	<i>BAP1</i>	c.150_155delCAAATG	p.Phe50_Trp52delinsLeu	0,000
ccRCC	<i>BAP1</i>	c.1044delC	p.Asn349Thrfs*13	0,768
ccRCC	<i>BAP1</i>	c.2034dupT	p.Ile679Tyrfs*38	0,173
ccRCC	<i>CDKN2A</i>	c.442G>A	p.Ala148Thr	0,128
ccRCC	<i>FAT1</i>	c.385G>C	p.Val129Leu	0,021
ccRCC	<i>FAT1</i>	c.2080C>T	p.His694Tyr	0,052
ccRCC	<i>FAT1</i>	c.4312A>G	p.Ile1438Val	0,089

ccRCC	<i>FAT1</i>	c.11155G>A	p.Val3719Met	0,082
ccRCC	<i>KDM5C</i>	c.503A>C	p.Gln168Pro	0,185
ccRCC	<i>KDM5C</i>	c.1013delA	p.Lys338Serfs*92	0,366
ccRCC	<i>KDM5C</i>	c.1883_1903del	p.Gln628_Arg634del	0,000
ccRCC	<i>KDM5C</i>	c.2341C>A	p.Leu781Met	0,001
ccRCC	<i>KDM5C</i>	c.3937C>T	p.Gln1313Ter	0,000
ccRCC	<i>KDM5C</i>	c.228+1G>A		0,049
ccRCC	<i>KDM6A</i>	c.771T>A	p.Asp257Glu	0,015
ccRCC	<i>KDM6A</i>	c.2390G>A	p.Cys797Tyr	0,083
ccRCC	<i>KDM6A</i>	c.2515_2518delAACA	p.Asn839Valfs*27	0,000
ccRCC	<i>MET</i>	c.3209T>C	p.Val1070Ala	0,109
ccRCC	<i>MET</i>	c.3335A>T	p.His1112Leu	0,091
ccRCC	<i>MTOR</i>	c.5930C>A	p.Thr1977Lys	0,012
ccRCC	<i>MTOR</i>	c.6644C>T	p.Ser2215Phe	0,086
ccRCC	<i>NF2</i>	c.260C>T	p.Ser87Leu	0,046
ccRCC	<i>NFE2L2</i>	c.86A>G	p.Asp29Gly	0,050
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.457C>T	p.Gln153Ter	0,054
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.36delC	p.Ser13Alafs*32	0,210
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.1649C>T	p.Pro550Leu	0,040
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.1743_1744delAA	p.Lys581Asnfs*12	2,946
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.1844T>A	p.Phe615Tyr	0,006
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.2033G>A	p.Arg678His	0,098
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.2824C>T	p.Arg942Ter	0,080
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.3253G>T	p.Glu1085Ter	0,094
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.3680delA	p.Asn1227Metfs*17	0,374
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.2608C>T	p.Gln870Ter	0,018
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.3616+1G>A		0,031
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.2966-18delC		0,004
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.778-1G>A		0,042
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.3079C>T	p.Arg1027Ter	0,006
ccRCC	<i>PBRM1</i>	c.3092T>A	p.Val1031Asp	0,009
ccRCC	<i>PCF11</i>	c.1378A>G	p.Ile460Val	0,070
ccRCC	<i>PCF11</i>	c.1735A>G	p.Thr579Ala	0,124
ccRCC	<i>PDGFRA</i>	c.824T>A	p.Leu275Ter	0,055
ccRCC	<i>PDGFRB</i>	c.3287C>T	p.Ala1096Val	0,131
ccRCC	<i>PTEN</i>	c.372_379delTAAAGC TG	p.Cys124Trpfs*53	0,000
ccRCC	<i>PTEN</i>	c.812T>C	p.Phe271Ser	0,106
ccRCC	<i>ROS1</i>	c.2672A>G	p.Tyr891Cys	0,104
ccRCC	<i>SETD2</i>	c.1111delA	p.Thr371Glnfs*113	1,435
ccRCC	<i>SETD2</i>	c.1265C>G	p.Ser422Ter	0,009
ccRCC	<i>SETD2</i>	c.2613T>G	p.Tyr871Ter	0,004
ccRCC	<i>SETD2</i>	c.5530delT	p.Ser1844Leufs*21	0,512
ccRCC	<i>SETD2</i>	c.6837dupT	p.Val2280Cysfs*89	0,034

ccRCC	SETD2	c.4918-2A>G		0,110
ccRCC	SETD2	c.4917+1G>A		0,011
ccRCC	SMARCA4	c.3566G>T	p.Arg1189Leu	0,012
ccRCC	SMARCA4	c.3699G>A	p.Met1233Ile	0,079
ccRCC	SMARCA4	c.4160A>T	p.Gln1387Leu	0,036
ccRCC	TP53	c.511G>A	p.Glu171Lys	0,205
ccRCC	TP53	c.824G>T	p.Cys275Phe	0,107
ccRCC	VHL	c.257C>A	p.Pro86His	0,035
ccRCC	VHL	c.262T>A	p.Trp88Arg	0,029
ccRCC	VHL	c.285_287delGCA	p.Gln96del	0,002
ccRCC	VHL	c.182_183delCC	p.Pro61Argfs*70	0,990
ccRCC	VHL	c.221T>A	p.Val74Asp	0,032
ccRCC	VHL	c.233dupA	p.Asn78Lysfs*54	0,008
ccRCC	VHL	c.257_270delCCGTAT GGCTCAAC	p.Pro86Leufs*41	0,000
ccRCC	VHL	c.280G>T	p.Glu94Ter	0,001
ccRCC	VHL	c.287A>C	p.Gln96Pro	0,023
ccRCC	VHL	c.317delG	p.Gly106Alafs*53	0,413
ccRCC	VHL	c.326T>A	p.Ile109Asn	0,024
ccRCC	VHL	c.343C>T	p.His115Tyr	0,027
ccRCC	VHL	c.351G>T	p.Trp117Cys	0,038
ccRCC	VHL	c.397dupA	p.Thr133Asnfs*2	0,473
ccRCC	VHL	c.433C>T	p.Gln145Ter	0,081
ccRCC	VHL	c.458T>C	p.Leu153Pro	0,188
ccRCC	VHL	c.469_480delACTCTG AAAGAG	p.Thr157_Glu160del	0,000
ccRCC	VHL	c.472C>G	p.Leu158Val	0,023
ccRCC	VHL	c.488T>A	p.Leu163His	0,028
ccRCC	VHL	c.524_533delACAGGA GACT	p.Tyr175Trpfs*24	0,000
ccRCC	VHL	c.534_539delGGACAT	p.Asp179_Ile180del	0,000
ccRCC	VHL	c.340+1G>A		0,008

AF, frequência alélica da variante; TW, tumor de Wilms; ccRCC, carcinoma renal de células claras.

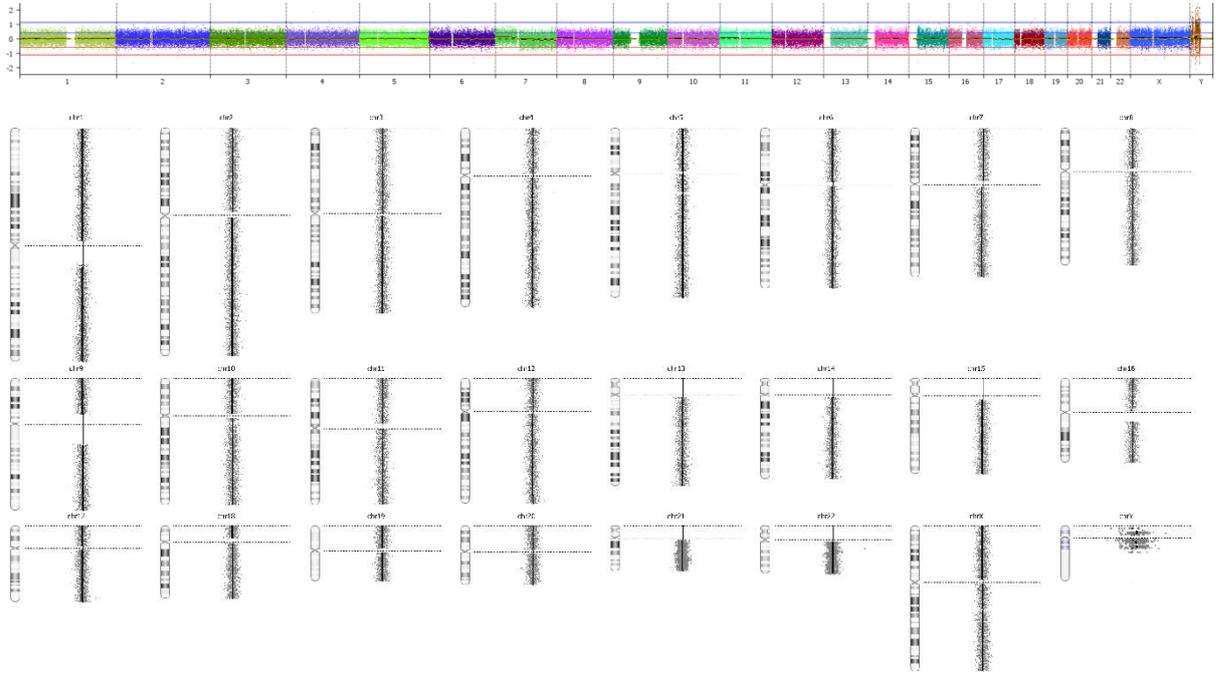
Ruído de sequenciamento obtido através do sequenciamento do DNA de leucócitos de cada paciente.

Apêndice 5. Dados clínicos e patológicos dos casos de TW.

ID	Instituição de origem	Sexo	Idade ao diagnóstico	Estadiamento	Subtipo	Risco	Localização do tumor no rim	Tamanho do tumor	Lateralidade	Multifocalidade	Anaplasia
TW1	ACC	F	5 anos, 11 meses	II	Regressivo	Intermediário	pólo inferior	7,5 x 3,3 cm	E	ND	ND
TW2	ACC	F	3 anos, 11 meses	IV	Misto	Intermediário	terço inferior, médio e superior	4,5x3,5x3,0cm (lesão maior)	E	Presente	ND
TW3	ACC	F	3 anos, 5 meses	IV	Misto	Intermediário	terço médio e inferior	3,3x2,0x0,6cm	Bilateral (info rim E)	ND	ND
TW4	ACC	F	2 anos, 3 meses	IV	Misto	Intermediário	ocupa amplamente o parênquima renal	17,0x15,0x11,0cm	E	ND	Presente, focal
TW5	ACC	F	8 meses	II	Estromal	Intermediário	todo o parênquima renal	15,0x14,0x11,0cm	D	ND	ND
TW6	ACC	F	1 ano, 2 meses	II	Estromal	Intermediário	todo o parênquima renal	8,5x6,5x6,0cm	E	ND	ND
TW9	ACC	F	2 anos, 7 meses	I	Blastema	Alto	-	11,0x8,0x8,0cm	D	ND	ND
TW10	ACC	M	3 anos, 6 meses	I	Regressivo	Intermediário	terço superior/médio	8,0x7,5x7,5cm	D	ND	ND
TW11	RD	F	1 ano, 11 meses	III	Blastema	Alto	pólo superior e terço médio	8,0x6,5x5,6 cm	E	Presente	ND
TW12	ACC	M	5 anos, 7 meses	I	Misto	Intermediário	pólos superior e inferior	17,8x11,0x10,3cm	E	ND	ND
TW13	ACC	F	4 meses	III	Estromal	Intermediário	pólos superior e inferior	13,0 x 8,0 cm	D	ND	ND
TW14	ACC	F	4 anos, 10 meses	III	Blastema	Intermediário	pólo superior e terço médio	17,0 x 17,0 x 14,0 cm	E	ND	ND

ACC, A.C.Camargo Cancer Center; RD, Rede D'Or; F, feminino; M, masculino; E, rim esquerdo; D, rim direito, ND, não detectado

Apêndice 6. Análise do DNA do tecido tumoral do TW da paciente TW2 através de aCGH para avaliação de perda de 11p15 ou ganho de 1q.



Sample: US09423728_rehitr253174817926_S01_CGH_L1105_Oct12_L1_2

Apêndice 7. Frequência alélica (FA) individual de tDNA em amostras de plasma e urina avaliadas em duplicata.

ID	Gene	cDNA change	Protein change	Amostra	Replicata 1	Replicata 2
TW03	<i>DROSHA</i>	c.3665A>G	p.Glu1222Gly	Baseline - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>SUPT7L</i>	c.1217G>A	p.Arg406His	Baseline - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>KLHL30</i>	c.1253C>A	p.Ala418Asp	Baseline - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>EIF4G1</i>	c.2843C>T	p.Thr948Ile	Baseline - Sedimento de urina	9,55%	11,00%
TW03	<i>RAD50</i>	c.3835C>T	p.Arg1279Cys	Baseline - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>TMED9</i>	c.208_209del	p.Asp70Glnfs*47	Baseline - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>MTA2</i>	c.187G>T	p.Ala63Ser	Baseline - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>PPP2R1A</i>	c.547C>T	p.Arg183Trp	Baseline - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>DROSHA</i>	c.3665A>G	p.Glu1222Gly	M2 - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>SUPT7L</i>	c.1217G>A	p.Arg406His	M2 - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>KLHL30</i>	c.1253C>A	p.Ala418Asp	M2 - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>EIF4G1</i>	c.2843C>T	p.Thr948Ile	M2 - Sedimento de urina	4,44%	6,30%
TW03	<i>RAD50</i>	c.3835C>T	p.Arg1279Cys	M2 - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>TMED9</i>	c.208_209del	p.Asp70Glnfs*47	M2 - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>MTA2</i>	c.187G>T	p.Ala63Ser	M2 - Sedimento de urina	ND	ND
TW03	<i>PPP2R1A</i>	c.547C>T	p.Arg183Trp	M2 - Sedimento de urina	ND	ND
TW04	<i>SERBP1</i>	c.1117C>T	p.Arg373Ter	Baseline - Plasma	ND	ND
TW04	<i>WTAP</i>	c.485G>A	p.Arg162Gln	Baseline - Plasma	71,37%	74,20%
TW04	<i>PHF5A</i>	c.305G>A	p.Arg102His	Baseline - Plasma	68,74%	62,05%
TW04	<i>SERBP1</i>	c.1117C>T	p.Arg373Ter	M1 - Plasma	ND	ND
TW04	<i>WTAP</i>	c.485G>A	p.Arg162Gln	M1 - Plasma	94,50%	89,30%
TW04	<i>PHF5A</i>	c.305G>A	p.Arg102His	M1 - Plasma	89,20%	8,90%

ND, não detectado.

Apêndice 8. Análise estatística da associação entre presença de tDNA em plasma e urina de pacientes com TW, variáveis patológicas e desfecho clínico.

a) Teste exato de Fisher - Plasma baseline (antes do tratamento):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma baseline tDNA negativo (n=2)	Plasma baseline tDNA positivo (n=6)	
Progressão da doença			
Ausente	1 (50.0%)	4 (66.7%)	1
Presente	1 (50.0%)	2 (33.3%)	
Subtipo			
Blastema	0 (0.0%)	3 (50.0%)	.464
Outros	2 (100.0%)	3 (50.0%)	
Estadiamento			
III, IV ou V	1 (50.0%)	3 (50.0%)	1
I ou II	1 (50.0%)	3 (50.0%)	
Risco			
Alto	0 (0.0%)	2 (33.3%)	1
Intermediário	2 (100.0%)	4 (66.7%)	
Multifocalidade			
Ausente	1 (50.0%)	5 (83.3%)	.464
Presente	1 (50.0%)	1 (16.7%)	
Anaplasia			
Ausente	2 (100.0%)	5 (83.3%)	1
Presente	0 (0.0%)	1 (16.7%)	
Necrose			
Ausente	0 (0.0%)	1 (16.7%)	1
Presente	2 (100.0%)	5 (83.3%)	
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	1 (50.0%)	5 (83.3%)	.464
Presente	1 (50.0%)	1 (16.7%)	
Infiltração de tecido perirenal			
Ausente	1 (50.0%)	5 (83.3%)	.464
Presente	1 (50.0%)	1 (16.7%)	
Infiltração de seio renal			
Ausente	2 (100.0%)	3 (50.0%)	.464
Presente	0 (0.0%)	3 (50.0%)	

Invasão sanguínea			
Ausente	1 (50.0%)	6 (100.0%)	
Presente	1 (50.0%)	0 (0.0%)	.25
Invasão linfática			
Ausente	1 (50.0%)	5 (83.3%)	
Presente	1 (50.0%)	1 (16.7%)	.464

b) Teste exato de Fisher - Plasma M1 (após quimioterapia neoadjuvante):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma baseline tDNA negativo (n=2)	Plasma baseline tDNA positivo (n=5)	
Progressão da doença			
Ausente	1 (50.0%)	2 (40.0%)	
Presente	1 (50.0%)	3 (60.0%)	1
Subtipo			
Blastema	0 (0.0%)	2 (40.0%)	
Outros	2 (100.0%)	3 (60.0%)	1
Estadiamento			
III, IV ou V	0 (0.0%)	2 (40.0%)	
I ou II	2 (100.0%)	3 (60.0%)	1
Risco			
Alto	0 (0.0%)	2 (40.0%)	
Intermediário	2 (100.0%)	3 (60.0%)	1
Multifocalidade			
Ausente	2 (100.0%)	4 (80.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (20.0%)	1
Anaplasia			
Ausente	2 (100.0%)	4 (80.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (20.0%)	1
Necrose			
Ausente	1 (50.0%)	0 (0.0%)	
Presente	1 (50.0%)	5 (100.0%)	.286
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	1 (50.0%)	5 (100.0%)	
Presente	1 (50.0%)	0 (0.0%)	.286
Infiltração de tecido perirenal			
Ausente	1 (50.0%)	5 (100.0%)	
Presente	1 (50.0%)	0 (0.0%)	.286

Infiltração de seio renal			
Ausente	1 (50.0%)	3 (60.0%)	
Presente	1 (50.0%)	2 (40.0%)	1
Invasão sanguínea			
Ausente	1 (50.0%)	4 (80.0%)	
Presente	1 (50.0%)	1 (20.0%)	1
Invasão linfática			
Ausente	1 (50.0%)	4 (80.0%)	
Presente	1 (50.0%)	1 (20.0%)	1

c) Teste exato de Fisher - Plasma M2 (após cirurgia):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma baseline tDNA negativo (n=8)	Plasma baseline tDNA positivo (n=1)	
Progressão da doença			
Ausente	5 (62.5%)	0 (0.0%)	
Presente	3 (37.5%)	1 (100.0%)	.444
Subtipo			
Blastema	3 (37.5%)	0 (0.0%)	
Outros	5 (62.5%)	1 (100.0%)	1
Estadiamento			
III, IV ou V	4 (50.0%)	0 (0.0%)	
I ou II	4 (50.0%)	1 (100.0%)	1
Risco			
Alto	2 (25.0%)	0 (0.0%)	
Intermediário	6 (75.0%)	1 (100.0%)	1
Multifocalidade			
Ausente	7 (87.5%)	1 (100.0%)	
Presente	1 (12.5%)	0 (0.0%)	1
Anaplasia			
Ausente	7 (87.5%)	1 (100.0%)	
Presente	1 (12.5%)	0 (0.0%)	1
Necrose			
Ausente	1 (12.5%)	0 (0.0%)	
Presente	7 (87.5%)	1 (100.0%)	1
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	7 (87.5%)	0 (0.0%)	
Presente	1 (12.5%)	1 (100.0%)	.222

Infiltração de tecido perirenal			
Ausente	7 (87.5%)	0 (0.0%)	
Presente	1 (12.5%)	1 (100.0%)	.222
Infiltração de seio renal			
Ausente	5 (62.5%)	1 (100.0%)	
Presente	3 (37.5%)	0 (0.0%)	1
Invasão sanguínea			
Ausente	7 (87.5%)	0 (0.0%)	
Presente	1 (12.5%)	1 (100.0%)	.222
Invasão linfática			
Ausente	7 (87.5%)	0 (0.0%)	
Presente	1 (12.5%)	1 (100.0%)	.222

d) Teste exato de Fisher – Urina baseline (sedimento + sobrenadante, antes do tratamento):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma baseline tDNA negativo (n=3)	Plasma baseline tDNA positivo (n=4)	
Progressão da doença			
Ausente	2 (66.7%)	2 (50.0%)	
Presente	1 (33.3%)	2 (50.0%)	1
Subtipo			
Blastema	2 (66.7%)	1 (25.0%)	
Outros	1 (33.3%)	3 (75.0%)	.486
Estadiamento			
III, IV ou V	2 (66.7%)	2 (50.0%)	
I ou II	1 (33.3%)	2 (50.0%)	1
Risco			
Alto	1 (33.3%)	1 (25.0%)	
Intermediário	2 (66.7%)	3 (75.0%)	1
Multifocalidade			
Ausente	2 (66.7%)	4 (100.0%)	
Presente	1 (33.3%)	0 (0.0%)	.428
Anaplasia			
Ausente	3 (100.0%)	3 (75.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1
Necrose			

Ausente	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Presente	3 (100.0%)	4 (100.0%)	1
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	2 (66.7%)	3 (75.0%)	
Presente	1 (33.3%)	1 (25.0%)	1
Infiltração de tecido perirenal			
Ausente	2 (66.7%)	3 (75.0%)	
Presente	1 (33.3%)	1 (25.0%)	1
Infiltração de seio renal			
Ausente	2 (66.7%)	3 (75.0%)	
Presente	1 (33.3%)	1 (25.0%)	1
Invasão sanguínea			
Ausente	3 (100.0%)	3 (75.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1
Invasão linfática			
Ausente	3 (100.0%)	2 (50.0%)	
Presente	0 (0.0%)	2 (50.0%)	.428

e) Teste exato de Fisher - Urina M1 (urina + sobrenadante, após quimioterapia neoadjuvante):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma baseline tDNA negativo (n=2)	Plasma baseline tDNA positivo (n=4)	
Progressão da doença			
Ausente	2 (100.0%)	1 (25.0%)	
Presente	0 (0.0%)	3 (75.0%)	.4
Subtipo			
Blastema	2 (100.0%)	2 (50.0%)	
Outros	0 (0.0%)	2 (50.0%)	.467
Estadiamento			
III, IV ou V	0 (0.0%)	2 (50.0%)	
I ou II	2 (100.0%)	2 (50.0%)	.467
Risco			
Alto	0 (0.0%)	2 (50.0%)	
Intermediário	2 (100.0%)	2 (50.0%)	.467
Multifocalidade			
Ausente	2 (100.0%)	3 (75.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1

Anaplasia			
Ausente	2 (100.0%)	3 (75.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1
Necrose			
Ausente	1 (50.0%)	0 (0.0%)	
Presente	1 (50.0%)	4 (100.0%)	.333
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	2 (100.0%)	4 (100.0%)	
Presente	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1
Infiltração de tecido perirenal			
Ausente	2 (100.0%)	4 (100.0%)	
Presente	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1
Infiltração de seio renal			
Ausente	1 (50.0%)	2 (50.0%)	
Presente	1 (50.0%)	2 (50.0%)	1
Invasão sanguínea			
Ausente	2 (100.0%)	3 (75.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1
Invasão linfática			
Ausente	2 (100.0%)	3 (75.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1

f) Teste exato de Fisher - Urina M2 (sedimento + sobrenadante, após cirurgia):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma baseline tDNA negativo (n=7)	Plasma baseline tDNA positivo (n=2)	
Progressão da doença			
Ausente	4 (57.1%)	1 (50.0%)	
Presente	3 (42.9%)	1 (50.0%)	1
Subtipo			
Blastema	4 (57.1%)	2 (100.0%)	
Outros	3 (42.9%)	0 (0.0%)	.5
Estadiamento			
III, IV ou V	2 (28.6%)	2 (100.0%)	
I ou II	5 (71.4%)	0 (0.0%)	.167
Risco			
Alto	2 (28.6%)	0 (0.0%)	
Intermediário	5 (71.4%)	2 (100.0%)	1

Multifocalidade			
Ausente	6 (85.7%)	1 (50.0%)	
Presente	1 (14.3%)	1 (50.0%)	.416
Anaplasia			
Ausente	7 (100.0%)	1 (50.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (50.0%)	.222
Necrose			
Ausente	1 (14.3%)	0 (0.0%)	
Presente	6 (85.7%)	2 (100.0%)	1
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	5 (71.4%)	2 (100.0%)	
Presente	2 (28.6%)	0 (0.0%)	1
Infiltração de tecido perirenal			
Ausente	5 (71.4%)	2 (100.0%)	
Presente	2 (28.6%)	0 (0.0%)	1
Infiltração de seio renal			
Ausente	5 (71.4%)	1 (50.0%)	
Presente	2 (28.6%)	1 (50.0%)	1
Invasão sanguínea			
Ausente	5 (71.4%)	1 (50.0%)	
Presente	2 (28.6%)	1 (50.0%)	1
Invasão linfática			
Ausente	6 (85.7%)	1 (50.0%)	
Presente	1 (14.3%)	1 (50.0%)	.416

g) Teste exato de Fisher – Urina e plasma baseline (antes do tratamento):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma baseline tDNA negativo (n=5)	Plasma baseline tDNA positivo (n=2)	
Progressão da doença			
Ausente	3 (60.0%)	1 (50.0%)	
Presente	2 (40.0%)	1 (50.0%)	1
Subtipo			
Blastema	2 (40.0%)	1 (50.0%)	
Outros	3 (60.0%)	1 (50.0%)	1
Estadiamento			
III, IV ou V	3 (60.0%)	1 (50.0%)	1

I ou II	2 (40.0%)	1 (50.0%)	
Risco			
Alto	1 (20.0%)	1 (50.0%)	
Intermediário	4 (80.0%)	1 (50.0%)	1
Multifocalidade			
Ausente	4 (80.0%)	2 (100.0%)	
Presente	1 (20.0%)	0 (0.0%)	1
Anaplasia			
Ausente	5 (100.0%)	1 (50.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (50.0%)	.285
Necrose			
Ausente	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Presente	5 (100.0%)	2 (100.0%)	1
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	3 (60.0%)	2 (100.0%)	
Presente	2 (40.0%)	0 (0.0%)	1
Infiltração de tecido perirenal			
Ausente	3 (60.0%)	2 (100.0%)	
Presente	2 (40.0%)	0 (0.0%)	1
Infiltração de seio renal			
Ausente	4 (80.0%)	1 (50.0%)	
Presente	1 (20.0%)	1 (50.0%)	1
Invasão sanguínea			
Ausente	4 (80.0%)	2 (100.0%)	
Presente	1 (20.0%)	0 (0.0%)	1
Invasão linfática			
Ausente	4 (80.0%)	1 (50.0%)	
Presente	1 (20.0%)	1 (50.0%)	1

h) Teste exato de Fisher - Urina e plasma M1 (após quimioterapia neoadjuvante):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma baseline tDNA negativo (n=2)	Plasma baseline tDNA positivo (n=4)	
Progressão da doença			
Ausente	2 (100.0%)	1 (25.0%)	
Presente	0 (0.0%)	3 (75.0%)	.4
Subtipo			

Blastema	0 (0.0%)	2 (50.0%)	
Outros	2 (100.0%)	2 (50.0%)	.466
Estadiamento			
III, IV ou V	0 (0.0%)	2 (50.0%)	
I ou II	2 (100.0%)	2 (50.0%)	.466
Risco			
Alto	0 (0.0%)	2 (50.0%)	
Intermediário	2 (100.0%)	2 (50.0%)	.466
Multifocalidade			
Ausente	2 (100.0%)	3 (75.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1
Anaplasia			
Ausente	2 (100.0%)	3 (75.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1
Necrose			
Ausente	1 (50.0%)	0 (0.0%)	
Presente	1 (50.0%)	4 (100.0%)	.333
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	2 (100.0%)	4 (100.0%)	
Presente	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1
Infiltração de tecido perirenal			
Ausente	2 (100.0%)	4 (100.0%)	
Presente	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1
Infiltração de seio renal			
Ausente	1 (50.0%)	2 (50.0%)	
Presente	1 (50.0%)	2 (50.0%)	1
Invasão sanguínea			
Ausente	2 (100.0%)	3 (75.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1
Invasão linfática			
Ausente	2 (100.0%)	3 (75.0%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1

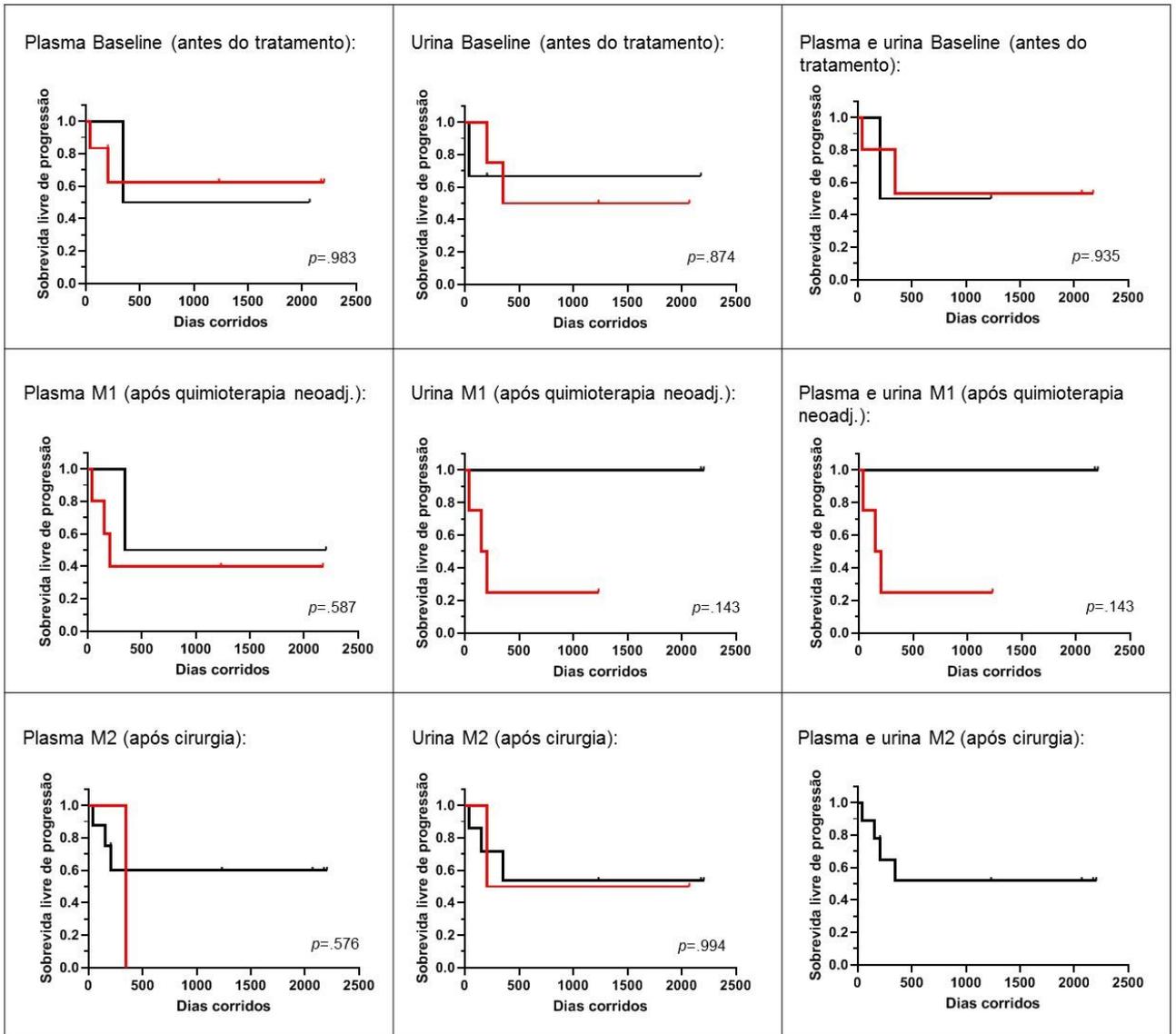
i) Teste exato de Fisher - Urina e plasma M2 (após cirurgia):

Análise de associação não realizada porque na coleta M2 não há pacientes com plasma e urina tDNA positivos simultaneamente.

Apêndice 9. Curvas de sobrevida livre de progressão e de sobrevida global dos casos de TW

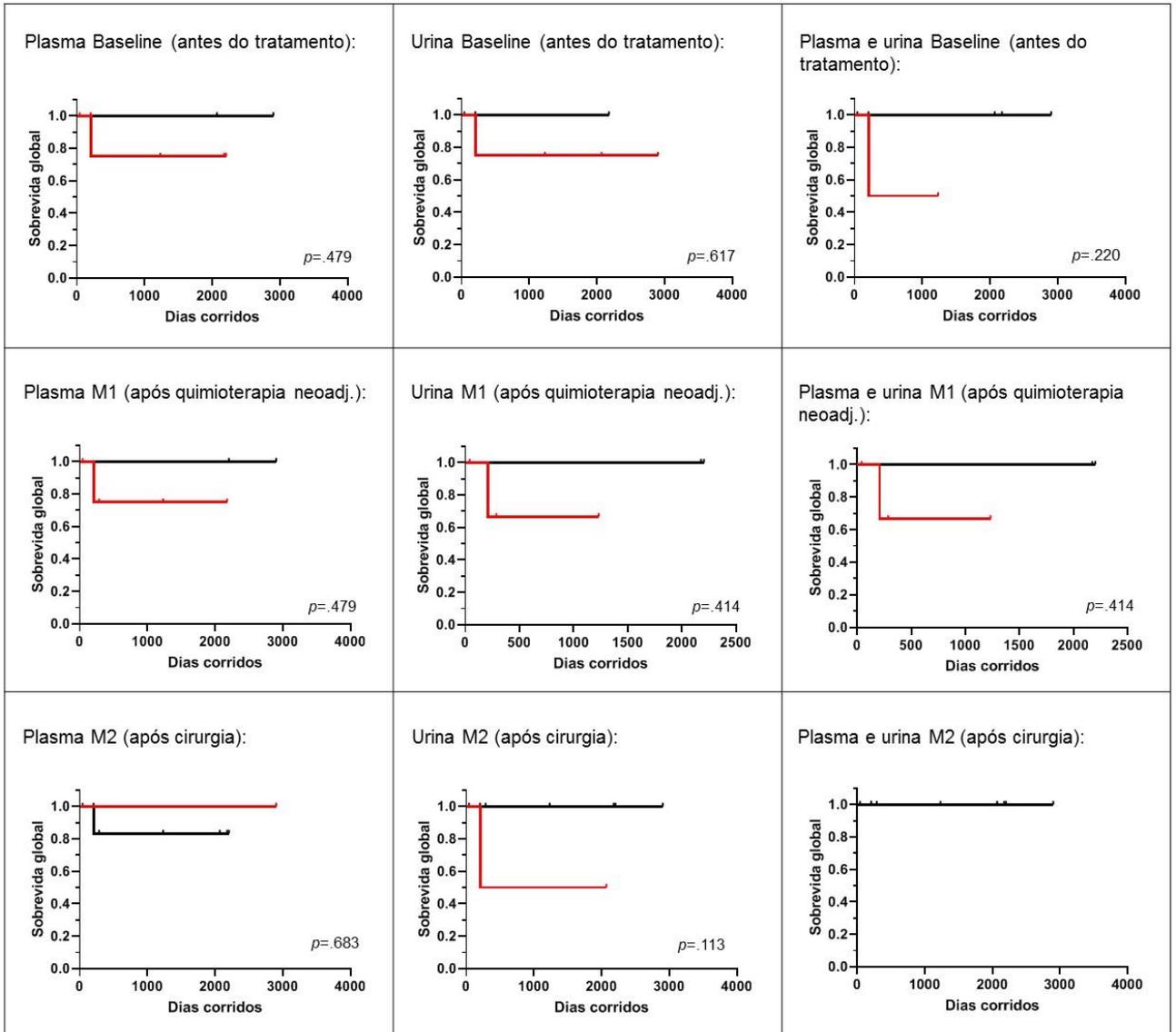
a) Sobrevida livre de progressão:

— tDNA positivos
— tDNA negativos



b) Sobrevida global:

— tDNA positivos
— tDNA negativos



121	M	65	Parcial	pT3a	4	-	3,5x3,5x3,0cm	D	Presente 10%	Presente 5%	ND	Presente	Presente	ND	ND	ND	Metástase (ossos)
122	M	52	Parcial	pT1a	3	-	1,2x1,0cm	E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
123	F	44	Parcial	pT1a	1	-	1,7x1,4cm	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
124	M	56	Parcial	pT1a	3	-	2,5x2,0cm	E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
127	M	70	Radical	pT3b	3	Pólo superior	8,0x4,5x3,0cm	D	ND	ND	ND	Presente	Presente	Presente	ND	ND	Metástase (pulmão)
130	F	40	Radical	pT3b	4	Pólo superior	20,5x9,0x9,0cm	E	Presente 5%	Presente 5%	Presente 10%	Presente	Presente	Presente	Presente	ND	Metástase (coluna vertebral)

F, feminino; M, masculino, E, rim esquerdo; D, rim direito; ND, não detectado.

Apêndice 11. Análise estatística da associação entre presença de tDNA em plasma e urina de pacientes com ccRCC, variáveis patológicas e desfecho clínico.

a) Teste exato de Fisher - Plasma baseline (antes da cirurgia):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma baseline tDNA negativo (n=28)	Plasma baseline tDNA positivo (n=4)	
Progressão da doença			
Ausente	25 (89.3%)	1 (25.0%)	.015*
Presente	3 (10.7%)	3 (75.0%)	
Presença de comp. sarcomatóide			
Ausente	26 (92.8%)	1 (25.0%)	.008*
Presente	2 (7.2%)	3 (75.0%)	
Presença de comp. rabdóide			
Ausente	26 (92.8%)	0 (0.0%)	<.001*
Presente	2 (7.2%)	4 (100%)	
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	24 (85.7%)	1 (25.0%)	.025*
Presente	4 (14.3%)	3 (75.0%)	
Infiltração de gordura perirenal			
Ausente	26 (92.8%)	1 (25.0%)	.008*
Presente	2 (7.2%)	3 (75.0%)	
Infiltração sanguínea			
Ausente	27 (96.4%)	2 (50.0%)	.034*
Presente	1 (3.6%)	2 (50.0%)	
Infiltração linfática			
Ausente	28 (100%)	2 (50.0%)	.012*
Presente	0 (0.0%)	2 (50.0%)	
Infiltração perineural			
Ausente	28 (100%)	3 (75.0%)	.125
Presente	0 (0.0%)	1 (25.0%)	
Gradação ISUP			
IV	3 (10.7%)	4 (100%)	.001*
I a III	25 (89.3%)	0 (0.0%)	
Estadiamento			
pT3	4 (14.3%)	4 (100%)	.002*
pT1 ou pT2	24 (85.7%)	0 (0.0%)	

Necrose tumoral			
Ausente	23 (82.2%)	1 (25.0%)	
Presente	5 (17.8%)	3 (75.0%)	.039*
Margens cirúrgicas			
Comprometidas	2 (7.2%)	2 (50.0%)	
Livres	22 (78.6%)	2 (50.0%)	.254

b) Teste exato de Fisher - Plasma M1 + M2 (1º ano após cirurgia):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma M1 + M2 tDNA negativo (n=27)	Plasma M1 + M2 tDNA positivo (n=2)	
Progressão da doença			
Ausente	24 (88,9%)	1 (50%)	
Presente	3 (11.1%)	1 (50%)	.261
Presença de comp. sarcomatóide			
Ausente	22 (81.5%)	1 (50%)	
Presente	5 (18.5%)	1 (50%)	.377
Presença de comp. rabdoide			
Ausente	22 (81.5%)	2 (100%)	
Presente	5 (18.5%)	0 (0.0%)	.377
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	22 (81.5%)	1 (50%)	
Presente	5 (18.5%)	1 (50%)	.377
Infiltração de gordura perirenal			
Ausente	25 (92.6%)	1 (50%)	
Presente	2 (7.4%)	1 (50%)	.2
Infiltração sanguínea			
Ausente	25 (92.6%)	1 (50%)	
Presente	2 (7.4%)	1 (50%)	.199
Infiltração linfática			
Ausente	26 (96.3%)	1 (50%)	
Presente	1 (3.7%)	1 (50%)	.135
Infiltração perineural			
Ausente	27 (100%)	1 (50%)	
Presente	0 (0.0%)	1 (50%)	.069
Gradação ISUP			
IV	7 (25.9%)	2 (100%)	
I a III	20 (74.1%)	0 (0.0%)	.089

Estadiamento			
pT3	6 (22.2%)	1 (50%)	
pT1 ou pT2	21 (77.8%)	1 (50%)	.431
Necrose tumoral			
Ausente	19 (70.4%)	1 (50%)	
Presente	8 (29.6%)	1 (50%)	.532
Margens cirúrgicas			
Comprometidas	5 (18.5%)	1 (50%)	
Livres	22 (81.5%)	1 (50%)	.377

c) Teste exato de Fisher - Plasma M3 + M4 (2º e 3º anos após cirurgia):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma M3 + M4 tDNA negativo (n=18)	Plasma M3 + M4 tDNA positivo (n=2)	
Progressão da doença			
Ausente	14 (77.8%)	2 (100%)	
Presente	4 (22.2%)	0 (0.0%)	1
Presença de comp. sarcomatóide			
Ausente	14 (77.8%)	2 (100%)	
Presente	4 (22.2%)	0 (0.0%)	1
Presença de comp. rabdóide			
Ausente	15 (83.3%)	2 (100%)	
Presente	3 (16.7%)	0 (0.0%)	.368
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	13 (72.2%)	2 (100%)	
Presente	5 (27.8%)	0 (0.0%)	1
Infiltração de gordura perirenal			
Ausente	15 (83.3%)	2 (100%)	
Presente	3 (16.7%)	0 (0.0%)	1
Infiltração sanguínea			
Ausente	15 (83.3%)	2 (100%)	
Presente	3 (16.7%)	0 (0.0%)	1
Infiltração linfática			
Ausente	17 (94.4%)	2 (100%)	
Presente	1 (5.6%)	0 (0.0%)	1
Infiltração perineural			
Ausente	18 (100%)	2 (100%)	
Presente	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1

Gradação ISUP			
IV	5 (27.8%)	2 (100%)	
I a III	13 (72.2%)	0 (0.0%)	.521
Estadiamento			
pT3	6 (33.3%)	2 (100%)	
pT1 ou pT2	12 (66.7%)	0 (0.0%)	1
Necrose tumoral			
Ausente	13 (72.2%)	2 (100%)	
Presente	5 (27.8%)	0 (0.0%)	.521
Margens cirúrgicas			
Comprometidas	4 (22.2%)	2 (100%)	
Livres	14 (77.8%)	0 (0.0%)	.447

d) Teste exato de Fisher - Urina baseline (antes da cirurgia):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Urina baseline tDNA negativo (n=28)	Urina baseline tDNA positivo (n=4)	
Progressão da doença			
Ausente	24 (85.7%)	3 (75.0%)	
Presente	4 (14.3%)	1 (25.0%)	.512
Presença de comp. sarcomatóide			
Ausente	25 (89.3%)	3 (75.0%)	
Presente	3 (10.7%)	1 (25.0%)	.431
Presença de comp. rabdoide			
Ausente	25 (89.3%)	2 (50.0%)	
Presente	3 (10.7%)	2 (50.0%)	.105
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	23 (82.2%)	2 (50.0%)	
Presente	5 (17.8%)	2 (50.0%)	.201
Infiltração de gordura perirenal			
Ausente	24 (85.7%)	3 (75.0%)	
Presente	4 (14.3%)	1 (25.0%)	.512
Infiltração sanguínea			
Ausente	26 (92.8%)	4 (100%)	
Presente	2 (7.2%)	0 (0.0%)	1
Infiltração linfática			
Ausente	26 (92.8%)	4 (100%)	
Presente	2 (7.2%)	0 (0.0%)	1

Infiltração perineural			
Ausente	27 (96.4%)	4 (100%)	
Presente	1 (3.6%)	0 (0.0%)	1
Graduação ISUP			
IV	5 (17.8%)	2 (50.0%)	
I a III	23 (82.2%)	2 (50.0%)	.201
Estadiamento			
pT3	5 (17.8%)	2 (50.0%)	
pT1 ou pT2	23 (82.2%)	2 (50.0%)	.201
Necrose tumoral			
Ausente	22 (78.6%)	3 (75.0%)	
Presente	6 (21.4%)	1 (25.0%)	1
Margens cirúrgicas			
Comprometidas	7 (25.0%)	0 (0.0%)	
Livres	21 (75.0%)	4 (100%)	.552

e) Teste exato de Fisher - Urina M1 + M2 (1º ano após cirurgia):

Análise de associação não realizada porque as amostras de urina M1 + M2 foram tDNA negativas para todos os pacientes.

f) Teste exato de Fisher - Urina M3 + M4 (2º e 3º anos após cirurgia):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Urina M3 + M4 tDNA negativo (n=17)	Urina M3 + M4 tDNA positivo (n=1)	
Progressão da doença			
Ausente	13 (76.5%)	1 (100%)	
Presente	4 (23.5%)	0 (0.0%)	1
Presença de comp. sarcomatóide			
Ausente	14 (82.3%)	1 (100%)	
Presente	3 (17.7%)	0 (0.0%)	1
Presença de comp. rabdóide			
Ausente	13 (76.5%)	1 (100%)	
Presente	4 (23.5%)	0 (0.0%)	1
Infiltração de cápsula renal			
Ausente	13 (76.5%)	0 (0.0%)	
Presente	4 (23.5%)	1 (100%)	.278
Infiltração de gordura perirenal			

Ausente	14 (82.3%)	1 (100%)	
Presente	3 (17.7%)	0 (0.0%)	1
Infiltração sanguínea			
Ausente	14 (82.3%)	1 (100%)	
Presente	3 (17.7%)	0 (0.0%)	1
Infiltração linfática			
Ausente	16 (94.1%)	1 (100%)	
Presente	1 (5.9%)	0 (0.0%)	1
Infiltração perineural			
Ausente	17 (100%)	1 (100%)	
Presente	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1
Gradação ISUP			
IV	5 (29.4%)	0 (0.0%)	
I a III	12 (70.6%)	1 (100%)	1
Estadiamento			
pT3	6 (35.3%)	0 (0.0%)	
pT1 ou pT2	11 (64.7%)	1 (100%)	1
Necrose tumoral			
Ausente	12 (70.6%)	1 (100%)	
Presente	5 (29.4%)	0 (0.0%)	1
Margens cirúrgicas			
Comprometidas	4 (23.5%)	0 (0.0%)	
Livres	13 (76.5%)	1 (100%)	1

g) Teste exato de Fisher - Plasma e urina baseline (antes da cirurgia):

VARIÁVEIS:	Nº de pacientes (%)		p valor
	Plasma e urina baseline tDNA negativo (n=28)	Plasma e urina baseline positivo (n=2)	
Progressão da doença			
Ausente	24 (85.7%)	1 (50.5%)	
Presente	4 (14.3%)	1 (50.5%)	.310
Presença de comp. sarcomatóide			
Ausente	25 (89.3%)	1 (50.5%)	
Presente	3 (10.7%)	1 (50.5%)	.253
Presença de comp. rabdóide			
Ausente	25 (89.3%)	0 (0.0%)	
Presente	3 (10.7%)	2 (100.0%)	.023*

Infiltração de cápsula renal			
Ausente	23 (82.1%)	1 (50.5%)	
Presente	5 (17.9%)	1 (50.5%)	.366
Infiltração de gordura perirenal			
Ausente	24 (85.7%)	1 (50.5%)	
Presente	4 (14.3%)	1 (50.5%)	.310
Infiltração sanguínea			
Ausente	26 (92.8%)	2 (100.0%)	
Presente	2 (7.2%)	0 (0.0%)	1
Infiltração linfática			
Ausente	26 (92.8%)	2 (100.0%)	
Presente	2 (7.2%)	0 (0.0%)	1
Infiltração perineural			
Ausente	27 (96.4%)	2 (100.0%)	
Presente	1 (3.6%)	0 (0.0%)	1
Gradação ISUP			
IV	4 (14.3%)	2 (100.0%)	
I a III	24 (85.7%)	0 (0.0%)	.034*
Estadiamento			
pT3	5 (17.9%)	2 (100.0%)	
pT1 ou pT2	23 (82.1%)	0 (0.0%)	.048*
Necrose tumoral			
Ausente	22 (78.6%)	1 (50.5%)	
Presente	6 (21.4%)	1 (50.5%)	.418
Margens cirúrgicas			
Comprometidas	7 (25.0%)	0 (0.0%)	
Livres	21 (75.0%)	2 (100.0%)	1

e) Teste exato de Fisher – Plasma e urina M1 + M2 (1º ano após cirurgia) e Plasma e urina M3 + M4 (2º e 3º anos após cirurgia):

Análise de associação não realizada porque nas coletas M1 + M2 e M3 + M4 não há pacientes com plasma e urina tDNA positivos simultaneamente.

f) Teste U de Mann-Whitney para análise de variáveis quantitativas: idade ao diagnóstico.

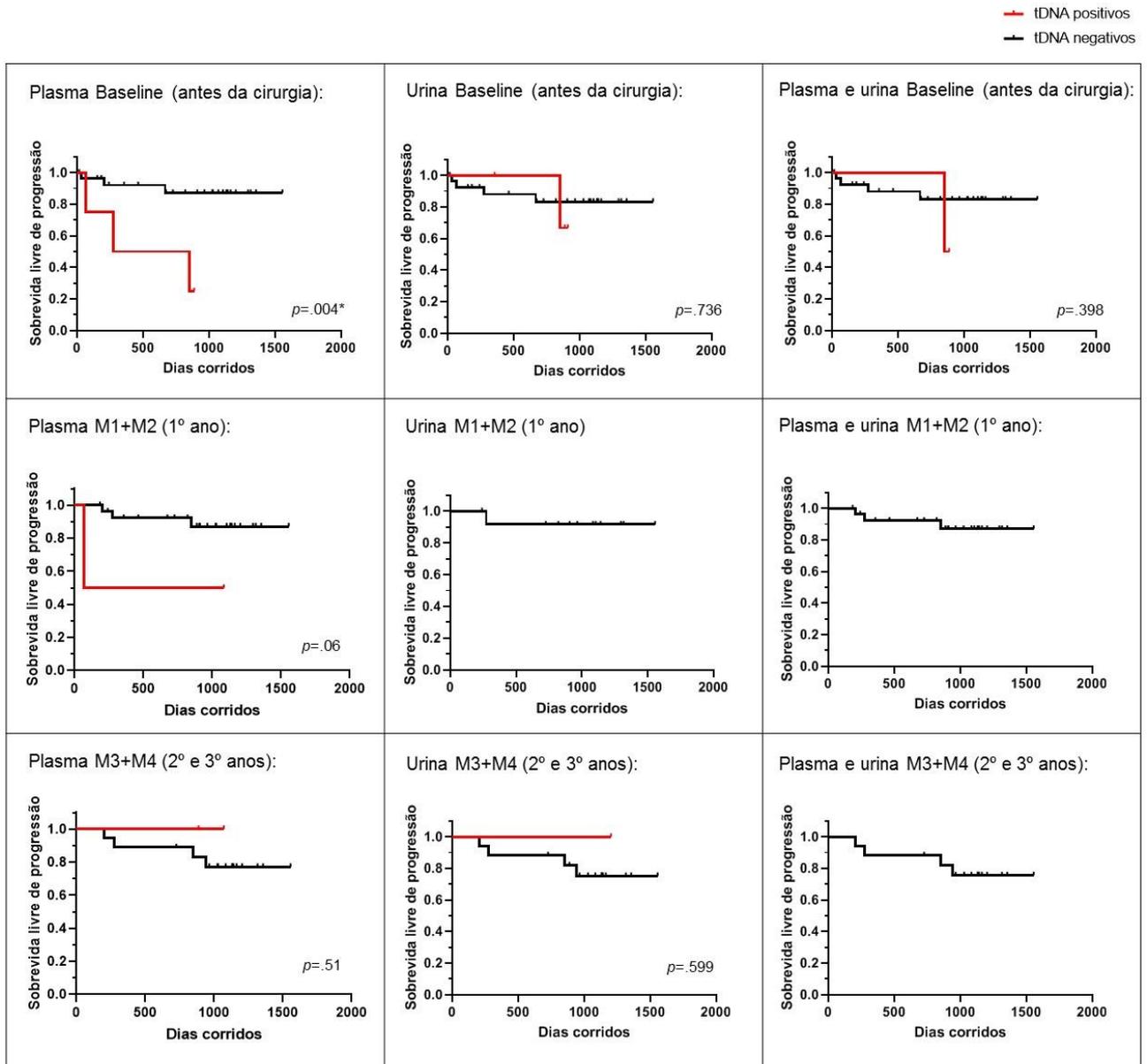
		Idade ao diagnóstico (anos):							
Amostra:		N	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Erro Desvio	p valor	
Plasma e Urina Baseline	tDNA negativo	29	37	55,28	52,00	82	11,765	.467	
	tDNA positivo	1	65	65,00	65,00	65	-		
Plasma Baseline	tDNA negativo	29	37	56,00	52,00	82	11,832	1	
	tDNA positivo	3	40	56,33	64,00	65	14,154		
Urina Baseline	tDNA negativo	29	37	56,00	54,00	82	11,853	.808	
	tDNA positivo	3	49	54,67	50,00	65	8,963		
Plasma M1+M2	tDNA negativo	27	37	55,67	54,00	74	10,975	.207	
	tDNA positivo	2	64	67,00	67,00	70	4,243		
Plasma M3 + M4	tDNA negativo	19	37	58,00	59,00	74	12,184	.8	
	tDNA positivo	1	52	52,00	52,00	52	-		
Urina M3 + M4	tDNA negativo	17	37	56,53	54,00	73	11,985	.111	
	tDNA positivo	1	74	74,00	74,00	74	-		

g) Teste U de Mann-Whitney para análise de variáveis quantitativas: tamanho do tumor (maior eixo).

		Tamanho do tumor (maior eixo, cm):							
Amostra:		N	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Erro Desvio	p valor	
Plasma e Urina Baseline	tDNA negativo	29	1,5	4,472	3,500	20,5	3,7601	1	
	tDNA positivo	1	3,5	3,500	3,500	3,5	-		
Plasma Baseline	tDNA negativo	29	1,5	4,059	3,500	14,5	2,7402	.07	
	tDNA positivo	3	3,5	11,167	9,500	20,5	8,6217		
Urina Baseline	tDNA negativo	29	1,5	4,731	3,800	20,5	3,8066	.580	
	tDNA positivo	3	3,2	3,333	3,300	3,5	0,1528		
Plasma M1 + M2	tDNA negativo	27	1,6	4,837	3,500	20,5	4,1998	.059	
	tDNA positivo	2	8,0	8,750	8,750	9,5	1,0607		
Plasma M3 + M4	tDNA negativo	19	1,6	5,926	4,000	20,5	4,7973	1	
	tDNA positivo	1	3,8	3,800	3,800	3,8	-		
Urina M3 + M4	tDNA negativo	17	1,6	6,212	5,500	20,5	5,0069	.778	
	tDNA positivo	1	3,5	3,500	3,500	3,5	-		

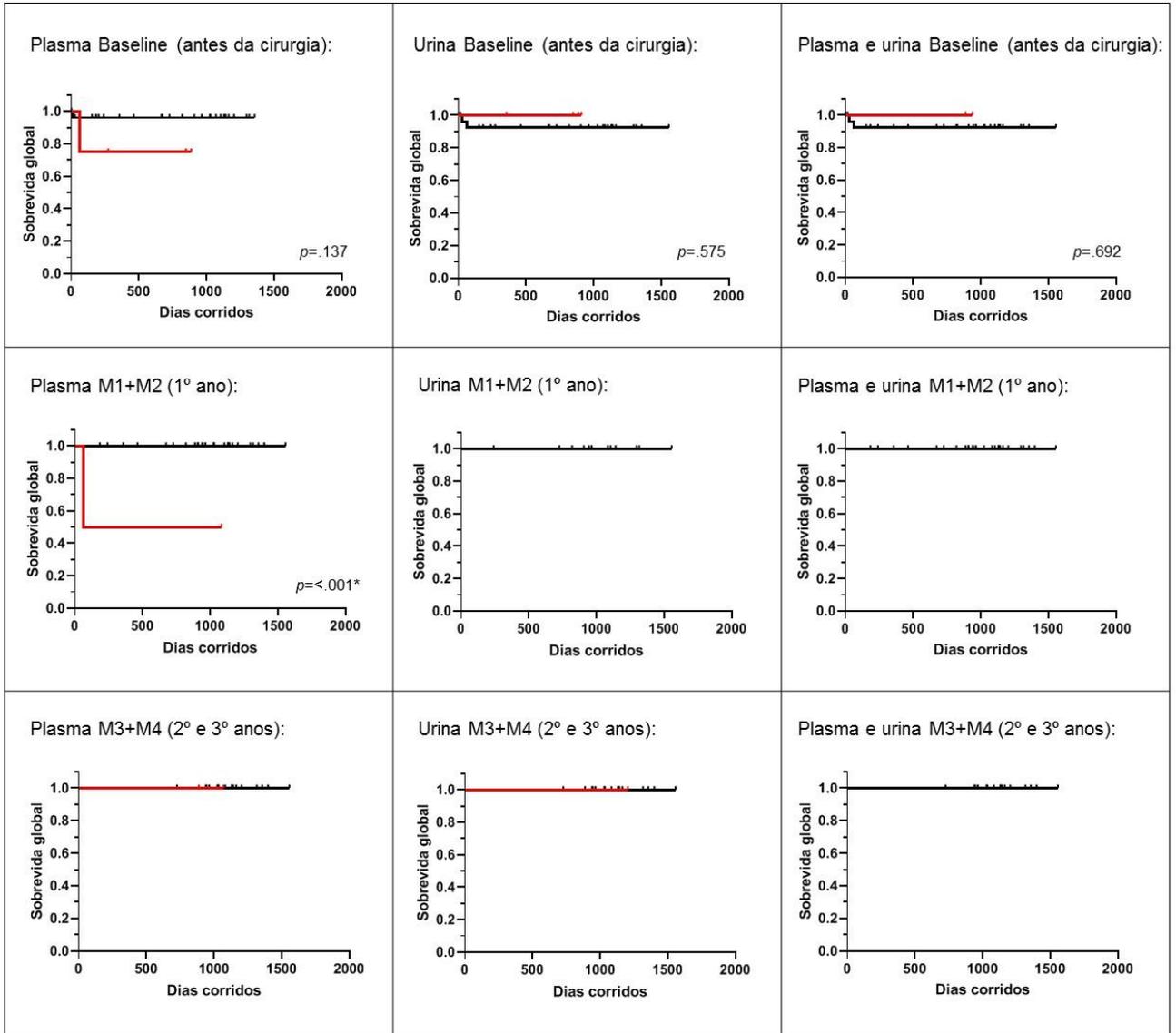
Apêndice 12. Curvas de sobrevida livre de progressão e de sobrevida global dos casos de ccRCC

a) Sobrevida livre de progressão:



b) Sobrevida global:

— tDNA positivos
— tDNA negativos



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

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **27/11/2018**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **23/10/2018**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2559/18** intitulado: “**Avaliação de DNA tumoral e perfil imunológico por biópsia líquida para diagnóstico e monitoramento de pacientes com tumor de Wilms.**”

Pesquisador Responsável: Dirce Maria Carraro
Aluna: Ana Carolina Kerekes Miguez (Doutorado)

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

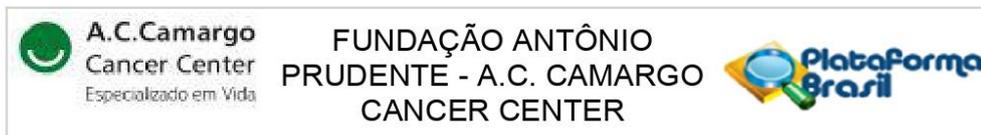
São Paulo, 30 de novembro de 2018.

Atenciosamente,


Dra. Sandra Caires Serrano
1ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2. Parecer de aprovação de mudança de título do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização genética germinativa e somática de câncer renal pediátrico e adulto e avaliação de biópsia líquida baseada em DNA tumoral em plasma e urina para estratificação de prognóstico

Pesquisador: Dirce Maria Carraro

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 5

CAAE: 91227118.4.0000.5432

Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.707.507

Apresentação do Projeto:

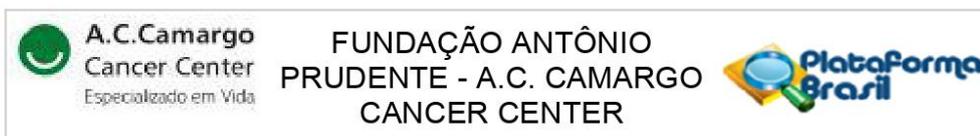
As informações elencadas nos campos “Apresentação do Projeto”, “Objetivo da Pesquisa” e “Avaliação dos Riscos e Benefícios” foram retiradas do(s) arquivo(s):

“PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2025237_E2.pdf”, postado em 03/10/2022.

Introdução:

De acordo com a American Cancer Society, em 2022, cerca de 79.000 novos casos de câncer renal serão diagnosticados nos Estados Unidos, fazendo deste o sétimo câncer mais frequente nesta população. Ainda, estima-se que cerca de 17,5% destes pacientes virão à óbito (Siegel et al. 2022). No Brasil, os dados de incidência de câncer renal não são relatados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), mas segundo o Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP), a estimativa de câncer renal para 2018, tanto na população pediátrica quanto adulta, foi de 6270 novos casos, sendo 3760 homens e 2510 mulheres (Oncoguia s.d.). Sendo assim, a elucidação das características genéticas tanto dos tumores como dos pacientes e o estabelecimento de métodos efetivos de monitoramento da doença e de estratificação de prognóstico são de grande importância para avançar no conhecimento da doença e no manejo destes pacientes. Entre a população adulta, o tumor renal mais comum é o carcinoma de células renais (CCR), especialmente

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br

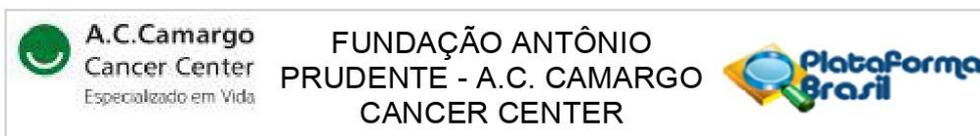


Continuação do Parecer: 5.707.507

o subtipo carcinoma renal de células claras (ccRCC) que representa cerca de 75% dos casos (Petejova e Martinek 2016). Já na população pediátrica, o tumor de Wilms (TW) é o mais frequente, sendo diagnosticado em 95% dos casos de tumores renais em crianças (Pastore et al. 2006; Breslow et al. 1993).

1.2 Tumor de Wilms O tumor de Wilms (TW), um tumor renal pediátrico, é uma neoplasia embrionária originada a partir de erros no processo de diferenciação celular em células primitivas durante estágios precoces do desenvolvimento do rim (Hohenstein, Pritchard-Jones, e Charlton 2015; Li et al. 2002; Beckwith 1982). Apresenta pico de incidência entre 2 e 5 anos de idade, é o segundo câncer intra-abdominal mais comum da infância e a quinta maior malignidade pediátrica em geral (Pastore et al. 2006; Breslow et al. 1993). Representa aproximadamente 6% de todos os cânceres pediátricos e mais de 95% de todos os tumores renais nessa faixa etária, resultando em uma incidência de 1 a cada 10.000 crianças (Birch e Breslow 1995). Histologicamente, o TW se diferencia dos outros tumores renais por conter componentes de tecido em até três morfologias diferentes: componente mesenquimatoso ou estromal, que se assemelha ao mesênquima fetal primitivo; componente epitelial, que se assemelha a túbulos e glomérulos renais fetais; e componente blastematoso, constituído por aglomerados de células blásticas. Os diferentes componentes do TW recapitulam os diversos estágios de diferenciação celular durante o complexo processo de desenvolvimento renal na embriogênese (Beckwith 1982; Li et al. 2002; Hohenstein, Pritchard-Jones, e Charlton 2015), demonstrando que o TW se origina de uma falha nesse processo. Em países desenvolvidos as taxas de sobrevida para TW melhoraram de 20% na década de 1960 para cerca de 90% atualmente, enquanto os países em desenvolvimento têm taxas de sobrevivência um pouco menor, de aproximadamente 75% (Dome et al. 2013; Gleason et al. 2014; Rabeh et al. 2016; Verma e Kumar 2016). Essa melhoria dramática na sobrevivência deve-se, em parte, à maneira sistemática em que a abordagem terapêutica evoluiu devido ao trabalho de dois grandes grupos cooperativos que estudam TWs: o grupo norte-americano NWTSG (National Wilms Tumor Study Group, que em 2001 fundiu-se com outros grupos gerando o COG - Children's Oncology Group) e o grupo europeu SIOP (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique). Os esforços dos grupos NWTSG e SIOP geraram protocolos de tratamento nos quais a principal diferença na abordagem terapêutica é o momento cirúrgico. O NWTSG recomenda a nefrectomia inicial seguida por quimioterapia adjuvante. Já a SIOP aconselha a realização de quimioterapia préoperatória/neoadjuvante, a fim de reduzir o tamanho e estadiamento do tumor para cirurgia. Por conta disso, no protocolo SIOP, o regime terapêutico neoadjuvante é escolhido de acordo com exames de imagem e sintomatologia do paciente (Davidoff 2012), porém o diagnóstico preciso do TW é feito quando uma amostra de tecido

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br

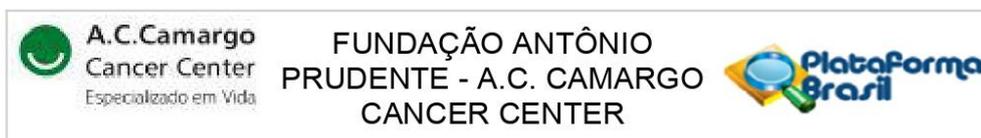


Continuação do Parecer: 5.707.507

tumoral passa por análise histológica após cirurgia (Zoeller et al. 1994). Entretanto, apesar de apresentar um bom prognóstico na maioria dos casos, cerca de 15% dos pacientes com TW sofrem recidiva e requerem tratamento adicional, podendo levar a efeitos adversos a longo prazo, como efeitos musculoesqueléticos, toxicidade cardíaca, problemas reprodutivos, disfunção renal e o desenvolvimento de segundas neoplasias malignas (Wright, Green, e Daw 2009). São necessárias ferramentas de monitoramento para a identificação precoce de pacientes de maior risco, auxiliando na estratificação de prognóstico e podendo, no futuro, auxiliar no ajuste de intensidade de tratamento poupando pacientes de menor risco dos efeitos colaterais a longo prazo.

1.2.1 Aspectos Genéticos do TW Cerca de 90% dos casos de TW são esporádicos, sendo resultado de mutações somáticas, isto é, restritas ao tecido tumoral. O TW, assim como outros tumores pediátricos, contém uma média de alterações não sinônimas e somáticas consideravelmente menor do que tumores em adultos, apresentando menor instabilidade genética (Vogelstein et al. 2013). O TW é altamente heterogêneo. Entre as alterações genéticas pontuais mais comuns, mutações somáticas em WTX (Rivera et al. 2007), WT1 (Varanasi et al. 1994; Huff et al. 1995) e CTNNB1 (Koesters et al. 1999) correspondem a cerca de 30% dos TWs (Ruteshouser, Robinson, e Huff 2008), indicando que a via Wnt está intimamente envolvida com a tumorigênese dessa neoplasia. CTNNB1, por exemplo, encontra-se mutado em 7,5% dos TWs em Torrezan et al. (2014) e em 6,5% dos TWs em Gadd et al. (2017). Já os genes TP53 (Bardeesy et al. 1994), DIS3L2 (Astuti et al. 2012), DICER1 (Wu et al. 2013), FBXW7 e MYCN (Williams et al. 2010) também já foram descritos como mutados nesse tumor, no entanto são raramente identificados. Em 2014, em um estudo anterior do grupo, foi identificada uma mutação recorrente em TW (p.E1147K) em DROSHA, um gene primordial envolvido no processamento de microRNAs. Essa mutação, presente em 10% das amostras, afeta o domínio RNase IIIb e altera o perfil de microRNAs destes pacientes, causando diminuição na expressão de microRNAs maduros. Nesse mesmo estudo também foram identificadas mutações não-recorrentes em outros genes da via de microRNAs em cerca de 17% dos TWs (Torrezan et al. 2014). Esses achados foram também publicados por outro grupo (Rakheja et al. 2014) fortalecendo essas evidências e comprovando a importância da via de biogênese de microRNAs no desenvolvimento do TW. Entre os outros genes dessa via identificados como mutados nesse tumor, o gene DGCR8 foi descrito como mutado em 10,3% das amostras analisadas por (Wegert et al. 2015) e em 9% das amostras analisadas por (Torrezan et al. 2014). DICER1 encontra-se mutado em 4,5% dos TWs em (Torrezan et al. 2014) e em 3,7% em Gadd et al. (2017), demonstrando novamente o importante envolvimento dessa via no desenvolvimento do TW. No entanto, uma grande parte dos casos de TW apresentam mutações somáticas em genes ainda não

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



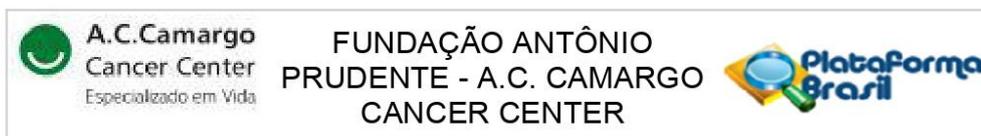
Continuação do Parecer: 5.707.507

relacionados a essa neoplasia, deixando uma lacuna na compreensão de quais processos biológicos podem estar envolvidos na tumorigênese do TW. Sabe-se ainda que cerca de 15% dos TWs são associados anomalias congênitas, como as causadas por mutações em WT1 (Síndromes de WAGR e Denys-Dash) (Pelletier et al. 1991), desregulações de imprinting genômico em 11p15 (Síndrome de Beckwith-Wiedemann) (Ohlsson et al. 1993), mutações em DIS3L2 (Síndrome de Periman) (Astuti et al. 2012) e mutações em DICER1 na síndrome do blastoma pleuropulmonar (Foulkes et al. 2011). Entretanto, muitos casos síndromicos e clusters familiares afetados por TW ainda não tiveram um gene responsável identificado, expondo uma importante brecha no conhecimento sobre genes envolvidos na predisposição ao TW e, conseqüentemente, sobre os sistemas biológicos que operam em sua tumorigênese.

1.3 Carcinoma de células renais

O carcinoma de células renais (CCR) acomete principalmente indivíduos entre 60 e 70 anos de idade, sendo raro em pessoas com menos de 45 anos. Tem origem no revestimento do túbulo contorcido proximal dos rins e é o tipo mais comum de câncer renal, responsável por cerca de 90% dos casos (Motzer et al. 2017). O CCR tem envolvimento de fatores ambientais que aumentam as chances de acometimento pela doença, como tabagismo, hipertensão e obesidade (Gray e Harris 2019), além exposição ocupacional ao tricloroetileno, substância utilizada por mecânicos, lavanderias, processadores de óleo, fabricantes de cloreto de polivinila e produtores de tabaco com baixo teor de nicotina (ALANEE et al. 2015; Kelsh et al. 2010; Karami et al. 2012). Do mesmo modo, o CCR também parece ser mais comum em pacientes com insuficiência renal terminal, doença cística renal, transplantados renais, pacientes em diálise ou com síndrome da esclerose tuberosa (Escudier et al. 2019). Cerca de 50% dos pacientes com carcinoma de células renais são assintomáticos, diagnosticados incidentalmente durante exames de imagem solicitados por outros problemas de saúde (Campbell et al. 2009). Casos que apresentam hematúria, dor e massa abdominal palpável são incomuns e geralmente representam doença em estágio mais avançado (Ljungberg et al. 2007; Loo et al. 2013). O CCR é classificado em subtipos de acordo com suas características histológicas, os três mais comuns sendo o carcinoma renal de células claras (ccRCC, do inglês “clear cell renal cell carcinoma”) (75% dos casos), papilífero (15% a 20% dos casos) e cromóforo (5% dos casos) (Ricketts et al. 2018). O subtipo ccRCC é o subtipo mais agressivo e que apresenta pior prognóstico, pois tende a ser diagnosticado em estágios mais avançados da doença (Campbell et al. 2009). Ao diagnóstico, o CCR costuma ser um tumor localizado em 45% dos casos, invasivo em 33% e disseminado para outros órgãos em 25% dos casos. O estadiamento do CCR segue o padrão TNM (tumor, linfonodo, metástase). As taxas de sobrevivência em 5 anos ficam em torno de 81% para o grupo I (T1 N0 M0) e em torno de apenas 8% para o grupo IV (T4 ou M1).

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



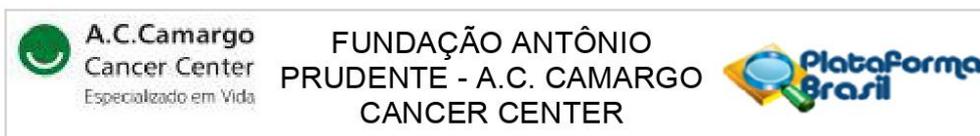
Continuação do Parecer: 5.707.507

Para o CCR precoce, o tratamento é cirúrgico. A nefrectomia é o tratamento padrão para casos de doença localizada, podendo ser total (nefrectomia radical) ou parcial (cirurgia conservadora de néfrons). Cada modalidade está associada a seus próprios riscos e benefícios. A nefrectomia radical pode levar a um risco aumentado para doença renal crônica (Huang et al. 2006) e para morbimortalidade cardiovascular (Thompson et al. 2008), sendo indicada se o tumor se estender para a veia cava inferior. Já a nefrectomia parcial pode preservar a função renal, diminuir a mortalidade geral e reduzir a frequência de eventos cardiovasculares, sendo indicada para pacientes com uma forma hereditária de CCR ou com tumores renais T1a e T1b (até 7 cm em sua maior dimensão) e com um rim contralateral normal. Em alguns pacientes com CCR localizado, a cirurgia poupadora de néfrons pode não ser adequada devido ao crescimento tumoral localmente avançado ou porque o tumor está em uma localização desfavorável. Ambas as modalidades cirúrgicas têm sucesso terapêutico equivalente (Leibovich et al. 2004; Tan et al. 2012). Já para o CCR avançado e metastático, o tratamento é paliativo e pode incluir nefrectomia, embolização tumoral, radioterapia e quimioterapia, além da utilização de protocolos experimentais.

1.3.1 Aspectos genéticos do ccRCC

Geneticamente, o ccRCC é o subtipo de CCR mais explorado, sendo um tumor heterogêneo (Gerlinger et al. 2012). O gene supressor tumoral VHL é o mais mutado nesta neoplasia, presente em cerca de 55% dos casos como mutação pontual, deleção ou hipermetilação (Dalglish et al. 2010). A proteína VHL é uma ubiquitina ligase E3 que tem como alvo fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIFs) para degradação mediada por proteassoma. Assim, a perda da função de VHL leva à estabilização e acúmulo de HIFs que regulam positivamente os genes pró-angiogênicos, principalmente VEGF (codificando o fator de crescimento endotelial vascular) e promovendo a angiogênese e a ativação de outras vias, como PI3KAKT-mTOR (WM et al. 2016). Outros genes supressores de tumor foram encontrados mutados em ccRCC em estudos que tiveram como objetivo elucidar o espectro mutacional destes tumores, identificando mutações frequentes nos genes PBRM1 e BAP1, além de genes também envolvidos no controle transcricional e na maquinaria de modificação da cromatina, como KDM6A, KDM5C e SETD2 (Varela et al. 2011; Dalglish et al. 2010; G. Guo et al. 2011). Num estudo recente do nosso grupo (Meira, 2022) foi gerado um painel de 28 genes frequentemente mutados em CCR (Painel CCR), considerando-se os principais subtipos. Para o subtipo ccRCC foi possível identificar mutações somáticas em VHL em 27 das 44 amostras avaliadas (61%), seguido por PBRM1 em 15 amostras (34%) (sendo 12 delas também mutadas em VHL) e por SETD2 em 6 amostras (14%). De forma geral, o painel CCR teve uma taxa de 86% de sucesso na detecção de mutações somáticas em ccRCC, reforçando a predominância de VHL no espectro de genes mutados nesta neoplasia e o

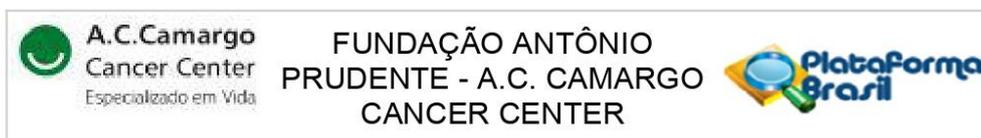
Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 5.707.507

peso do envolvimento de vias relacionadas à remodelação da cromatina e ao controle transcricional na tumorigênese do ccRCC. 1.4 Genes envolvidos na predisposição ao câncer renal O componente hereditário dos tumores renais ainda é pouco explorado. Nos últimos anos houve um esforço na identificação de genes de predisposição ao câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens (Zhang, Nichols, e Downing 2016; Gröbner et al. 2018; Mahamdallie et al. 2019; Diets et al. 2019; Akhavanfard et al. 2020), principalmente após a introdução da tecnologia de sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês Next Generation Sequencing), que aumentou exponencialmente a capacidade de análise do genoma humano. Novos genes de predisposição ao TW foram recentemente identificados, como TRIM28, que parece estar associado ao subtipo epitelial do TW (Mahamdallie et al. 2019; Diets et al. 2019), e FBXW7, NYNRIN e KDM3B, envolvidos em diversos processos biológicos, como silenciamento genético, reparo de DNA e manutenção da integridade genômica (Mahamdallie et al. 2019). Clinicamente, estes pacientes apresentam maior incidência de doença bilateral e podem ou não apresentar características sindrômicas ou fazer parte de uma família afetada por TW. Assim como o TW, o CCR também pode ocorrer devido a aspectos genéticos hereditários. Cerca de 2% a 3% de todos os CCR são hereditários, causados por síndromes como a de Von-Hippel-Lindau (relacionada a alterações no gene VHL) e também aspectos não sindrômicos, como o carcinoma renal papilar hereditário (relacionado ao gene MET), carcinoma de célula renal e leiomioma hereditário (relacionado ao gene FH). Clinicamente, pacientes com lesões múltiplas e bilaterais tem maior chance de terem um componente hereditário relacionado ao tumor renal. O conhecimento do repertório dos genes de predisposição ao TW e ao CCR pode melhorar a compreensão do processo tumorigênico, auxiliar no tratamento e também contribuir com a determinação do risco genético herdável ao desenvolvimento destes tumores, colaborando com o aconselhamento genético dos pacientes e seus familiares. 1.5 Biopsia Líquida na detecção de DNA tumoral Atualmente está bem estabelecido que pacientes com diferentes tipos de câncer, independente do estadiamento clínico, apresentam maiores níveis de DNA circulante livre (cfDNA, do inglês "circulating free DNA") em fluidos corpóreos do que indivíduos saudáveis. O cfDNA pode ser visto em fluidos corpóreos como o plasma e sobrenadante da urina (Li et al. 2002; Diehl et al. 2008; Schwarzenbach, Hoon, e Pantel 2011; Perkins et al. 2012; Bettgowda et al. 2014; Murtaza et al. 2015; Ferreira et al. 2016; Riediger et al. 2016). No sedimento da urina também é possível obter DNA de células epiteliais que se desprendem do trato geniturinário (celDNA, do inglês "cellular DNA") (Botezatu et al. 2000; Su, Wang, Brenner, et al. 2004; Millholland et al. 2012; Birkenkamp-Demtröder et al. 2016; N. Guo et al. 2016; Togneri et al. 2016). Em pacientes oncológicos, há evidências de que entre as moléculas de DNA identificadas no cfDNA e

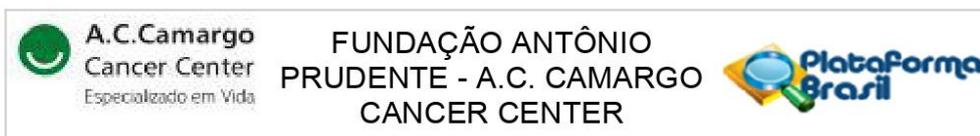
Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 5.707.507

celDNA, há moléculas de DNA tumoral (tDNA, do inglês "tumor DNA"), que pelo repertório mutacional observado são claramente representativas do genoma do tumor. O tDNA é resultado de apoptose e/ou necrose de células tumorais e, portanto, apresentam-se tipicamente em estado fragmentado (160-180bp) (Jahr et al. 2001; Mouliere et al. 2011). No caso de tumores renais, que podem estar em contato direto com a urina, é possível que aconteça a liberação de células tumorais devido à instabilidade tecidual. Essas células acabam diluídas na urina juntamente com as células de tecidos saudáveis, originadas do processo natural de esfoliação e apoptose do tecido epitelial do trato geniturinário. Além disso, outros estudos mostram que também no sobrenadante da urina é possível identificar tDNA altamente degradado, proveniente da circulação após filtração glomerular (Botezatu et al. 2000; Su, Wang, Block, et al. 2004). Já no sedimento da urina encontra-se celDNA em estado mais íntegro, proveniente das células do trato geniturinário (Su, Wang, Brenner, et al. 2004) (Figura 1). Nesse contexto, é observada alta correlação entre a frequência destas mutações específicas do tumor detectadas em tDNA com a progressão da doença em diferentes tipos de câncer (Dawson et al. 2013; Murtaza et al. 2015; De Mattos-Arruda et al. 2014; Miguez et al. 2020). Estudos demonstram que a biópsia líquida pode ainda superar o obstáculo da heterogeneidade tumoral enfrentado pelas biópsias teciduais (Forshew et al. 2012; Chan et al. 2013), e a avaliação de amostras seriadas de fluidos corpóreos pode revelar o surgimento de clones relacionados à resistência (De Mattos-Arruda et al. 2014; Murtaza et al. 2015), guiando a estratégia de tratamento de cada paciente de forma personalizada, permitindo a estratificação de prognóstico e otimizando o sucesso terapêutico. Numa análise anterior publicada pelo nosso grupo (Miguez et al. 2020), foi feita uma avaliação da presença de tDNA em plasma e componentes da urina (sedimento e sobrenadante) de pacientes com TW. Foram coletadas amostras seriadas destes fluidos corpóreos antes, durante e após o tratamento. A detecção de tDNA em plasma e/ou urina antes do início do tratamento foi recorrente nestes pacientes, assim como a diminuição do tDNA durante a quimioterapia neoadjuvante. Observou-se ainda que a persistência do tDNA em fluidos corpóreos após a cirurgia para retirada do rim afetado ocorreu em casos acometidos por metástase após cirurgia, óbito por avanço da doença e em um caso de TW bilateral que passou por nefrectomia parcial, podendo indicar doença residual estável. Quanto à detecção de tDNA em fluidos corpóreos de pacientes com diferentes subtipos de CCR, um estudo recente avaliou urina e plasma de adultos com tumores renais, desde casos benignos até metastáticos. Utilizando o método de target sequencing através de um painel de genes, foi possível detectar tDNA em 54,5% dos plasmas de 22 casos e 50% dos sobrenadantes de urina de 14 casos, todos coletados antes do início do tratamento. Foi possível observar uma correlação

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 5.707.507

entre a detecção de tDNA nos plasmas e o tamanho do tumor, e a detecção de tDNA foi mais provável em pacientes com CCR localmente avançados, com trombo tumoral da veia renal ou da veia cava inferior. Já nos sobrenadantes de urina, não houve relação entre a detecção de tDNA, o tamanho do tumor ou o comprometimento da veia renal ou da veia cava. Além disso, foram observados baixos níveis de tDNA em plasma e urina, em média 3% de frequência alélica da variante (Smith et al. 2020). Esses relatos abrem perspectivas reais da investigação do tDNA em fluidos corpóreos como ferramenta não invasiva de monitoramento de resposta ao tratamento, de progressão e recidiva, identificação precoce de pacientes de maior risco e estratificação de prognóstico.

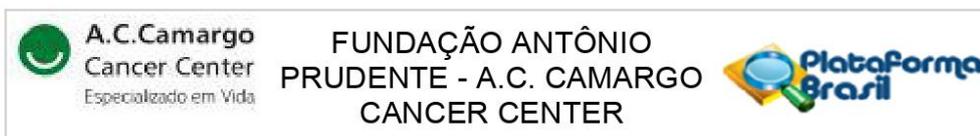
Hipótese:

Pode ser possível realizar monitoramento de pacientes com TW e CCR e estratificação de prognóstico através da análise de DNA tumoral em amostras seriadas de urina e plasma desses pacientes. Visamos ainda abordar dois aspectos genéticos do TW e CCR, o primeiro sendo a identificação de genes de predisposição à este tumor, o segundo sendo a elaboração de um novo painel de genes relacionados ao TW para identificação de mutações somáticas.

Metodologia Proposta:

Para a análise somática e de biópsia líquida foram recrutados 12 casos de TW no A.C. Camargo Cancer Center (ACCCC) e em instituições parceiras, e 42 casos de ccRCC no ACCCC. A detecção de mutação somática em ccRCC, foi realizada num estudo anterior do grupo (Meira, 2022) através de um painel com 28 genes frequentemente mutados nesta neoplasia (painel CCR) ou do painel Comprehensive Cancer Panel (CCP) para casos negativos para mutação somática nos genes do painel CCR. Para os casos de TW, um painel de genes elaborado num estudo anterior (Torrezan et al. 2014) foi atualizado com base em dados da literatura (Painel TW). Para os casos negativos para mutação somática nos genes do painel TW, foi realizado o sequenciamento de exoma. As mutações identificadas nestes tumores foram rastreadas em amostras seriadas de urina e plasma através de NGS (do inglês Next Generation Sequencing) pelo método deep amplicon sequencing. Para os casos de TW, as amostras de plasma e urina foram coletadas antes do tratamento (baseline), momentos antes da cirurgia (pré-cir) e ao menos 5 dias pós cirurgia (pós-cir). Para os casos de ccRCC, as amostras foram coletadas no momento da cirurgia (baseline) e em mais 4 momentos pós cirurgia: de 6 a 8 semanas (M1), 6 meses (M2), 18 meses (M3) e 30 meses (M4). A relação entre os dados de biópsia líquida e os dados clínicos e características tumorais de cada

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 5.707.507

paciente foi analisada utilizando o teste exato de Fisher. Para a análise germinativa em TW e CCR, foi utilizado um painel de genes customizado de 126 genes de predisposição ao câncer em amostras de DNA de leucócito de 52 casos de TW e 74 casos de CCR. As variantes identificadas foram classificadas como patogênicas (P) ou provavelmente patogênicas (PP).

Critério de Inclusão:

Pacientes com TW e CCR independente de estadiamento e grau de risco, que não iniciaram tratamento e que serão tratados de acordo com os protocolos estabelecidos no AC Camargo Cancer Center.

Critério de Exclusão:

Pacientes com TW desenvolvido em idade adulta ou pacientes com CCR que já iniciaram o tratamento.

Metodologia de Análise de Dados:

Os dados serão analisados com as ferramentas Ion Reporter, Variant Caller e o software VarSeq.

Desfecho Primário:

- Detecção de DNA tumoral em amostras de fluidos corpóreos através da detecção da mutação somática presente no tumor e seu rastreamento em amostras de plasma e urina, e correlação com dados clínicos para estratificação de prognóstico.
- Identificação de genes de predisposição ao TW e ao CCR.

Objetivo da Pesquisa:

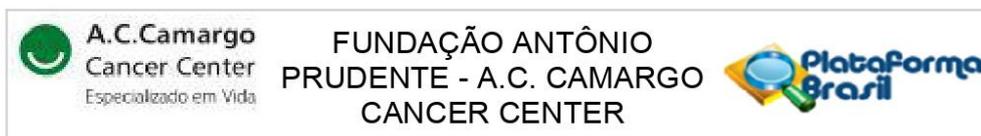
Objetivo Primário:

- Avaliar os aspectos genéticos germinativos e somáticos do câncer renal adulto e pediátrico e o potencial do DNA tumoral (tDNA) em urina e plasma para estratificação de prognóstico e monitoramento de resposta ao tratamento dos pacientes

Objetivo Secundário:

- Desenhar um painel de genes com alta capacidade para detecção de mutação somática em TW através de dados da literatura para a seleção de genes frequentemente mutados nessa neoplasia.
- Investigar a presença de mutação específica do tumor em DNA de amostras seriadas de plasma e

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 5.707.507

urina de pacientes com TW e ccRCC através de sequenciamento target de amplicon como ferramenta para estratificação de prognóstico (EP).

- Identificar genes de predisposição ao TW e ao CCR através do sequenciamento de um painel de 126 genes de predisposição ao câncer em amostras de DNA de leucócito ou de tecido não neoplásico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Considerando que no projeto haverá levantamento de dados clínicos e análise de dados genéticos, existe um risco mínimo de perda de confidencialidade dos dados do participante. Entretanto, todos os pesquisadores envolvidos se comprometem a preservar a confidencialidade dos dados de cada participante, atuando para proteção e manutenção do sigilo de toda e qualquer informação coletada de caráter pessoal, em consonância com a Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Para os participantes que irão realizar a coleta de sangue, há possíveis riscos previstos decorrentes de uma punção venosa, detalhados no TCLE. Além da coleta de sangue e urina, não estão previstos procedimentos extras àqueles já realizados durante o diagnóstico e tratamento de tumor de Wilms.

Benefícios:

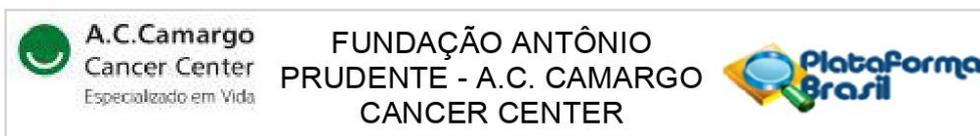
Contribuir para um melhor entendimento dos fatores que podem causar o aparecimento e a evolução do tumor de Wilms e CCR, além de ajudar na descoberta de características que podem auxiliar o médico na identificação de pacientes de maior risco, de forma precoce.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Encaminhada para análise do Comitê emenda para solicitação das seguintes alterações no projeto "Avaliação de DNA tumoral e perfil imunológico por biópsia líquida para diagnóstico e monitoramento de pacientes com tumor de Wilms" (CEP 2559/18), da aluna Ana Carolina Kerekes Miguez (doutorado):

- Alteração no título do projeto, de "Avaliação de DNA tumoral e perfil imunológico por biópsia líquida para diagnóstico e monitoramento de pacientes com tumor de Wilms" para "Caracterização genética germinativa e somática de câncer renal pediátrico e adulto e avaliação de biópsia líquida baseada em DNA tumoral em plasma e urina para estratificação de prognóstico". O motivo da alteração no título é a inclusão, neste trabalho de Wilms, de uma série de pacientes com

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 5.707.507

carcinomas renais de células claras (ccRCC) para análise de biópsia líquida. Esta série de pacientes vem de um outro projeto coordenado pela orientadora ("Utilização de biópsia líquida baseada em detecção de DNA tumoral em urina e plasma, em pacientes com carcinoma renal de células claras" - Registro CEP nº: 2397/17, parte do PRONON). Por conta da pandemia de COVID-19, somente parte dos resultados deste subprojeto do PRONON entrou para a tese defendida pela aluna Isabella Tanus Job e Meira em fevereiro de 2022, incluindo a construção do painel de genes e a avaliação das amostras baseline de plasma e urina destes pacientes. No presente projeto de doutorado da aluna Ana Carolina K. Miguez, visamos avaliar as amostras de plasma e urina coletadas durante o período de monitoramento dos pacientes com ccRCC, além da reavaliação de parte das coletas baseline.

- Inclusão da análise de variantes germinativas em amostras de carcinomas de células renais (CCR), incluindo outros subtipos além do ccRCC, que tenham material disponível no Biobanco da instituição e que consentiram a utilização deste material de pesquisa para análises futuras.
- Retirada das análises de perfil imunológico dos casos de tumor de Wilms por conta do número pequeno de novos pacientes com este tumor no A.C. Camargo Cancer Center durante a vigência do presente projeto, além da saída do Dr. Kenneth Gollob da instituição.

Enviado também o projeto com as alterações destacadas em amarelo, além dos resultados obtidos até o momento para demonstrar que é possível concluir o projeto dentro do período de vigência proposto (janeiro de 2023), uma vez que praticamente todos os experimentos e análises já foram realizados pela aluna Ana Carolina K. Miguez.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou pendências e lista de inadequações".

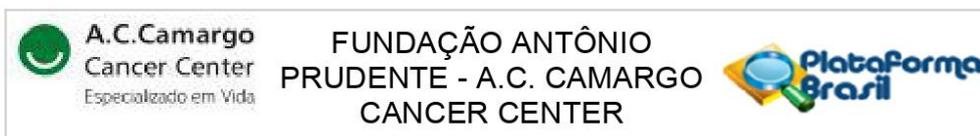
Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou pendências e lista de inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos na emenda apresentada, assim, o Comitê de Ética em Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center manifesta-se pela aprovação da mesma.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



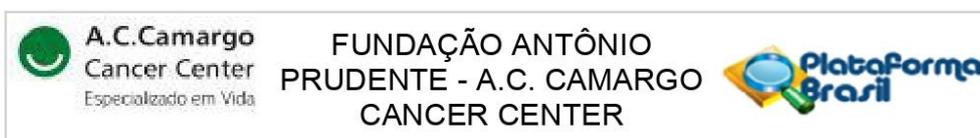
Continuação do Parecer: 5.707.507

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2025237_E2.pdf	03/10/2022 16:57:12		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2022_10_03_Projeto_emenda.docx	03/10/2022 16:55:03	Dirce Maria Carraro	Aceito
Outros	2022_10_03_emailPosGra_emenda.pdf	03/10/2022 16:54:47	Dirce Maria Carraro	Aceito
Outros	2022_10_03_Carta_emenda.pdf	03/10/2022 16:54:35	Dirce Maria Carraro	Aceito
Folha de Rosto	2022_10_03_folhaDeRosto_emenda.pdf	03/10/2022 16:54:04	Dirce Maria Carraro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2021_05_20_Projeto_Wilms_atualizado.docx	07/06/2021 13:51:59	Dirce Maria Carraro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2021_05_31_Projeto_Wilms_atualizado_MARCADO.docx	07/06/2021 13:51:54	Dirce Maria Carraro	Aceito
Outros	TERMO_DE_ANUENCIA_IDOR.pdf	07/06/2021 13:35:45	Dirce Maria Carraro	Aceito
Outros	TERMO_DE_ANUENCIA_IDOR.doc	07/06/2021 13:35:38	Dirce Maria Carraro	Aceito
Outros	Carta_CEP_DMC.pdf	07/06/2021 13:35:12	Dirce Maria Carraro	Aceito
Outros	Carta_CEP_DMC.doc	07/06/2021 13:35:03	Dirce Maria Carraro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2021_05_31_TA_atualizado.docx	07/06/2021 13:33:47	Dirce Maria Carraro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2021_05_31_TA_atualizado_MARCADO.docx	07/06/2021 13:33:38	Dirce Maria Carraro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2021_03_15_TCLE_TW_atualizado.doc	07/06/2021 13:26:37	Dirce Maria Carraro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	2021_03_15_TCLE_TW_atualizado_MARCADO.doc	07/06/2021 13:26:32	Dirce Maria Carraro	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



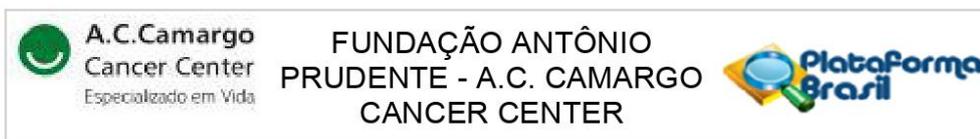
Continuação do Parecer: 5.707.507

Ausência	2021_03_15_TCLE_TW_atualizado_MARCA DO.doc	07/06/2021 13:26:32	Dirce Maria Carraro	Aceito
Outros	2018_11_09Carta_resposta_final.pdf	09/11/2018 14:05:53	Dirce Maria Carraro	Aceito
Outros	Termo_Dra_Beatriz_assinado_scan_rotated.pdf	06/09/2018 14:33:34	Dirce Maria Carraro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_De_Compromisso_Pesquisador.pdf	11/06/2018 15:22:52	Dirce Maria Carraro	Aceito
Outros	Formulario_Submissao.pdf	11/06/2018 15:07:45	Dirce Maria Carraro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Sobre_dados_coletados.pdf	11/06/2018 15:07:25	Dirce Maria Carraro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura_CIPE.pdf	11/06/2018 14:28:17	Dirce Maria Carraro	Aceito
Outros	Declaracao_ciencia_comprometimento_Biobanco.pdf	08/06/2018 14:12:18	Dirce Maria Carraro	Aceito
Outros	Declaracao_ciencia_comprometimento Pediatria.pdf	08/06/2018 14:11:44	Dirce Maria Carraro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Identificacao_curriculo_lattes.pdf	08/06/2018 14:10:54	Dirce Maria Carraro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Formulario_de_submissao.pdf	08/06/2018 14:10:44	Dirce Maria Carraro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_sobre_o_plano_de_recrutamento_dos_participantes_de_pesquisa_circunstancias_e_responsaveis_pela_obtencao_do_TCLE.pdf	08/06/2018 14:10:18	Dirce Maria Carraro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_sobre_a_publicacao_dos_dados_de_pesquisa_utilizando_amostras_fornecidas_e_processadas_pelo_Biobanco.pdf	08/06/2018 14:10:08	Dirce Maria Carraro	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_sobre_uso_e_destino_do_material_Biologico_publicacao_dos_dados_e_propriedade_das_informacoes_gerais.pdf	08/06/2018 14:02:04	Dirce Maria Carraro	Aceito
Orçamento	Orcamento_Financeiro_detalhado.pdf	08/06/2018 14:01:05	Dirce Maria Carraro	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_Estudo.pdf	08/06/2018 14:00:48	Dirce Maria Carraro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 5.707.507

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 18 de Outubro de 2022

Assinado por:
MAURO DANIEL SPINA DONADIO
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br

Anexo 3. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do projeto 2559/18



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

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

1. NOME DO PARTICIPANTE:
 SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 TELEFONE: DDD (.....)

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

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:
 Avaliação de DNA tumoral e perfil imunológico por biópsia líquida para diagnóstico e monitoramento de pacientes com tumor de Wilms.

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:
 Dra. Dirce Maria Carraro

3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:
 • Dra. Cecília Maria Lima da Costa – Diretora do Núcleo de Oncologia Pediátrica
 • Ana Carolina Kerekes Míguez – Aluna de Doutorado do A.C. Camargo Cancer Center
 • Dra. Giovana Tardin Torrezan – Pesquisadora do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center

4. DURAÇÃO DA PESQUISA:
 48 meses

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Avaliação de DNA tumoral e perfil imunológico por biópsia líquida para diagnóstico e monitoramento de pacientes com tumor de Wilms”, que será realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

Versão 3.0 – Junho de 2021

Página 1 de 6

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Rúbrica do
participante:



IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

Este estudo visa verificar se o DNA extraído da urina e do plasma e também o perfil imunológico do tumor e sangue de pacientes com tumor de Wilms é capaz de identificar marcas exclusivas do tumor para monitoramento da doença de forma a auxiliar os médicos na estratificação de prognóstico – ou seja, identificar de forma precoce quais pacientes correm maior risco de recidiva ou de progressão da doença. O perfil imunológico de uma pessoa está relacionado a quais células estão envolvidas na imunidade contra o tumor, ou seja, na forma que o seu corpo tenta combater a doença. Já o DNA é a molécula que contém toda a informação genética de uma pessoa, e está presente nas células do corpo. O DNA presente nas células do tumor (chamado DNA tumoral) contém informações específicas das células doentes (tumor). O sequenciamento de partes destes DNAs poderia servir como um marcador do tumor. Além disso, com este estudo pretendemos identificar genes que, quando alterados, podem elevar as chances de uma pessoa desenvolver o tumor de Wilms

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

O tumor de Wilms acontece no rim, um órgão que filtra o nosso sangue e joga fora as impurezas na forma de urina. Este tumor surge por causa de alterações que ocorrem no DNA nas células do rim e que podem ser identificadas por sequenciamento genético. O perfil de células imunes e de citocinas no corpo também pode variar como uma resposta de defesa do corpo ao câncer. Assim, nós pretendemos identificar estas células imunes, citocinas e possíveis marcas genéticas no tumor de Wilms para então identificarmos estas mesmas marcas na urina e no plasma destes pacientes. Mostrando-se efetiva, esta técnica pode vir a ajudar o médico, no futuro, na tomada de decisões quanto ao melhor tratamento, aumentando assim a efetividade da terapia e diminuindo possíveis efeitos colaterais de forma minimamente invasiva.

Além disso, a definição dos genes alterados nos pacientes com tumor de Wilms é importante não somente para a identificação de crianças e famílias com maior risco para o desenvolvimento deste tumor, auxiliando no aconselhamento genético, mas também para a elaboração de novos tratamentos através do entendimento de suas características moleculares.

VI – DESENHO DA PESQUISA

Esta pesquisa contará com participantes voluntários cujo critério clínico para inclusão é ser portador de tumor de Wilms, na faixa etária pediátrica, independente do estadiamento. No total, 30 participantes terão o DNA de suas amostras de sangue, urina e tumor sequenciados e analisados, além da avaliação do perfil de células imunes e de citocinas presentes no sangue e no tumor. O sequenciamento de DNA consiste na determinação da ordem em que os blocos de informação genética são dispostos, identificando assim possíveis blocos trocados ou fora de ordem.

Cada participante irá coletar duas amostras de sangue e uma amostra de urina em três momentos diferentes: no momento do diagnóstico (antes do início do tratamento), momentos antes da cirurgia e de cinco a dez dias após a cirurgia. Caso as amostras após a cirurgia não sejam coletadas, será realizada uma nova tentativa de coleta após o início da quimioterapia. No momento do diagnóstico também poderá ser realizada uma coleta de saliva, e uma amostra de tumor será coletada para a pesquisa no dia da cirurgia.

Versão 3.0 – Junho de 2021

Página 2 de 6

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Rúbrica do
participante:



VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

As amostras de urina e sangue serão coletadas nos dias de suas visitas ao hospital. Você não precisará vir ao hospital só para a coleta de amostras, pois as mesmas acontecerão ou nos dias de acompanhamento com o médico, das sessões de quimioterapia ou no dia da cirurgia. No total, pretendemos reunir três amostras de sua urina e de sangue, sendo a primeira coleta realizada antes do início do tratamento (em alguns casos, junto à uma amostra de saliva), outra coleta de sangue e urina no dia da cirurgia e outra de cinco a dez dias após a cirurgia. Caso não seja possível coletar a amostra de sangue e de urina após a cirurgia por qualquer motivo, a coleta poderá ser realizada na próxima oportunidade, durante a quimioterapia. Além disso, em qualquer momento você pode recusar a coleta de material, sem prejuízo ao seu tratamento ou à sua participação nesta pesquisa.

A urina será coletada em um tubo coletor com capacidade para 50ml. A coleta de urina não apresenta nenhum desconforto ao paciente. As amostras de sangue serão coletadas em dois tubos diferentes: tubo PPT ou tubo específico para DNA de plasma para a análise do DNA de plasma e tubo EDTA para a análise de DNA de leucócitos e para a análise do perfil imunológico. Serão coletados 4ml de sangue em cada tubo por profissionais capacitados no ambulatório da pediatria.

A amostra de saliva, quando realizada, será coletada de forma completamente não invasiva através de um swab bucal.

A amostra de tumor será coletada quando o mesmo for removido cirurgicamente. As amostras coletadas serão armazenadas pelo Banco de Macromoléculas do Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, e o material que sobrar e não for utilizado por este projeto de pesquisa poderá ser utilizado em outros projetos no futuro, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

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

Após a etapa de preparação de sua amostra, as sequências geradas do seu genoma serão comparadas com sequências disponíveis do genoma humano para identificação das variações, ou seja, das diferenças entre o DNA do paciente e do DNA padrão. Algumas dessas variações serão selecionadas e validadas, ou seja, serão sequenciadas novamente por outra técnica para vermos se estas variações realmente existem. Num primeiro momento somente o DNA da sua urina e do seu sangue ou saliva serão sequenciados - o DNA do tumor será sequenciado assim que este material estiver disponível para os pesquisadores, após parte do tratamento e cirurgia. Então, as alterações selecionadas serão verificadas em suas diferentes amostras de urina e plasma. Além disso, o DNA de sangue ou de saliva serão sequenciados na busca por genes que podem aumentar a predisposição genética ao tumor de Wilms. Para a análise do perfil imune celular do tumor e das suas amostras de sangue, será utilizada a tecnologia de citometria de fluxo, na qual os diferentes tipos de células imunes (linfócitos, macrófagos, entre outras) são identificadas e contabilizadas. Já para a avaliação do perfil imune solúvel, será utilizada a tecnologia Luminex, que identifica e quantifica os diferentes tipos de citocinas no plasma do sangue.

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da picada da agulha. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da picada pode haver uma mancha roxa (hematoma) e um

Versão 3.0 – Junho de 2021

Página 3 de 6

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Rúbrica do
participante:



**A.C. Camargo
Cancer Center**

pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados, o que diminui as chances de complicações.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Os participantes não se beneficiarão diretamente com a realização nesse estudo. Contudo, o estudo contribuirá para um melhor entendimento dos fatores que podem causar o aparecimento e a evolução do tumor de Wilms, além de ajudar na descoberta de características que podem auxiliar o médico na identificação de pacientes de maior risco, de forma precoce.

X – CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e da equipe de pesquisa terão acesso aos registros. Seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos neste estudo. Os dados obtidos pela análise do seu sangue, tumor, urina e saliva são confidenciais, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante ainda que informações do registro médico sejam utilizadas para publicação. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter seu anonimato. Os pesquisadores comprometem-se a manter a confidencialidade dos dados do estudo e do paciente, porém há um risco mínimo de perda desta confidencialidade. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

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

XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. **TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO:** (11) 2198-5023 – Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do AC Camargo Cancer Center, contato com Dra. Dirce Maria Carraro.

XIII. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

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

Versão 3.0 – Junho de 2021

Página 4 de 6

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Rúbrica do
participante:



**A.C. Camargo
Cancer Center**

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

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

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

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

- () Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.
 Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

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

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

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

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

XIII. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dra. Dirce Maria Carraro.
 Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.
 Telefones para contato: (11) 2198-5023.
 Endereço: Rua Taguá, 400 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente –

Versão 3.0 – Junho de 2021

Página 5 de 6

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Rúbrica do
participante:



A.C. Camargo
Cancer Center

Hospital A.C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

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

Eu,

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

Assinatura do participante ou responsável legal

____/____/____
Data

Assinatura do responsável pela pesquisa
(Dra. Dirce Maria Carraro)

____/____/____
Data

Versão 3.0 – Junho de 2021

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Página 6 de 6

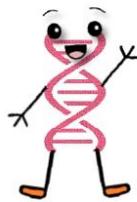
Rúbrica do
participante:

Anexo 4. Termo de assentimento (TA) do projeto 2559/18

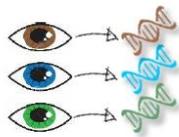


Termo de Assentimento para crianças não alfabetizadas.

Título do projeto: Avaliação de DNA tumoral e perfil imunológico por biópsia líquida para diagnóstico e monitoramento de pacientes com tumor de Wilms.



Este é o DNA!



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



E estas são as **células do nosso sistema imune**, que trabalham para identificar e eliminar vírus, bactérias e **células doentes!**

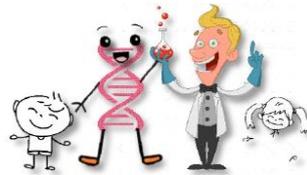


Mas o que deixa nossas células doentes?

As vezes o DNA de algumas células fica com **defeito**, tornando essas células doentes. As vezes elas podem escapar das células do sistema imune e assim temos câncer!



Mas com o tratamento, as células podem voltar a ficar saudáveis!



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



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



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



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



Também vamos ver o que as células imunes estão fazendo para tentar combater suas células doentes!



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

Você gostaria de nos ajudar? SIM NÃO

Nome da criança : _____

Assinatura _____ Data: _____

Nome da pessoa que obteve o consentimento: _____

Assinatura _____ Data: _____

Rúbrica do pesquisador responsável:

Anexo 5. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do projeto 2397/17.



A.C. Camargo
Cancer Center

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

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

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

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:
 Utilização de biópsia líquida baseada em detecção de DNA tumoral em urina e plasma em pacientes com carcinoma renal de células claras.

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:
 Dra. Dirce Maria Carraro

3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:
 • Dra. Isabela Werneck da Cunha – Responsável pelo laboratório de patologia molecular do A. C. Camargo Cancer Center
 • Dr. Stenio Cássio Zequi – Urologista do Núcleo de Urologia do A. C. Camargo Cancer Center
 • Dra. Giovana Tardin Torrezan – Pesquisadora do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular
 • MSc. Isabella Tanus Job e Meira – Aluna de Doutorado do A.C. Camargo Cancer Center

4. DURAÇÃO DA PESQUISA:
 36 meses

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Utilização de biópsia líquida baseada em detecção de DNA tumoral em urina e plasma em pacientes com carcinoma renal de células claras”, que será realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

Os participantes da pesquisa serão abordados no Departamento de Urologia no momento da consulta de rotina de seu tratamento. No primeiro momento, todos os pacientes com suspeita de tumores renais, submetidos à cirurgia de remoção do tumor ou biópsia e que aceitarem participar do estudo terão suas amostras coletadas, porém, apenas os que tiverem diagnóstico de carcinoma renal de células claras serão monitorados no decorrer deste projeto.

Versão 1.0 – Julho de 2017

Página 1 de 5

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Rúbrica do
participante:



IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

Este estudo pretende avaliar o DNA, molécula que contém as informações genéticas, presente na urina e no plasma de pacientes diagnosticados com carcinoma renal de células claras (CCRcc) com os objetivos de identificar as alterações específicas do tumor no DNA extraído do plasma e da urina, coletados em diferentes momentos do acompanhamento do paciente. Esses dados serão utilizados para monitorar os pacientes diagnosticados com CCRcc durante o tratamento para estabelecer uma abordagem útil para que no futuro possa ser utilizada para ajudar os médicos a avaliarem resposta ao tratamento e avanço da doença.

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

O carcinoma renal de células claras é o tipo de câncer renal mais comum. Este tumor pode surgir por alterações nas informações genéticas das células dos rins, e essas alterações podem ser identificadas pela metodologia de sequenciamento. Com isso, pretendemos identificar as alterações existentes nestas células do tumor e monitorar essas alterações por biópsia líquida, utilizando DNA extraídos do plasma e urina desses pacientes. Mostrando-se efetiva, esta técnica poderá auxiliar o médico com relação a classificar melhor os pacientes quanto a progressão da doença e resposta ao tratamento.

VI – DESENHO DA PESQUISA

Esta pesquisa contará com participantes voluntários cujo critério clínico para inclusão é ser diagnosticado com carcinoma renal de células claras metastáticos e não metastáticos, maiores de 18 anos de idade. Os pacientes selecionados terão o DNA de suas amostras de sangue, urina e tumor sequenciados e analisados. O sequenciamento de DNA consiste na determinação da ordem em que os blocos de informação genética são dispostos, identificando assim possíveis blocos trocados ou fora de ordem.

Todos os pacientes submetidos à cirurgia de retirada de tumores renais ou biópsia serão abordados e questionados no Departamento de Urologia se têm interesse em participar do estudo. Os participantes que concordarem em participar, terão suas amostras de urina e sangue coletadas. Após a análise do tumor, seguirão para as demais etapas apenas aqueles que forem diagnosticados com carcinoma renal de células claras, os pacientes que não tiverem este diagnóstico, não irão participar das demais coletas para este estudo.

Cada participante que preencher os critérios de inclusão, coletará cerca de 5 amostras de urina e cerca de 5 amostras de sangue ao longo do tratamento, além da amostra de tumor no dia da cirurgia de retirada do mesmo.

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

As amostras de urina e sangue serão coletadas nos dias de suas visitas ao hospital para realização de consultas. Você não precisará vir ao hospital só para a coleta de amostras. Pretendemos reunir 5 amostras de sua urina, sendo a primeira antes da cirurgia, mais quatro amostras durante a 6ª-8ª semana, 6º, 18º e 30º meses após a cirurgia. A urina será coletada em um tubo coletor com capacidade para 50 mL. A coleta de urina não apresenta nenhum desconforto ao paciente.

A amostra de sangue será coletada antes da cirurgia, junto com a primeira amostra de urina. Serão coletados 5 mL de sangue por profissionais capacitados.

A amostra de tumor será coletada quando o mesmo for removido cirurgicamente. As amostras coletadas serão processadas e armazenadas pelo Banco de Macromoléculas do Biobanco do AC Camargo Cancer Center, e o material que sobrar e não for utilizado por este projeto de pesquisa poderá ser utilizado em outros projetos no futuro, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Versão 1.0 – Julho de 2017

Página 2 de 5

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Rúbrica do
participante:



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

Após a etapa de preparação de sua amostra, as sequências geradas do seu genoma (suas informações genéticas) serão comparadas com sequências disponíveis do genoma humano para identificação das variações, ou seja, das diferenças entre o DNA do paciente e do DNA padrão.

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

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

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

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Os participantes não se beneficiarão de forma direta com a realização deste estudo. No entanto, o mesmo contribuirá para um melhor entendimento de carcinomas renais de células claras, bem como ajudará no desenvolvimento de um possível método de diagnóstico e monitoramento de pacientes com esta neoplasia.

X – CONFIDENCIALIDADE

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

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

A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não prejudicará seu acompanhamento médico e tratamento.

XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

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

XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE

Versão 1.0 – Julho de 2017

Página 3 de 5

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Rúbrica do
participante:



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

XIII. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

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

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

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

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

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

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

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

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

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

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

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

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a

Versão 1.0 – Julho de 2017

Página 4 de 5

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Rúbrica do
participante:



**A.C. Camargo
Cancer Center**

segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

XIII. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dra. Dirce Maria Carraro.
Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.
Telefones para contato: (11) 2198-5023.
Endereço: Rua Taguá, 400 – Liberdade – São Paulo.

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

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

Eu,

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

Assinatura do participante ou responsável legal

____/____/____
Data

Assinatura do responsável pela pesquisa
(Dra. Dirce Maria Carraro)

____/____/____
Data

Versão 1.0 – Julho de 2017

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Página 5 de 5

Rúbrica do
participante:

Anexo 6. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do PRONON (Biópsia Líquida), processo nº88882.366022/2019-01.



**A.C. Camargo
Cancer Center**

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

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

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

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

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

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. Dirce Maria Carraro

3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

CIPE:

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

Departamento Oncologia Clínica do A.C. Camargo Cancer Center

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

Departamento de Cirurgia Oncológica

- Dra. Fabiana Baroni Alves Makdissi

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do termo:



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

- Equipe de Enfermeiras de Pesquisa

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 60 meses

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

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

IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

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

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

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

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

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

VI – DESENHO DA PESQUISA

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

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do temo:



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

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se concordar em participar deste estudo, você será submetido a coletas de sangue (4mL a 22mL), antes do início do tratamento (cirurgia ou quimioterapia/radioterapia), e em diferentes momentos, sendo que serão feitas de 1 a 6 coletas ao longo da pesquisa. Caso haja necessidade, dependendo do tratamento e de seu consentimento, mais coletas de sangue serão realizadas.

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

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

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

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

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

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

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

X - CONFIDENCIALIDADE

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

Para se fazer pesquisas mais relevantes, é importante que os pesquisadores compartilhem informações obtidas de estudos com amostras humanas. Eles fazem isso depositando os resultados em um ou mais bancos de dados científicos, onde são armazenados junto com informações de outros estudos. Os pesquisadores podem então estudar as informações combinadas para aprender ainda mais sobre saúde e doenças. A deposição dos dados sempre é feita de forma anonimizada e seu nome e

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do temo:



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

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

XI – ACHADOS INCIDENTAIS

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

- Quero ser informado
 Não quero ser informado.

XII - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

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

XIII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

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

XIV. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

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

Rúbrica do
participante:

Abril/2021 e Versão V

Rúbrica do
responsável pela aplicação do temo:

Página 4 de 6



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

Se você escolheu a resposta do item 1, favor assinalar uma das seguintes opções:

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

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

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

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

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

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

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

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

XV. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dra. Dirce Maria Carraro

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

Telefones para contato: (11) 2189-5000 ramal 5023

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo.

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do temo:



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

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

Eu,

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

Assinatura do participante ou responsável legal

_____/_____/_____
Data

Assinatura do pesquisador responsável/ responsável pela aplicação do termo de consentimento

_____/_____/_____
Data

Rúbrica do
participante:

Abril/2021 e Versão V

Rúbrica do
responsável pela aplicação do termo:

Página 6 de 6