

Flávia Gonçalves Fernandes

**Análise de alterações somáticas no número de cópias de DNA do
carcinoma renal de células claras**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Adriane Feijó Evangelista

Co-orientador: Dr. Rui Manuel Reis

Linha de pesquisa: Biologia e patologia tumoral

Barretos, SP

2020

Flávia Gonçalves Fernandes

**Análise de alterações somáticas no número de cópias de DNA do
carcinoma renal de células claras**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Adriane Feijó Evangelista

Co-orientador: Dr. Rui Manuel Reis

Linha de pesquisa: Biologia e patologia tumoral

Barretos, SP

2020

F363a Fernandes, Flavia Gonçalves.

Análise de alterações somáticas no número de cópias de DNA do carcinoma renal de células claras. / Flavia Gonçalves Fernandes. - Barretos, SP - 2020.

170 f. : il.

Orientadora: Adriane Feijó Evangelista.

Coorientador: Rui Manuel Vieira Reis.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2020.

1. Carcinoma renal. 2. Células claras. 3. aCGH. 4. Exoma. 5. Alterações cromossômicas. 6. População brasileira. I. Autor. II. Evangelista, Adriane Feijó. III. Reis, Rui Manuel Vieira. IV. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávia Gonçalves Fernandes

Análise de alterações somáticas do número de cópias de DNA do carcinoma renal de células claras.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 16/06/2020

Banca Examinadora:

Dra Ana Cristina Victorino Krepischi

Instituição: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

Dr. Stenio de Cassio Zequi

Instituição: A.C. Camargo Cancer Center

Dra. Adriane Feijó Evangelista

Orientador

Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Coorientador

Dr. Henrique Cesar Santejo Silveira

Presidente da Banca

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentações de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu ponto de paz. Que foi fiel a mim durante essa caminhada, e a cada etapa se fazia mais presente. Obrigada por cada momento que me permitiu viver.

Devo o sucesso deste trabalho aos meus orientadores, em especial à Professora Dra. Adriane Feijó Evangelista, por compartilhar todo seu conhecimento e experiência comigo. Obrigada pela atenção e pelas valiosas horas dedicadas ao projeto, sempre com uma presença cheia de humor e otimismo. Por ter sido um verdadeiro farol durante a trajetória deste projeto. Por ter me adotado com toda compreensão e paciência que serviram como pilares de sustentação para a conclusão deste trabalho. Um furchester nunca desiste. Grata por tudo. Pela confiança antes, durante e depois deste trabalho. Pelos incentivos a novas tentativas e por ser uma constante fonte de motivação. Muito obrigada.

Sou grata ao professor Dr Rui Reis, pela oportunidade de realizar este estudo. Por tornar cada pequeno encontro em um momento de extremo aprendizado. Agradeço pela oportunidade, pelas sugestões e ensinamentos. Tenho grande admiração pelo senhor.

Agradeço à minha Banca de Acompanhamento, Dr. Henrique Silveira e Dra. Ana Krepischi, por toda a assistência durante nossos encontros. Suas contribuições foram imprecindíveis para o sucesso deste trabalho.

Ao Instituto de Ensino e Pesquisa e ao Programa de Pós-graduação, por me proporcionarem um ensino de altíssima qualidade. À secretaria do Programa de Pós-Graduação pelo suporte e compreensão ao longo de todo o caminho. Ao NEB (Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística) pelo auxílio durante a realização das análises estatísticas deste estudo, especialmente pela paciência e suporte na etapa final deste trabalho.

Ao Hospital de Câncer de Barretos por me permitir viver o sonho de fazer parte

dessa equipe e pelo apoio financeiro juntamente com o Ministério Público do Trabalho (MPT) e o *Sister Institution Network Fund* (SINF), que tornaram esse sonho uma realidade.

Sou grata por todo o grupo do CPOM e a todos os professores da pós-graduação, que influenciaram e contribuíram na minha trajetória, pelos conhecimentos e pela ciência compartilhada.

Agradeço também aos pacientes. Espero que este trabalho possa ser um dia instrumento de melhorias e contribuição para saúde dos mesmos.

Agradeço ao grupo de bioinformática, pelo companheirismo e suporte nos momentos em que me vi perdida em meio às informações novas.

Agradeço aos meus amigos, por compartilharem os melhores e piores momentos dessa batalha. Por tornar o caminho mais leve e animador. Muito obrigada pelas risadas, pelos cafés, pelas correções e incentivos.

Por fim, honro o fechamento deste ciclo dedicando a minha dissertação à minha família. Agradeço pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha trajetória. Em especial aos meus pais, meus maiores e melhores orientadores na vida, os pilares da minha formação como ser humano e os maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos. Devo a eles tudo o que sou.

Com imensa gratidão, Flavia.

Educação não transforma o mundo

Educação muda as pessoas

Pessoas transformam o mundo.

Paulo Freire

SUMÁRIO

Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Símbolos	
Resumo	
Abstract	
1 Introdução	1
1.1 Características Gerais do Carcinoma de Células Renais	1
1.1.1 Epidemiologia do Carcinoma de Células Renais	1
1.1.2 Histologia do Carcinoma de Células Renais	2
1.1.3 Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento do Carcinoma de Células Renais	3
1.1.4 Fatores de Risco e Predisposição ao Carcinoma de Células Renais	6
1.1.5 O Papel do Gene <i>VHL</i> no Carcinoma de Células Renais	8
1.2 Características Moleculares do Carcinoma Renal de Células Claras	12
1.2.1 Alterações no Número de Cópias de DNA	12
1.2.2 Detecção de Alterações no Número de Cópias de DNA	13
1.2.3 Alterações no Número de Cópias de DNA no Carcinoma Renal de Células Claras	14
2 Hipótese	19
3 Justificativa	20
4 Objetivos	21

4.1	Objetivo Geral	21
4.2	Objetivos Específicos	21
5	Material e Métodos	22
5.1	População de Estudo	22
5.2	Levantamento dos Dados Clínico-patológicos dos Pacientes	23
5.3	Análise Molecular	24
5.3.1	Extração de DNA	24
5.3.2	Experimentos de <i>Array-Comparative Genetic Hybridization</i> (aCGH)	24
5.3.3	Controle de Qualidade <i>Array-Comparative Genetic Hybridization</i> (aCGH)	25
5.3.4	Sequenciamento do Exoma	26
5.4	Análise Bioinformática	28
5.4.1	Análise Germinativa do Gene <i>VHL</i>	29
5.4.2	Análise do Número de Cópias de DNA	29
5.4.3	Carga de Alterações no Número de Cópias do DNA	31
5.4.4	Identificação de Regiões Cromossômicas e Genes de Interesse	31
5.4.5	Integração com Perfil Transcriptômico por meio da ferramenta On- comine	32
5.4.6	Anotação Funcional dos Genes Identificados	33
5.5	Análise Estatística	33
5.6	Considerações Éticas	34
6	Resultados	35
6.1	Dados Clínico-patológicos dos Pacientes com Carcinoma Renal de Células Claras	35
6.2	Dados Genômicos dos Pacientes com Carcinoma Renal de Células Claras	39

6.2.1	Análise Germinativa do Gene <i>VHL</i>	39
6.2.2	Descrição do Perfil de Alterações Somáticas no Número de Cópias de DNA	41
6.2.3	Carga de Alterações no Número de Cópias do DNA e Associações Clinicopatológicas	44
6.2.4	Regiões Cromossômicas de Interesse	46
6.2.5	Regiões Cromossômicas de Interesse e Impacto Clínico	50
6.2.6	Outras Regiões Cromossômicas Frequentes e Impacto na Sobrevida dos Pacientes com Carcinoma Renal de Células Claras	53
6.2.7	Região 14q22.1 e Impacto na Sobrevida dos Pacientes com Carcinoma Renal de Células Claras	55
6.2.8	Integração in silico das Alterações no Número de Cópias do DNA com Perfil de Expressão Gênica	57
6.2.9	Anotação Funcional dos Genes Identificados	61
7	Discussão	63
7.1	Visão Geral dos Dados da Série de Carcinoma Renal de Células Claras	64
7.2	Carga de Alterações no Número de Cópias de DNA e Associações Clinicopatológicas	67
7.3	Perfil de Alterações no Número de Cópias de DNA e Associações Clinicopatológicas	68
7.4	Integração in silico das Alterações no Número de Cópias de DNA com Perfil de Expressão Gênica	74
7.5	Limitações e Perspectivas Futuras	77
8	Conclusão	79

Referências	80
Anexos	118

LISTA DE FIGURAS

- 1 Infográfico referente ao perfil dos casos de câncer de rim admitidos pelo Hospital de Câncer de Barretos (HCB, unidades Barretos e Jales - São Paulo). Gráficos representativos do (A) número de casos novos e número por sexo, (B) estadiamento clínico e (C) taxa de sobrevida global em 5 anos. Dados sobre número de casos e estadiamento referentes ao ano de 2017. Dados de sobrevida baseados nos casos de 2000 a 2015. Informações geradas pelo departamento de Registro Hospitalar HCB. (*) C64 - CID10 para Neoplasia Maligna do Rim (Classificação Internacional de Doenças (*) EC: Estadiamento Clínico 2
- 2 Distribuição da frequência dos tipos histológicos do carcinoma de células renais. (Adaptado de Shaw, 2016)¹³. 3
- 3 Visão geral do sistema de estadiamento para câncer renal. As cores representam estruturas normalmente acometidas de acordo com cada estadio. Na coluna da esquerda, principais características para cada estadio e sua frequência em relação a todos os casos (entre parênteses). Na coluna da direita encontram-se as taxas de sobrevida em cinco anos para cada estadio. Os dados de estadiamento são baseados nas diretrizes da 8^a edição da classificação TNM da AJCC¹⁹. Os dados de sobrevida e número de casos são baseados no SEER 18 2009-2015. Todas as raças, ambos os sexos (seer.cancer.gov). Adaptado de Cohen *et al.* (2005)⁴². 6

4	Principais fatores de risco bem reconhecidos que afetam o desenvolvimento de carcinoma de células renais (CCR). Isso inclui fatores não modificáveis (verde), modificáveis (azul), ambientais, e fatores de risco ocupacionais (vermelho). Adaptado de Sims <i>et al.</i> , (2018) ⁴⁹	7
5	Frequência de deleção das regiões do cromossomo 3 em cCCRs. A parte inferior da imagem consiste em uma representação do cromossomo 3 e a localização dos genes no braço curto. A curva e a área sob a curva representam a frequência de deleção para cada gene (indicados em laranja), bem como para outras regiões do cromossomo 3. (Dados provenientes do TCGA) ⁶² . Adaptado de Lindgren <i>et al.</i> , (2018) ⁶³	9
6	Via VHL/HIF sob diferentes condições. Da esquerda para direita: condições de normóxia, hipóxia e no cCCR. A parte inferior da imagem representa o interior da célula (núcleo celular) e interações de fatores de transcrição com o DNA. Sob condições de normóxia, a pVHL (em verde) promove a degradação de HIF (em rosa). Sob hipóxia, a molécula de HIF age como fator de transcrição atuante em genes envolvidos nas respostas celulares para adaptação à hipóxia (indicado pelas setas). Na célula tumoral, a inativação ou mutação do <i>VHL</i> leva ao acúmulo de HIF na célula, seguido do aumento da atividade das mesmas e, por consequência, à super expressão de vários genes HIF-dependentes (<i>VEGF</i> , <i>PDGF</i> , <i>EPO</i> , <i>CA9</i> e <i>CXCR4</i>), conhecidos como importantes em processos de carcinogênese e metástase.	11

7	<p>Descrição do perfil de alterações somáticas no número de cópias de DNA no cCCR, segundo dados do TCGA. Gráfico da esquerda: porcentagem do genoma alterado (eixo y) de acordo com o nível de CNA (eixo x): braço cromossômico <i>versus</i> alterações focais. Gráfico da direita: número de alterações no número de cópias por amostra (eixo y) de acordo com cada tipo de câncer. Em azul, ganhos. E em vermelho, perdas. Câncer de Cólon (CRC), Glioblastoma (GBM), Câncer de Mama (BRCA) e Câncer de Ovário (OVCA). (TCGA, 2013)¹⁰³.</p>	16
8	<p>Ganhos e perdas genômicas a nível focal reportadas pelo TCGA. Perdas representadas em azul e ganhos em vermelho. Eixo y: genoma distribuído por cromossomos e genes mapeados nessa regiões; eixo x: significância das alterações de acordo com Q-valor (p-valor corrigido) (TCGA, 2013)¹⁰³. . .</p>	17
9	<p>Fluxograma representativo das principais etapas da metodologia.</p> <p><i>*ICGC: International Cancer Genome Consortium; REDCap: Research Electronic Data Capture; DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; SPSS: Statistical Package for the Social Sciences</i></p>	22
10	<p>Gráfico Box-plot representativo da qualidade dos experimentos de aCGH no tecido tumoral</p>	26
11	<p>Gráfico Box-plot representativo da cobertura nos experimentos de Exoma; tecido tumoral e normal.</p>	27
12	<p>Fluxograma representativo das principais etapas da análise bioinformática.</p>	28

13	Corte Logarítimo estabelecido para a classificação de ganhos e perdas nos dados de CGH. O eixo Y representa os valores da razão de Log2. O eixo X é a representação de um cromossomo. Em azul, ganhos e em vermelho, perdas.	30
14	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global dos 92 pacientes com ccRCC.	37
15	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de acordo com (A) estadia- mento clínico, (B) grau histológico, (C) metástase e (D) tamanho do tumor. O tempo foi calculado em meses e a significância (p-valor) pelo teste de Log-rank.	38
16	Representação das CNAs ao longo de todo o genoma, por cromossomo. Regiões de ganhos em azul e regiões de perda em vermelho. (Dados do TCGA, aCGH e exoma, respectivamente)	43
17	Frequência das alterações significativas nos tumores de cCCR identificadas pela ferramenta STAC nos dados de aCGH. A parte superior da imagem indica os cromossomos. A lateral esquerda representa a frequência das alte- rações. Ganhos são indicados em azul e perdas em vermelho.	44
18	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global para pacientes com perda de 14q.	51
19	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de acordo com regiões sig- nificativas para alterações no número de cópias e ausentes para genes de câncer.	55
20	Kurvas de Kaplan-Meier para sobrevida global para pacientes com perda do gene <i>NIN</i>	57

21	<p><i>Circus plot</i> evidenciando a associação de CNAs e expressão gênica a partir dos dados de 579 amostras clínicas de cCCR do TCGA. O círculo externo representa regiões de CNAs ao longo do genoma por cromossomo. Em azul, ganhos e em vermelho, perdas. O círculo interno contém genes com alteração na expressão gênica concomitante. Pontos verdes representam genes com perda de expressão e pontos vermelhos, genes com ganho de expressão. . .</p>	58
22	<p>Anotação funcional doos genes identificados nas regiões de interesse. Os dados foram gerados por meio do banco de dados DAVID. No eixo y encontram-se as top 10 categorias enriquecidas do <i>Gene Ontology</i> e do Kegg. No eixo x está representado o valor de P corrigido por Benjamini-Hochberg em escala de -10 vezes o log10 do mesmo.</p>	62

LISTA DE TABELAS

1	Alterações cromossômicas somáticas recorrentes e alvos terapêuticos no CCR.	15
2	Principais características epidemiológicas e clinicopatológicas dos 92 pacientes brasileiros com ccRCC.	36
3	Anotação das variantes germinativas do gene <i>VHL</i> (ANNOVAR).	40
4	Resumo dos eventos de CNAs divididos por número total e mediana por paciente. As colunas representam o número de CNAs de acordo com a técnica (a-CGH e Exoma) em comparação aos dados do TCGA.	41
5	Análise Univariada de características significativamente enriquecidas de acordo com a carga de CNAs e o tipo de evento.	45
6	Regressão Logística Binária para as variáveis clínicas significativas na univariada, de acordo com o valor de corte de 50 CNAs.	45
7	Resultado do teste de frequência significativa (STAC), ranqueados por frequência de ambas técnicas nos dados do Hospital de Câncer de Barretos (aCGH e exoma) e nos dados do TCGA. Os resultados foram filtrados para regiões com genes de câncer. Dados gerados pelo software Nexus Copy Number. Significância ajustada para $p \leq 0.05$ e porcentagem de agregação mínima de 20%)	47

8	<p>Resultado do teste de frequência significativa (STAC) ranqueados por frequência para os dados de aCGH em comparação com dados de exoma e TCGA. Para fins de associação clínica, regiões próximas e de mesma frequência (coluna "Citobandas") foram agrupadas em 12 regiões (coluna "Região"). Resultados filtrados para regiões com genes de câncer. Dados gerados pelo software Nexus Copy Number. Significância ajustada para $p \leq 0.05$ e porcentagem de agregação mínima de 20%)</p>	49
9	<p>Análise univariada de associação entre características clinicopatológicas e alterações moleculares das regiões de interesse.</p>	50
10	<p>Regressão Logística Binária a partir das variáveis clínico-patológicas associadas às regiões cromossômicas de interesse.</p>	52
11	<p>Análise Univariada para genes associados a expressão gênica nas 579 amostras clínicas de cCCR do TCGA e as características clínicas significativamente enriquecidas para cada gene.</p>	60

LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH	<i>Array of Comparative Genomic Hybridization</i>
BRCA	Câncer de Mama
CCR	Carcinoma de células renais
cCCR	Carcinoma de células renais de células claras
chRCC	Carcinoma renal cromóforo
CNAs	<i>Copy Number Aberrations</i>
CRC	Câncer de Cólon
Cy3	Cianina-3
Cy5	Cianina-5
DLRS	<i>Derivative of the Log Ratio Spread</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
FASST2	<i>Fast Adaptive States Segmentation Technique 2</i>
GBM	Glioblastoma
GISTIC	<i>Genomic Identification of Significant Targets in Cancer</i>
HCB	Hospital de câncer de Barretos
ICGC	<i>International Cancer Genome Consortium</i>
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i>
miRNAs	microRNAs
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVCA	Câncer de Ovário
pRCC	Carcinoma renal papilar
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
STAC	<i>Significance Testing for Aberrant Copy Number</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TKIs	Inibidores de tirosina quinase anti-angiogênicos
TSGs	<i>Tumor suppressor genes</i>
UMD	<i>Universal Mutation Database</i>
UPD	Dissomia uniparental (do inglês <i>Uniparental Disomy</i>)
UTR	<i>Untranslated region</i>
VEP	<i>Variant Effect Predictor</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
ng	Nanograma
h	Horas
m	Minutos

RESUMO

Análise de alterações somáticas no número de cópias de DNA do carcinoma renal de células claras

O carcinoma de células renais (CCR) é o décimo sexto câncer em incidência e mortalidade no mundo para o ano de 2018 e é responsável por 85-95% dos casos de câncer de rim. O subtipo histológico mais frequente é o de células claras (cCCR) (70%-85%), sendo também o mais agressivo e o responsável pelo maior número de mortes. As alterações somáticas no número de cópias de DNA (CNAs) são mecanismos intimamente associados com a patogênese do cCCR e têm sido fonte para a descoberta de alvos terapêuticos. Dentre as alterações cromossômicas recorrentes para esse tipo tumoral descritas pelo consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) encontram-se a perda do 3p (91%), ganho do 5q (67%) e perda do 14q (45%), que têm se mostrado importantes para o desenvolvimento e progressão da doença. A deleção do braço curto do cromossomo 3, onde está localizado o gene supressor tumoral von Hippel-Lindau (*VHL*), é considerado um *hallmark* do cCCR. No entanto, a inativação do *VHL* isoladamente não é suficiente para o desenvolvimento da doença. Sugerindo, portanto, que outras alterações também possam contribuir para o surgimento e progressão do cCCR. Apesar dos diversos estudos moleculares, não existe atualmente uma caracterização de tais alterações na população brasileira, sendo este o objetivo do estudo. Para isso, foram avaliados 92 pacientes de origem brasileira com cCCR nefrectomizados no Hospital de Câncer de Barretos no período de 2008 a 2013. O DNA extraído das áreas tumorais macrodissecadas foi analisado para CNAs por meio das técnicas de *Comparative genomic hybridisation* (aCGH) e exoma pelas plataformas Agilent 4x180K e Illumina, respectivamente. A análise

bioinformática foi feita através do *software Nexus Copy Number (Biodiscovery)* considerando as regiões significativas de acordo com a ferramenta *Significance Testing for Aberrant Copy Number (STAC)*. Dados clínicos e de sobrevida foram utilizados para explorar associações clínicas. A coorte foi composta principalmente por pacientes em estádios iniciais e doença localizada. Em média 10 a 12% do genoma de cada paciente encontrou-se alterado. As alterações mais significativas incluem perda dos cromossomos 3p (87,3%), 14q (35,8%), 6q (29,3%), 9p (28,6%) e 10q (25%), e ganho dos cromossomos 5q (59,7%), 7p (29,3%) e 16q (20,6%). A análise *in silico* revelou 19 genes mapeados nas regiões significativas, incluindo genes conhecidos como oncogênicos (*SETD2*, *BAP1*, *FLT4*, *PTEN*) e possíveis *drivers* (*FGFR4* e *NSD1*) para CCR. Além disso, uma fração dos genes identificados nas regiões de CNAs foram associadas com expressão gênica e pior sobrevida. As CNAs encontradas correspondem às alterações relatadas em estudos anteriores. Além disso, novas alterações foram identificadas como significativas para a sobrevida global. No geral, o estudo fornece o perfil de 92 pacientes brasileiros com cCCR e pontua regiões potencialmente válidas de futura investigação.

Palavras-chave: 1. Carcinoma renal 2. Células claras 3. aCGH 4. Exoma 5. Alterações cromossômicas 6. *In silico* 7. Bioinformática

ABSTRACT

Analysis of somatic DNA copy number alterations of clear cell renal carcinoma

Renal Cell Carcinoma (RCC) is the most prevalent type of kidney cancer, accounting for about 90% of the cases. It is the sixteenth cancer in incidence and mortality for 2018 worldwide. Clear cell renal cell carcinoma is the most common histological subtype of RCC, and is also the more aggressive and responsible for the highest mortality rates. Somatic copy number alterations (CNAs) are often associated with the pathogenesis of ccRCC and have been a source for new reliable biomarkers and therapeutic targets. The most recurrent chromosomal changes described by The Cancer Genome Atlas (TCGA) consortium for this tumor type includes 3p loss (91%), 5q gain (67%) and 14q loss (45%), which have shown to play important roles on development and disease progression. The Loss of 3p, which harbours von Hippel-Lindau gene (*VHL*), is considered an hallmark of ccRCC. However, inactivation of *VHL* alone is not sufficient for cancer development. Thus suggesting that other alterations may also contribute to ccRCC development and disease progression. Despite several molecular studies, there is currently no description of chromosomal alterations in a Brazilian cohort of patients with ccRCC, which is the main purpose of the study. Therefore, a total of 92 ccRCC Brazilian patients who underwent nephrectomy at Barretos Cancer Hospital between 2008 and 2013 were analyzed for SCNAs using Comparative Genomic Hybridisation (aCGH) and exome techniques. DNA was extracted from macrodissected tumor areas and analyzed for SCNAs by Agilent 4x180K and Illumina platforms. Bioinformatics analysis was performed using Nexus Copy Number (Biodiscovery) software and significant

regions were identified according to Significance Testing for Aberrant Copy Number (STAC) algorithm. Clinical and survival data were used to explore associations. The cohort was mainly consistent of early stages and localized disease. On average, 10-12% of the genome of each patient was found to be altered. The most frequent alterations identified by STAC included loss of 3p (87,3%), 14q (35,8%), 6q (29,3%), 9p (28,6%) and 10q (25%), and gains of 5q (59,7%), 7p (29,3%) and 16q (20,6%). The CNAs found in ccRCC brazilian patients correspond to the alterations reported in previously cohorts. In addition, new alterations were identified as significant for overall survival. *In silico* analysis revealed 19 genes mapped to CNAsignificant regions, including genes known to be oncogenic (*SETD2*, *BAP1*, *FLT4* e *PTEN*) and predicted drivers (*FGFR4* e *NSD1*). In addition, a fraction of the CNA genes were associated with gene expression and worse survival. Overall, this study provides the CNA profile of 92 ccRCC Brazilian patients and highlights regions potentially worthy of further investigation.

Keywords: 1. Renal carcinoma 2. Clear cell 3. aCGH 4. Exome 5. Chromosomal alterations 6. In silico 7. Bioinformatics

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais do Carcinoma de Células Renais

1.1.1 Epidemiologia do Carcinoma de Células Renais

O carcinoma de células renais (CCR) representa aproximadamente 2-3% de todas as neoplasias malignas em adultos¹ e trata-se de um conjunto complexo de doenças, originário do epitélio dos túbulos renais, responsável por 85-95% dos casos de câncer de rim^{2; 3; 4; 5; 6}. Os demais, 10-15% dos tumores, incluem carcinomas incomuns, não classificados ou tumores benignos^{2; 7; 8; 9}. Apenas 4-5% dos casos de CCRs são hereditários, ocorrendo de forma esporádica na grande maioria dos casos⁷. A incidência de CCR é maior em países desenvolvidos e acomete, em sua maioria, indivíduos do sexo masculino, com uma relação homem:mulher de 2:1¹. A maioria dos pacientes apresenta uma idade média de 64 anos ao diagnóstico¹⁰. Estimativas para o ano de 2018 apontaram 403.262 novos casos e 175.098 mortes por câncer de células renais no mundo todo. No Brasil, para o mesmo ano, o número estimado de novos casos foi de 10.688, com uma taxa de mortalidade de 4.084 indivíduos, um aumento no número de casos comparado ao ano de 2012 (6.200 casos e 3.000 mortes)¹.

No ano de 2017, os tumores urológicos representaram 12.7% de todos os casos de câncer admitidos pelo Hospital de Amor (unidades de Barretos e Jales - São Paulo). Para o mesmo ano, 154 novos casos de câncer renal foram registrados (1.4% do total de casos), sendo a maioria do sexo masculino (Figura 1A). De todos os casos de câncer renal admitidos em 2017, aproximadamente 50% deles foram diagnosticados em estadiamento avançado (III/IV) (Figura 1B). Segundo dados compilados de 2000 à 2015, a taxa média de sobrevida em 5 anos dos pacientes avançados é de aproximadamente 30% (Figura 1C)

(https://infogram.com/rhc_hcb).

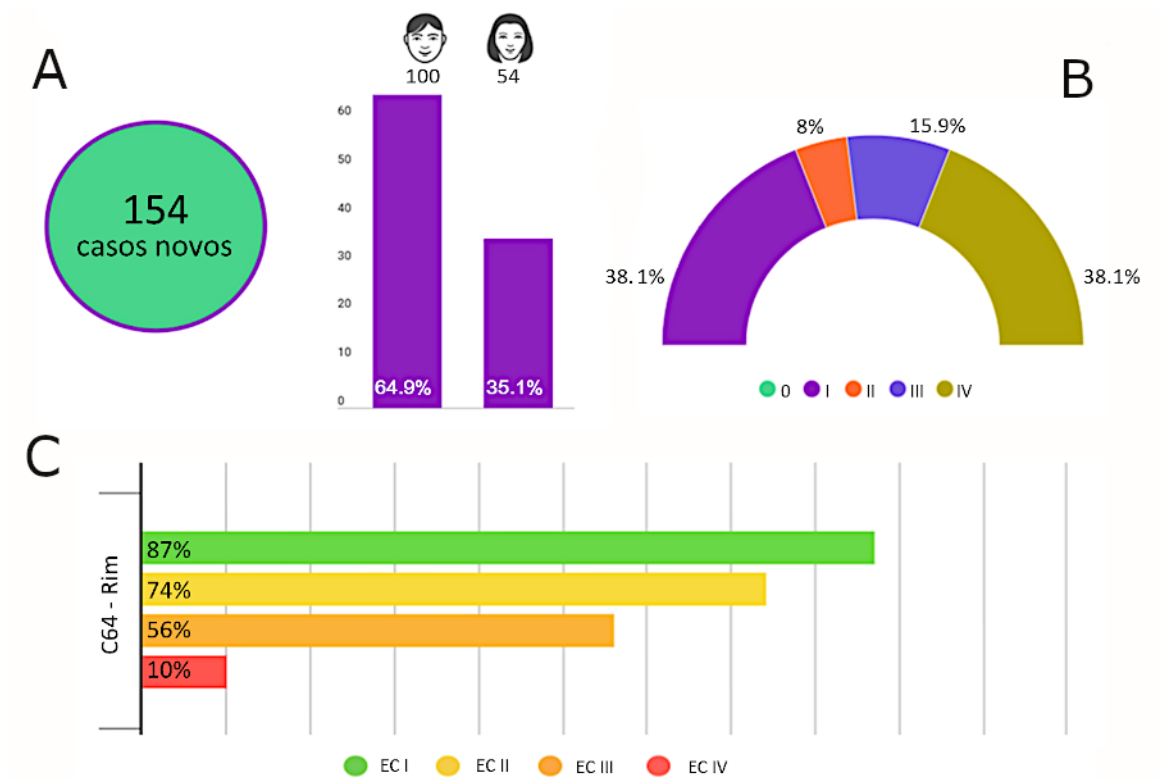


Figura 1. Infográfico referente ao perfil dos casos de câncer de rim admitidos pelo Hospital de Câncer de Barretos (HCB, unidades Barretos e Jales - São Paulo). Gráficos representativos do (A) número de casos novos e número por sexo, (B) estadiamento clínico e (C) taxa de sobrevivência global em 5 anos. Dados sobre número de casos e estadiamento referentes ao ano de 2017. Dados de sobrevivência baseados nos casos de 2000 a 2015. Informações geradas pelo departamento de Registro Hospitalar HCB. (*) C64 - CID10 para Neoplasia Maligna do Rim (Classificação Internacional de Doenças) (*) EC: Estadiamento Clínico

1.1.2 Histologia do Carcinoma de Células Renais

A classificação atual dos tumores de células renais foi proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS)¹¹, em concordância com a classificação publicada pela *International Society of Urological Pathology* (ISUP)¹², a qual baseia-se em aspectos patológicos e genéticos. Segundo essa classificação, os subtipos mais frequentes de carcinoma renal são: carcinoma de células claras (70%-85%); carcinoma papilar (10%-15%); e carcinoma cromóforo (5%) (Figura 2).

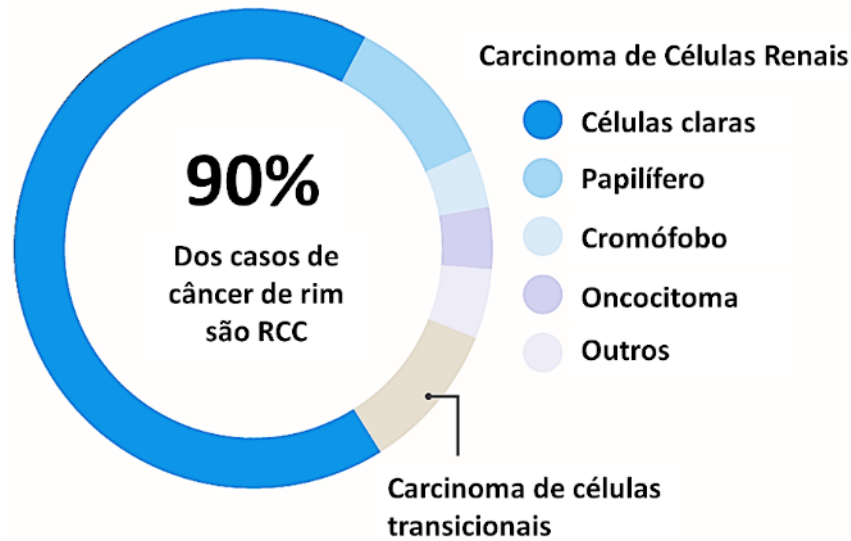


Figura 2. Distribuição da frequência dos tipos histológicos do carcinoma de células renais. (Adaptado de Shaw, 2016)¹³.

O carcinoma renal de células claras é o subtipo mais comum de CCR e também o mais agressivo. Mais de 90% dos tumores de carcinoma renal de células claras apresentam deleção do braço curto do cromossomo 3, mais especificamente em 3p25.3, onde se encontra o gene supressor tumoral von Hippel-Lindau (*VHL*), responsável pela síndrome familiar de tumores von Hippel-Lindau^{14; 15; 16}.

1.1.3 Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento do Carcinoma de Células Renais

O diagnóstico do CCR é fortemente sugestivo por estudos de imagem. Hoje, mais de 60% dos casos são detectados acidentalmente. Muitos pacientes com pequenas massas renais permanecem assintomáticos até nos estadiamentos mais avançados. Atualmente, a tríade clássica de sinais e sintomas: dor no flanco, hematúria macroscópica e massa abdominal palpável é rara e se associa com doença avançada e pior prognóstico. Essa mudança se deu, basicamente, em consequência do aumento do uso de técnicas radiológicas

não invasivas, como ultrassonografia ou tomografia computadorizada de abdômen, feitas por outros motivos¹⁷. Biópsias de tumores renais também são raras e são utilizadas a fim de evitar cirurgias desnecessárias no caso de uma lesão benigna, selecionar pacientes para vigilância ativa ou obter histologia antes do tratamento ablativo. As biópsias também podem ser usadas no contexto metastático para a seleção de tratamentos e cirurgias adequados¹⁸.

O estadiamento tumor-linfonodo-metástase (TNM) do Comitê Conjunto Americano de Câncer (AJCC) é o sistema de estadiamento mais comumente usado e universalmente aceito. Desde sua primeira publicação em 1977, a AJCC passou por várias alterações e, desde janeiro de 2018, sua 8ª edição é utilizada na prática clínica¹⁹ (Figura 3). O sistema reflete o tamanho do tumor, a extensão da invasão de estruturas adjacentes, o envolvimento dos linfonodos (disseminação regional) e metástase à distância (principalmente pulmão, ossos, linfonodos, fígado, glândula adrenal e cérebro) (Figura 3). Aproximadamente 30% dos pacientes com CCR apresentam metástase ao diagnóstico, e a recorrência se desenvolve em mais de um terço dos pacientes tratados para doença localizada^{20; 21; 22}. Aqueles com câncer renal localizado costumam ter bom prognóstico, por outro lado, aqueles com doença avançada apresentam uma diminuição significativa na sobrevida. A taxa de sobrevida em 5 anos para os estágios I e II é maior que 70%, com a nefrectomia sendo amplamente curativa. Já para os pacientes diagnosticados em estádios III (extensão local) e IV (metástase) a taxa de sobrevida de 5 anos cai para aproximadamente 60% e 10%, respectivamente¹. Inúmeros marcadores moleculares, bem como perfil de expressão gênica e estudos de GWAS têm sido estudados, mas até o momento não foi possível melhorar os sistemas prognósticos atuais, logo não são válidos de serem incluídos na rotina clínica^{23; 24; 25}.

O tratamento cirúrgico é considerado o tratamento primário e amplamente curativo para o CCR localizado^{26; 27}, feito através de nefrectomia parcial ou radical, aberta ou laparoscópica. Já o CCR metastático, costuma ser resistente à quimioterapia tradicional e altamente resistente à radioterapia e requer terapia sistêmica. Durante muito tempo a única terapia sistêmica para a doença metastática era baseada em imunoterapias como interferon- α (IFN- α) e interleucina-2, porém sem benefícios na sobrevida dos pacientes^{28; 29; 30; 31}. Na última década, no entanto, avanços foram feitos no tratamento do CCR metastático, com a aprovação de diversas terapias-alvo que conseguiram a estabilização da doença e aumento de sobrevida incluindo sorafenibe³², sunitinibe³³, bevacizumabe³⁴, pazopanibe³⁵ e axitinibe³⁶, que inibem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seu receptor (VEGFR); e everolimus³⁷ e temsirolimus³⁸, inibidores de mTOR. Outros alvos além do VEGFR também foram adicionados ao combate à doença metastática como o cabozantinibe e lenvatinibe; e imunoterapias como o nivolumabe^{29; 39; 40}. Recentemente, o estudo CheckMate 214 relatou superioridade do nivolumabe e do ipilimumabe sobre o sunitinibe em pacientes de risco intermediário e de baixo risco, levando a uma mudança de paradigma no tratamento de primeira linha de pacientes metastáticos⁴¹. Esses achados resultaram em uma recomendação atualizada do tratamento sistêmico da doença metastática com inibidores de *checkpoint* imunológicos⁴¹.

Apesar das recentes melhorias nas estratégias de tratamento do carcinoma renal, a identificação de novos marcadores moleculares não invasivos para prognóstico, diagnóstico precoce e monitoramento do tratamento continua sendo um grande desafio no manejo do CCR³⁹.

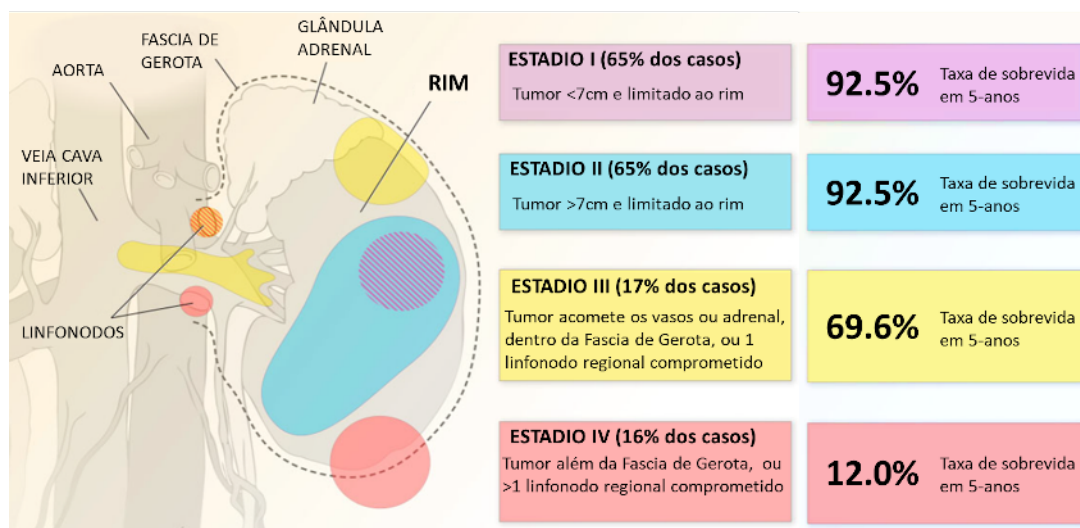


Figura 3. Visão geral do sistema de estadiamento para câncer renal. As cores representam estruturas normalmente acometidas de acordo com cada estágio. Na coluna da esquerda, principais características para cada estágio e sua frequência em relação a todos os casos (entre parênteses). Na coluna da direita encontram-se as taxas de sobrevivência em cinco anos para cada estágio. Os dados de estadiamento são baseados nas diretrizes da 8ª edição da classificação TNM da AJCC¹⁹. Os dados de sobrevivência e número de casos são baseados no SEER 18 2009-2015. Todas as raças, ambos os sexos (seer.cancer.gov). Adaptado de Cohen *et al.* (2005)⁴².

1.1.4 Fatores de Risco e Predisposição ao Carcinoma de Células Renais

Obesidade e hipertensão são fatores de risco estabelecidos para CCR^{43; 44; 45}. Outros fatores de risco modificáveis incluem, tabagismo e alcoolismo (Figura 4), além de outras condições médicas como doença renal crônica, hemodiálise, transplante renal, doença cística renal adquirida e, possivelmente, diabetes mellitus^{5; 46}. Os fatores não-modificáveis associados ao desenvolvimento do CCR incluem principalmente fatores genéticos, que englobam o diagnóstico prévio de CCR, histórico familiar e a Síndrome de von-Hippel Lindau (Figura 4). A história familiar contribui para uma parcela do risco de CCR, onde pacientes com casos de câncer renal na família apresentam um risco aumentado em duas vezes em relação àqueles sem casos prévios na família⁴⁷. Além disso, o número de casos aumenta notavelmente com a idade e é maior para os homens do que para as mulheres¹. As

razões para esse perfil não são conhecidas, apesar de exposições genômicas, ocupacionais e ambientais, como o tabagismo, já terem sido associadas⁵. Entre fatores ocupacionais e ambientais, o tricloroetileno está entre um dos agentes classificados como carcinogênicos para câncer renal (Grupo 1) segundo a Avaliação de Riscos Carcinogênicos para Humanos do IARC⁴⁸. Também estão nessa categoria o tabagismo e radiações (X e gama)⁴⁸.

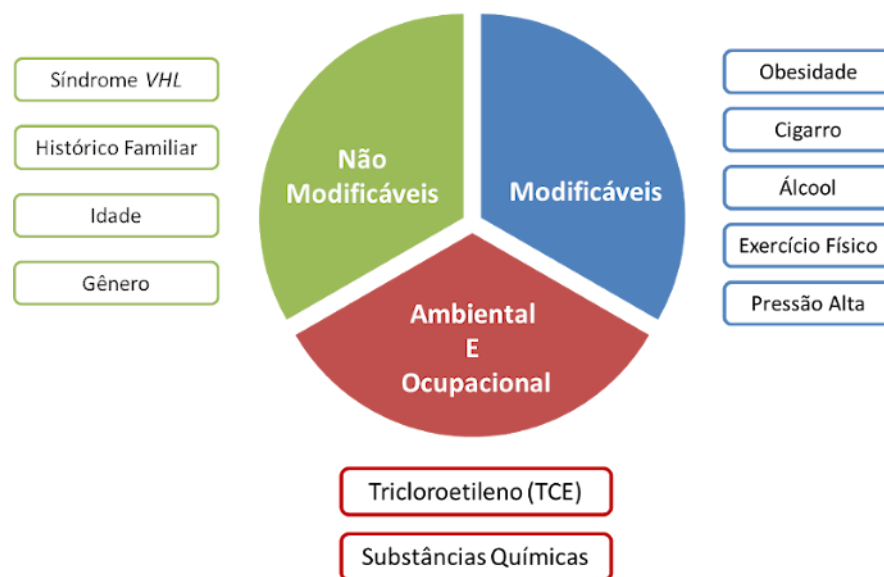


Figura 4. Principais fatores de risco bem reconhecidos que afetam o desenvolvimento de carcinoma de células renais (CCR). Isso inclui fatores não modificáveis (verde), modificáveis (azul), ambientais, e fatores de risco ocupacionais (vermelho). Adaptado de Sims *et al.*, (2018)⁴⁹.

Para o CCR, onze genes de predisposição ao cancer renal foram identificados até agora —*VHL*, *MET*, *FLCN*, *FH*, *SDHB/C/D*, *TSC1*, *TSC2*, *BAP1*, e *MITF*— 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57. Embora a identificação desses genes tenha levado a importantes descobertas sobre a patogênese do CCR, essas doenças representam uma parcela muito pequena do risco dobrado observado em parentes de primeiro grau de pacientes com CCR^{58; 47}. Portanto, muitos casos de CCR familiar não apresentam mutações nos genes de suscetibilidade conhecidos. Isso sugere que fatores genéticos ainda não identificados

contribuem para o desenvolvimento do CCR.

1.1.5 O Papel do Gene *VHL* no Carcinoma de Células Renais

O gene *VHL* é responsável pela síndrome familiar de tumores von-Hippel-Lindau que predispõe à formação de múltiplas lesões neoplásicas, incluindo angiomas retiniais, hemangioblastomas do sistema nervoso central, tumores pancreáticos e carcinomas de células renais, sendo este último a causa número um de morte em pacientes com a síndrome de von-Hippel-Lindau^{59; 50}. O *VHL* é um supressor tumoral localizado na região 3p25.3. Os genes supressores tumorais *PBRM1*, *SETD2* e *BAP1* também estão localizados no braço curto do cromossomo 3 (Figura 5), cuja perda está presente em mais de 90% dos cCCRs⁶⁰, prejudicando simultaneamente quatro genes supressores tumorais. Isso parece confirmar o fato da perda do 3p ser quase um evento universal e precoce no cCCR⁶¹.

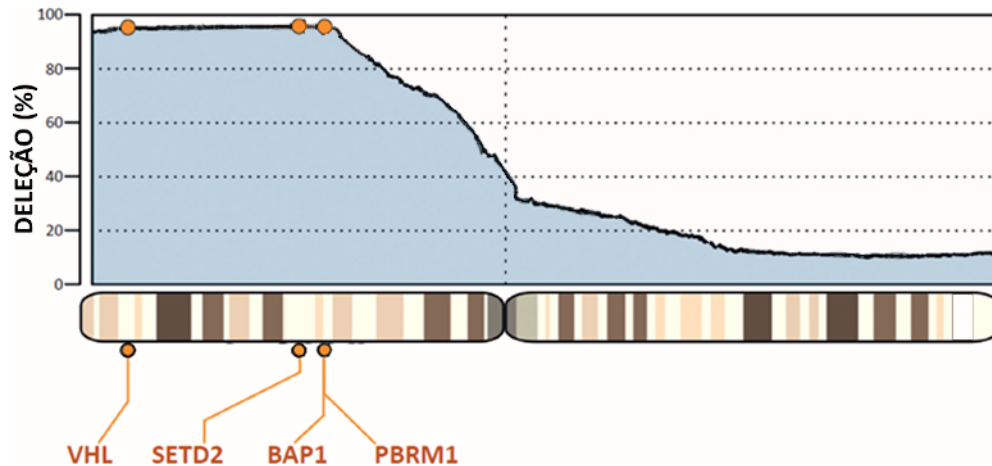


Figura 5. Frequência de deleção das regiões do cromossomo 3 em cCCRs. A parte inferior da imagem consiste em uma representação do cromossomo 3 e a localização dos genes no braço curto. A curva e a área sob a curva representam a frequência de deleção para cada gene (indicados em laranja), bem como para outras regiões do cromossomo 3. (Dados provenientes do TCGA)⁶². Adaptado de Lindgren *et al.*, (2018)⁶³.

A maioria dos CCRs de células claras demonstra alterações no gene *VHL* consistente com a “hipótese de dois eventos” de Knudson sobre a ocorrência de dois eventos mutacionais para a formação de tumores envolvendo genes supressores tumorais⁶⁴. Nos casos hereditários de cCCRs, uma cópia deficiente do gene *VHL* pode ser herdada na linhagem germinativa (considerado o primeiro evento) e a outra cópia normal. A doença se desenvolve quando o alelo remanescente sofre uma mutação somática, deleção ou metilação da região promotora espontâneas (segundo evento). Nos casos esporádicos, ambos os alelos normais de uma mesma célula devem sofrer mutações somáticas (dois eventos) para o desenvolvimento da doença. No CCR de células claras esporádico um alelo pode ser alterado por meio de mutação ou metilação da região promotora e o outro através de deleção, caracterizando perda de heterozigosidade (LOH do inglês *lost of heterozygosity*). Na maioria dos estudos, grande parte dos tumores apresentam, além das mutações somáticas, perda do alelo remanescente ou LOH), sendo esta última a alteração molecular observada em maior frequência^{65; 66}.

O papel biológico conhecido do *VHL* é o envolvimento nos processos de ubiquitinação e degradação proteossomal (Figura 6). Entre os seus alvos estão os fatores de hipóxia *HIF1* e *HIF2*, que são fatores de transcrição atuantes em genes-chave relacionados principalmente com o processo de angiogênese⁶⁷. Sob condições normais, a pVHL promove a degradação de *HIF*. Na célula tumoral, a inativação ou mutação do *VHL* leva ao acúmulo de HIF na célula, seguido do aumento da atividade das mesmas e, por consequência, à super expressão de vários genes HIF-dependentes como *VEGF*, *PDGF*, *EPO*, *CA9* e *CXCR4*, que são conhecidos como importantes em processos de carcinogênese e metástase⁶⁷ (Figura 6). A importância funcional do *VHL* em CCR foi reportada uma vez que a reintrodução da pVHL selvagem em células *VHL*-deficientes foi capaz de suprimir o crescimento tumoral tanto *in vivo* quanto *in vitro*, demonstrando seu papel crítico no desenvolvimento de CCR de células claras^{68; 69}. A relação entre as mutações do *VHL* e aspectos clínicos da doença ainda são contraditórios e evidências sugerem que a inativação do *VHL* isoladamente não é suficiente para o desenvolvimento de CCR de células claras^{70; 71; 72; 73; 74; 75}. Dessa forma, acredita-se que outros genes, além do *VHL* e *HIF*, bem como outras alterações, também possam ser importantes no desenvolvimento da doença⁷⁶.

Embora a fração de CCRs hereditários seja pequena, o conhecimento sobre sua patogênese é de grande importância para a compreensão do câncer renal esporádico⁶⁰. Atualmente as mutações germinativas em *VHL* encontram-se depositadas online em um banco de dados universal para mutações germinativas identificadas em pacientes com a síndrome de von Hippel-Lindau, UMD-VHL (do inglês *Universal Mutation Database*)⁷⁷. De acordo com o seu conteúdo, as mutações germinativas do *VHL* podem ser divididas basicamente em três grupos: (1) grandes deleções, que respondem a aproximadamente

40% de todas as mutações, (2) mutações *missense* com aproximadamente 30% e (3) mutações que resultam em proteínas truncadas (*nonsense*, inserções e deleções *frameshift*, mutações em sítios de *splicing*) com aproximadamente 30% das alterações.

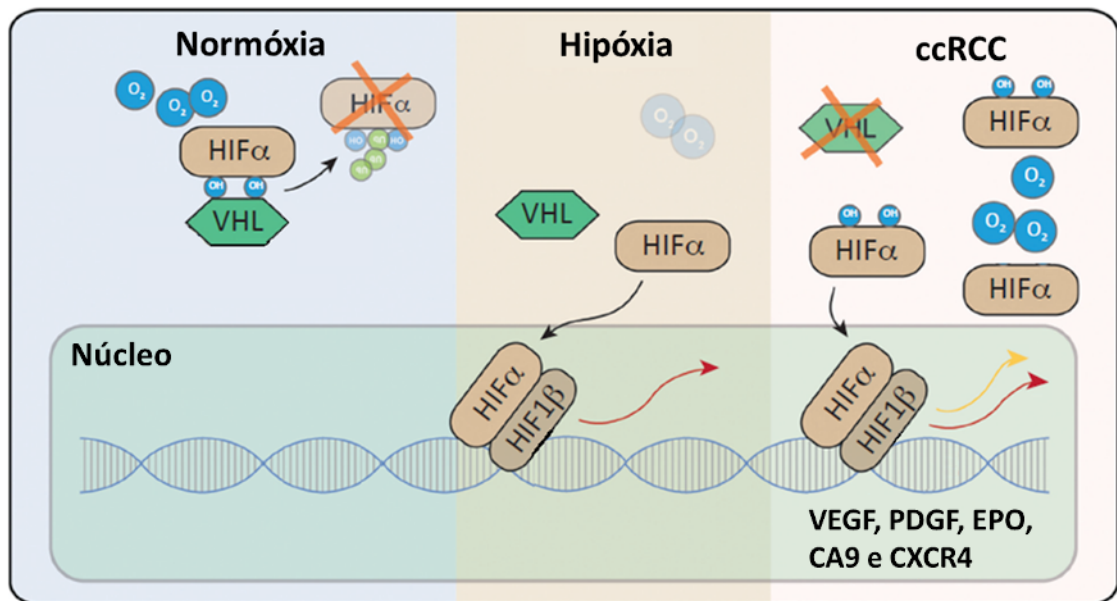


Figura 6. Via VHL/HIF sob diferentes condições. Da esquerda para direita: condições de normóxia, hipóxia e no cCCR. A parte inferior da imagem representa o interior da célula (núcleo celular) e interações de fatores de transcrição com o DNA. Sob condições de normóxia, a pVHL (em verde) promove a degradação de HIF (em rosa). Sob hipóxia, a molécula de HIF age como fator de transcrição atuante em genes envolvidos nas respostas celulares para adaptação à hipóxia (indicado pelas setas). Na célula tumoral, a inativação ou mutação do *VHL* leva ao acúmulo de HIF na célula, seguido do aumento da atividade das mesmas e, por consequência, à super expressão de vários genes HIF-dependentes (*VEGF*, *PDGF*, *EPO*, *CA9* e *CXCR4*), conhecidos como importantes em processos de carcinogênese e metástase.

1.2 Características Moleculares do Carcinoma Renal de Células Claras

1.2.1 Alterações no Número de Cópias de DNA

As células carregam diferentes tipos de mutações associadas ao desenvolvimento do câncer. Algumas alterações afetam apenas uma ou algumas bases do genoma. Outras, conhecidas como alterações no número de cópias (CNAs), envolvem porções maiores do genoma que podem incluir perdas ou ganhos de um braço cromossômico ou de um cromossomo inteiro^{78; 79}. As alterações somáticas no número de cópias (CNAs) são quase onipresentes no câncer e alteram uma porção maior do genoma do câncer do que qualquer outro tipo de alteração genética somática⁸⁰. A maioria delas compreendem eventos grandes^{78; 79} que podem abrigar múltiplos genes^{81; 82} capazes de influenciar desfechos de câncer^{83; 84; 85}.

A compreensão de cada alteração, incluindo a carga de CNAs em cada paciente, pode ajudar na compreensão da biologia tumoral e conseqüentemente auxiliar em decisões clínicas. A carga de CNAs é uma medida fundamental do nível de alterações de um tumor e significa o quanto do genoma foi alterado (porcentagem). Recentemente, a carga de CNA (independente da carga mutacional) foi reconhecida como um fator prognóstico associado a recidivas e mortalidade e como um marcador útil em contextos clínicos para ajudar a avaliar o risco de pacientes com diferentes tipos de câncer, incluindo rim⁸⁶.

1.2.2 Detecção de Alterações no Número de Cópias de DNA

A detecção de CNAs é importante para a descoberta de eventos *drivers* e para o entendimento do câncer^{79; 78}. Muitas CNAs são identificadas em regiões que contêm oncogenes e genes supressores tumorais e, dessa forma, podem associar com desfechos clínicos e prognósticos em vários tipos de câncer⁷⁹. Isso demonstra a possível utilização de CNAs como biomarcadores.

Nos últimos anos, técnicas *high-throughput*, incluindo *arrays* de hibridação genômica comparativa (aCGH)⁸⁷, *SNP arrays*⁸⁸ e sequenciamento de nova geração (NGS)^{89; 90; 91}, têm sido utilizadas para identificação de CNAs. As tecnologias de microarranjos têm sido amplamente utilizadas desde o final dos anos 90 por mais de uma década como um teste acessível e de alta resolução para detecção de alterações cromossômicas⁹². É uma abordagem muito comum para detecção de CNAs, principalmente devido à tecnologia ter sido desenvolvida há mais tempo e os métodos de detecção serem bem estabelecidos, inclusive em câncer⁹³.

Recentemente, o sequenciamento do exoma tem sido amplamente utilizado para identificar alterações genômicas. Ocasionalmente, a identificação de CNAs por NGS é comparável em desempenho à identificação por aCGH⁹⁴. Desta forma, os dados de exoma estão sendo cada vez mais utilizados para a investigação de CNAs⁸⁷. A tecnologia oferece uma resolução a nível de nucleotídeo único e contagens absolutas do número de leituras podendo, portanto, fornecer resultados sensíveis e precisos, o que a torna fundamental para o desenvolvimento de terapias-alvo. Porém, a detecção por NGS pode ser uma tarefa desafiadora, devido à complexidade do processamento de dados⁹⁵. A complexidade dos tumores por si já torna a detecção de CNAs específicas para o câncer muito desafiadora. Embora muitas ferramentas de detecção de CNAs tenham sido desenvolvidas desde o

surgimento do NGS, ainda são poucas as ferramentas específicas para a detecção somática de alterações no número de cópias para dados de exoma no câncer.

À medida que o custo do NGS diminui, ele se torna cada vez mais útil em pesquisas oncológicas⁹⁶. Estudos sugerem que o NGS pode vir a ser uma alternativa aos *microarrays* para a detecção de CNAs no câncer. Os *microarrays* são superiores por oferecerem uma resolução mais precisa. No entanto, se o interesse for aplicação em rotina, o exoma pode ser preferível devido sua relação custo-benefício^{97; 98}. No entanto, há de se considerar que, mesmo para os maiores eventos detectados, há uma discrepância ao comparar os resultados entre as plataformas e entre diferentes estudos. Apesar da literatura indicar uma sobreposição entre as CNAs detectadas entre os dados de *microarray* e NGS, ainda é um desafio comparar os métodos⁹⁷.

1.2.3 Alterações no Número de Cópias de DNA no Carcinoma Renal de Células Claras

A patogênese do CCR de células claras encontra-se diretamente associada à alterações genéticas comuns em determinadas regiões cromossômicas^{99; 100} que têm sido fontes para novas aplicações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas potencialmente úteis^{101; 102}. Estudos avaliando alterações somáticas no número de cópias do DNA têm revelado muito sobre a arquitetura genômica do CCR^{103; 6}. Este conhecimento contribui para a compreensão da etiologia da doença, melhor classificação histológica e, principalmente, melhor estratificação dos pacientes e descoberta de alvos terapêuticos⁶. A Tabela 1 apresenta um resumo das principais alterações cromossômicas específicas de cada subtipo de carcinoma renal e seus principais alvos terapêuticos associados, incluindo o cCCR.

Tabela 1. Alterações cromossômicas somáticas recorrentes e alvos terapêuticos no CCR.

SUBTIPO	GENES/VIAS AFETADAS	ALTERAÇÃO CARACTERÍSTICA	TERAPIAS
cCCR	<i>VHL, PBRM1, SETD2, BAP1, PI3K-mTOR</i>	Perda do 3p Ganhos no 5q e 14q	Sunitinibe, Pazopanibe, Axitinibe (VEGFRs) Bevacizumabe (VEGFA) Everolimus e Temsisolimus (mTOR)
pRCC I	<i>MET</i>	Ganhos do 7, 16 e 17	Foretinibe
pRCC II	Via ARF-NRE	Perdas do 1, 2, 6, 10, 13 e 17	Cabozanitibe (cMET)
chRCC	<i>TP53, PTEN,</i> complexo 1 cadeia transportadora de elétrons		NA

cCCR: células claras; pRCC: papilar; chRCC: cromóforo; NA: não disponível. (Adaptado de Riazalhosseini e Lathrop, 2016^{7,8}).

A caracterização molecular do consórcio TCGA para o carcinoma renal de células claras revelou que tais tumores apresentam, em média, menos de 20 alterações no número de cópias de DNA por genoma, um número menor de alterações quando comparado aos cânceres de cólon e de mama, por exemplo (Figura 7)¹⁰³. No entanto, há uma grande representação de alterações no número de cópias envolvendo braços cromossômicos inteiros (Figura 7).

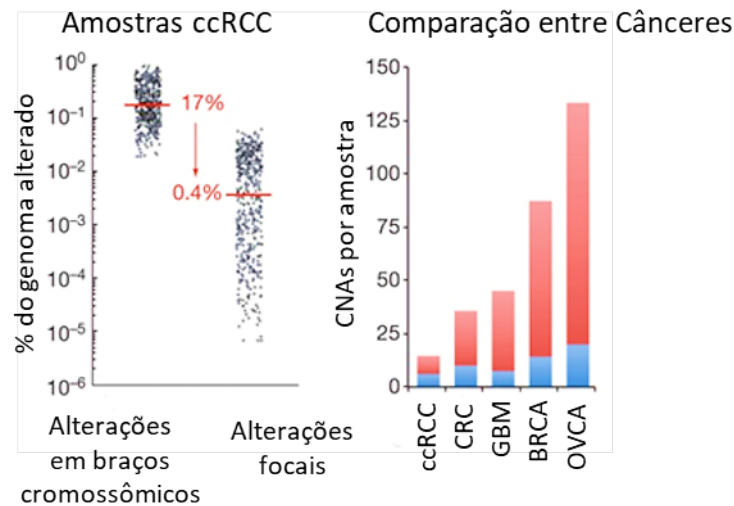


Figura 7. Descrição do perfil de alterações somáticas no número de cópias de DNA no cCCR, segundo dados do TCGA. Gráfico da esquerda: porcentagem do genoma alterado (eixo y) de acordo com o nível de CNA (eixo x): braço cromossômico *versus* alterações focais. Gráfico da direita: número de alterações no número de cópias por amostra (eixo y) de acordo com cada tipo de câncer. Em azul, ganhos. E em vermelho, perdas. Câncer de Cólon (CRC), Glioblastoma (GBM), Câncer de Mama (BRCA) e Câncer de Ovário (OVCA). (TCGA, 2013)¹⁰³.

Alterações recorrentes específicas dos tumores de células claras envolvem os cromossomos 3p (perda - 91%), 14q (perda - 45%) e 5q (ganho - 67%)¹⁰³. Algumas dessas alterações cromossômicas foram associadas a piores prognósticos, enquanto apenas o ganho de 5q foi associado a bom prognóstico^{104; 105; 102; 106}. Acredita-se que a perda do cromossomo 3p e o ganho dos cromossomos 5q e 7, talvez sejam alterações indispensáveis para o desenvolvimento do cCCR. E quando a perda dos cromossomos 1p, 4, 9, 13q ou 14q é adicionada, pode levar ao desenvolvimento de tumores mais agressivos¹⁰⁷. A região 3p21 tem sido demonstrada como importante no desenvolvimento de cCCR e encontra-se descrita a associação significativa entre a perda de segmentos do cromossomo 14q e a progressão do tumor e a perda do 9p como um fator de prognóstico independente. O ganho do 8q foi demonstrado como um candidato a marcador de prognóstico para diminuição da sobrevida global. Além disso, a sobrevida parece diminuir ainda mais em pacientes

com perda de 14q concomitante¹⁰⁸. Duplicações nos cromossomos 5q e 7 e a deleção dos braços cromossômicos 6q, 8p e 9p também são alterações reportadas como características dos tumores de células claras^{103; 6; 71}.

Além de inúmeras outras alterações cromossômicas descritas, foram identificados genes relevantes em regiões alteradas, tais como *PTEN* e *CDKN2A* (Figura 8). A identificação dos genes nessas regiões é de extrema importância visto que outros genes de câncer frequentemente mutados em tumores sólidos adultos, como *RAS*, *BRAF*, *TP53*, *RB*, *PIK3CA*, *EGFR* e *ERBB2*, parecem fazer apenas uma pequena contribuição para o cCCR^{109; 103}.

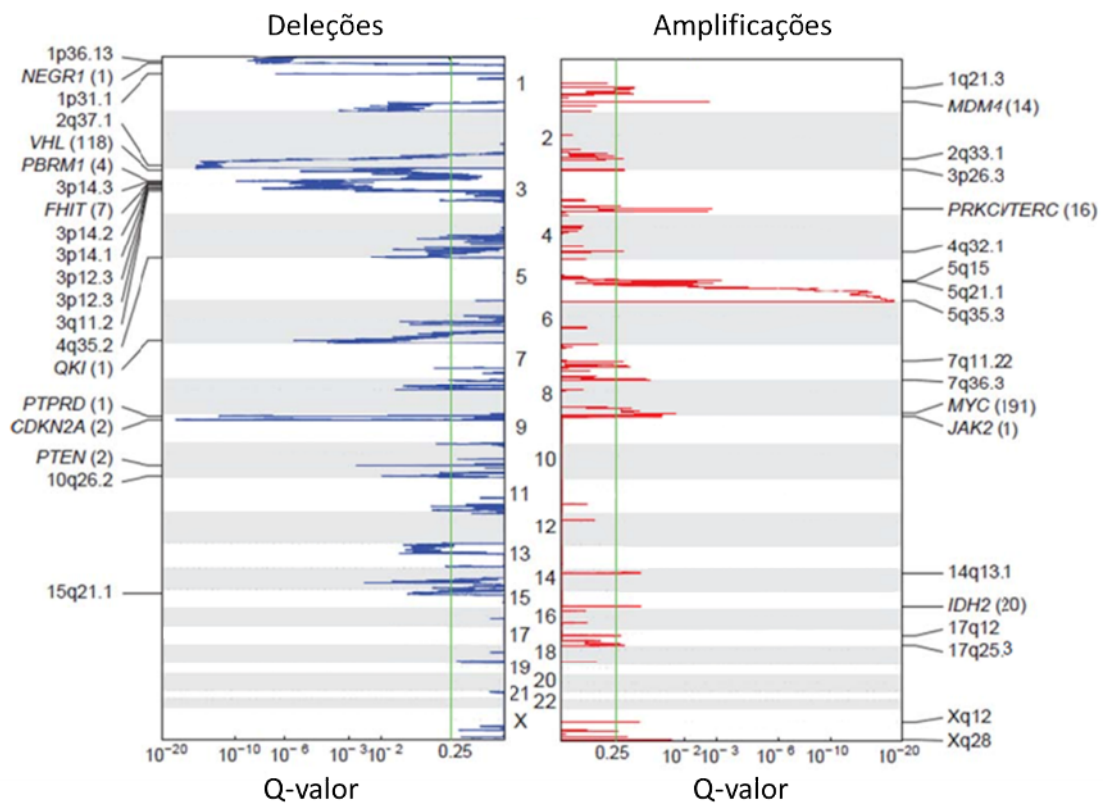


Figura 8. Ganhos e perdas genômicas a nível focal reportadas pelo TCGA. Perdas representadas em azul e ganhos em vermelho. Eixo y: genoma distribuído por cromossomos e genes mapeados nessa regiões; eixo x: significância das alterações de acordo com Q-valor (p-valor corrigido) (TCGA, 2013)¹⁰³.

A compreensão de cada alteração, incluindo a carga da CNA, é essencial para caracterizar o genoma do cCCR, elucidar a biologia do tumor e ajudar o cenário clínico no futuro. Apesar de múltiplos estudos sobre CNAs de CCR, atualmente não há descrição de alterações cromossômicas em uma coorte brasileira e dados sobre a epidemiologia e aspectos moleculares do cCCR no Brasil são escassos. Portanto, avaliar o perfil cromossômico de pacientes brasileiros com cCCR e suas associações clínicas, pode contribuir para a epidemiologia e para a descrição do perfil de alterações moleculares com impacto clínico e para a descoberta de alvos potencialmente válidos de investigações futuras.

2 HIPÓTESE

Alterações cromossômicas somáticas no carcinoma renal de células claras estão relacionadas com desfechos clínicos e podem levar à identificação de genes e regiões importantes para futuras abordagens de medicina personalizada do CCR de células claras.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar de grandes avanços, as taxas de incidência e mortalidade do carcinoma de células renais têm aumentado em muitos países ao longo dos anos. A razão para o aumento não é clara, mas aspectos genéticos já foram implicados, demonstrando a importância dos estudos genômicos. Em torno de 30% dos pacientes são metastáticos ao diagnóstico e o prognóstico geral ainda é ruim, onde, mesmo com o tratamento, a doença progride e é a causa de morte da maioria dos pacientes. Assim, são necessários novos e melhores tratamentos.

O carcinoma renal de células claras é o subtipo histológico responsável pelo maior número de casos e mortes de CCR. Sua patogênese é diretamente associada à alterações cromossômicas que têm sido fontes para novas aplicações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas. Curiosamente, genes de câncer frequentemente alterados em tumores sólidos adultos (*RAS*, *BRAF*, *TP53*, *RB*, *PIK3CA*, *EGFR* e *ERBB2*) parecem fazer apenas uma pequena contribuição para o cCCR. Dessa forma, a descrição de alterações moleculares com impacto clínico e de potenciais genes-alvo válidos de investigações futuras pode guiar futuras abordagens personalizadas. Apesar da alta frequência de alterações somáticas no número de cópias de DNA envolvendo genes de relevância para a carcinogênese do carcinoma renal de células claras, não existe atualmente a caracterização cromossômica de uma causuística brasileira com CCR de células claras.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar alterações somáticas no número de cópias de DNA (CNAs) em uma causuística brasileira de pacientes com carcinoma renal de células claras e associar com informações clinicopatológicas.

4.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar as alterações somáticas no número de cópias de DNA (CNAs) de pacientes com carcinoma renal de células claras em uma causuística brasileira por meio da análise do exoma e de *aCGH*;
2. Comparar os resultados das técnicas de exoma e *aCGH*;
3. Realizar uma anotação funcional in silico dos genes encontrados nas regiões de alteração em conjuntos de dados disponíveis publicamente;
4. Verificar o status germinativo do gene *VHL*;
5. Associar os dados moleculares com os dados clinicopatológicos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas principais da metodologia encontram-se resumidas na Figura 9.

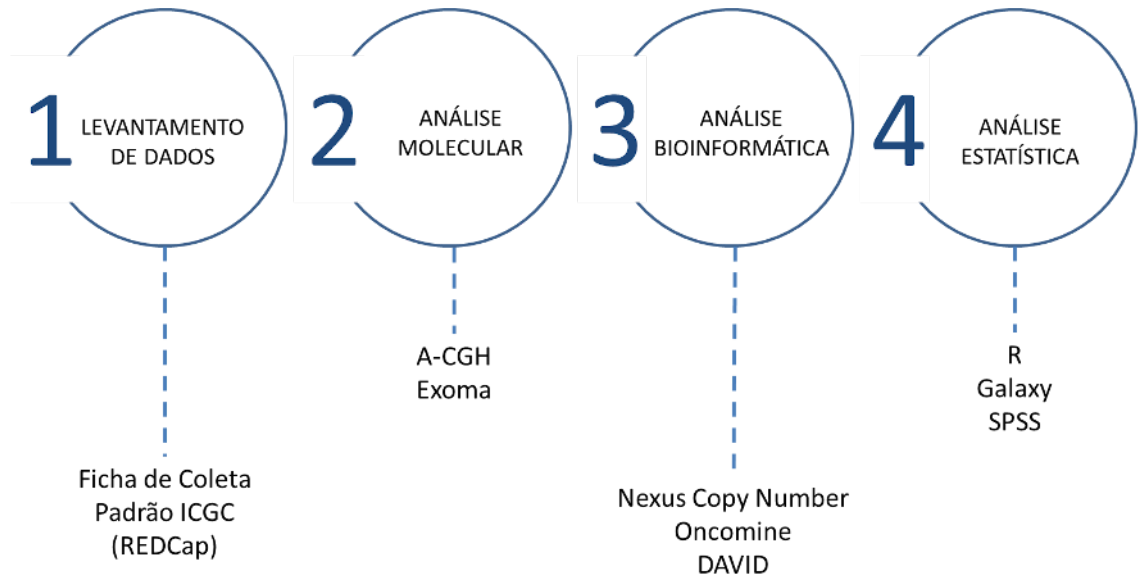


Figura 9. Fluxograma representativo das principais etapas da metodologia.

*ICGC: *International Cancer Genome Consortium*; REDCap: *Research Electronic Data Capture*; DAVID: *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*; SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

5.1 População de Estudo

Este é um estudo observacional retrospectivo, cujo número amostral para o estudo foi designado por conveniência. Tratando-se desta uma amostra de conveniência, foram incluídas 92 amostras com dados de aCGH e dessas, 78 possuíam também dados de exoma. As amostras foram filtradas por critérios de qualidade e material suficiente para os experimentos de exoma, resultando em um número total de 78 pacientes com ambos dados. As amostras são provenientes de uma coorte retrospectiva de pacientes com carcinoma renal de células claras com confirmação histológica, em estadiamentos inicial e avançado admitidos no Hospital de Câncer de Barretos entre 11/2008 e 05/2014. Todos os

pacientes incluídos no estudo foram submetidos à nefrectomia sem qualquer terapia pré-operatória e tiveram disponibilidade de material congelado do tumor, bem como amostra de sangue do paciente. Como critério de exclusão, encontraram-se amostras com material insuficiente para pesquisa, ou extração de DNA com qualidade insatisfatória.

5.2 Levantamento dos Dados Clínico-patológicos dos Pacientes

O período de *follow up* dos pacientes foi de aproximadamente 10 anos (112 meses; 10/2009 à 02/2019). Foram coletadas informações contidas nos prontuários dos participantes, como informações sociodemográficas (idade, gênero, etnia, histórico familiar, etc), dados clínicos (idade ao diagnóstico, estadiamento, tratamento, presença de metástase, recidiva ou progressão, dados de *follow-up*, etc), fatores de risco associados (obesidade, hipertensão, tabagismo e condições médicas como doença renal crônica, hemodiálise, transplante renal, doença cística renal adquirida, diagnóstico prévio de CCR e diabetes mellitus) e dados histopatológicos (confirmação histológica, tamanho do tumor, invasão tecidual adjacente, etc). Estes dados foram coletados baseados no modelo padrão de ficha de coleta internacional do *Internacional Cancer Genome Consortium* - ICGC, a qual se encontra em anexo (Anexo F), e foram depositados online no software para gestão de dados de pesquisa *RedCap Research Electronic Data Capture* (Vanderbilt University, Tennessee, EUA) (<https://hcbredcap.com.br>).

5.3 Análise Molecular

5.3.1 Extração de DNA

As amostras congeladas com porcentagem de células tumorais acima de 60% e abaixo de 20% de necrose observados por microdissecção e avaliados por patologista experiente foram consideradas para este estudo. A extração de DNA foi realizada de tecido tumoral de carcinoma renal utilizando-se a plataforma automatizada QIASymphony com o Kit QIASymphony DNA mini Kit seguindo as instruções do fabricante. Somente amostras com excelente padrão de qualidade verificadas por Nanodrop e quantificados por Qubit® *Fluorometric Quantitation* (Life Technologies) foram utilizadas no sequenciamento de nova geração.

5.3.2 Experimentos de *Array-Comparative Genetic Hybridization* (aCGH)

A técnica de aCGH foi executada de acordo com o protocolo padrão da plataforma de microarranjo Agilent SurePrint G3 CGH+SNP 4x180K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) utilizando um DNA de referência diplóide (Agilent Technologies) como controle. A técnica é constituída por lâminas com quatro áreas de hibridização de aproximadamente 180.000 oligonucleotídeos cada. O DNA de referência foi incubado com Cianina-3 (Cy3), enquanto o DNA teste (amostra tumoral) foi incubado com Cianina-5 (Cy-5). Os DNAs marcados foram purificados e a qualidade da marcação foi avaliada através do NanoDrop (Thermo Scientific). A partir disso, quantidades iguais de DNA teste e referência de cada paciente foram combinadas e preparadas para hibridação nas lâminas, durante 24 horas. Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampões de lavagem, estabilização, além de acetonitrila. As lâminas foram escaneadas (*SureScan Microarray*

Scanner, Agilent Technologies) seguindo as recomendações do fabricante.

5.3.3 Controle de Qualidade *Array-Comparative Genetic Hybridization* (aCGH)

Uma das principais medidas quantitativas padrões empregadas para avaliar a qualidade dos experimentos de aCGH é o DLRS (*Derivative of the Log Ratio Spread*). Para todos os 92 pacientes analisados para CNAS através da técnica de aCGH, a média do DLRS (variância experimental e técnica do ensaio) foi de 0.20 (Figura 10). Valores acima de 0.30 tiveram os experimentos repetidos ou foram excluídos da análise.

De uma forma geral, essa medida consiste em um detector sensível da variação entre sondas adjacentes, uma medida de desvio padrão das diferenças entre duas sondas presentes nas junções onde começa e termina uma amplificação ou deleção. Ela descreve o valor absoluto da variância da razão de \log_2 de cada sonda em relação à próxima, para o genoma inteiro. O valor apenas deve variar significativamente se houver uma mudança abrupta no número de cópias no intervalo entre os segmentos. Como normalmente existem menos que algumas centenas de segmentos onde uma mudança abrupta no número de cópias ocorre e centenas de milhares de probes consecutivas ao longo do genoma, pode-se, portanto, obter uma excelente estimativa da variância experimental e técnica do ensaio através da média do valor absoluto da diferença sonda-a-sonda.

Frequentemente correlaciona-se com abundância ou ausência de segmentos identificados em dados de número de cópias de DNA. Amostras com valores muito altos de DLRS apresentam a capacidade de detecção precisa limitada, levando, muitas vezes, à exclusão desses casos da análise. Valores <0.20 são classificados como excelentes. Valores entre 0.20 e 0.30 como bons e valores >0.30 precisam ser investigados.

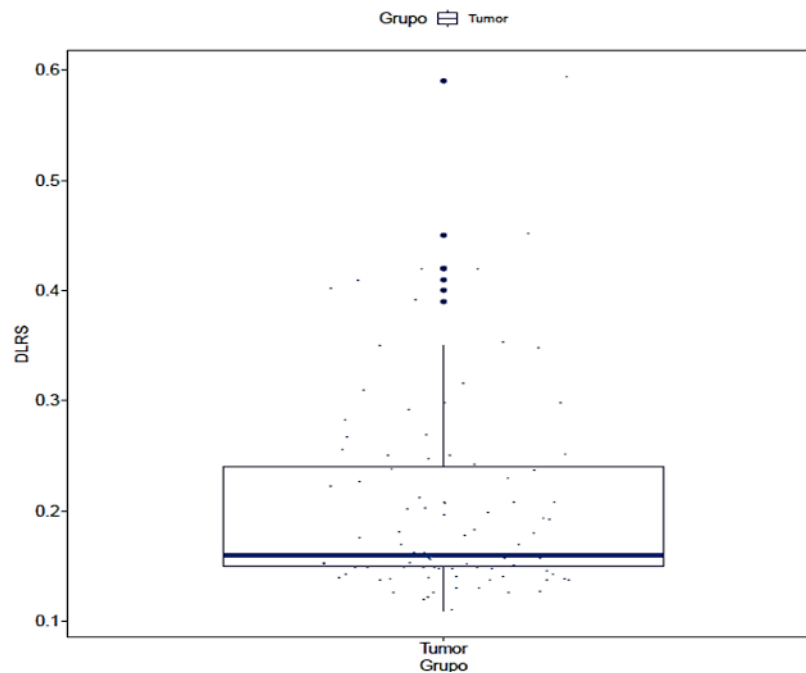


Figura 10. Gráfico Box-plot representativo da qualidade dos experimentos de aCGH no tecido tumoral

5.3.4 Sequenciamento do Exoma

O sequenciamento de nova geração do exoma foi realizado utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2500TM System, pela empresa de biotecnologia Mendelics (São Paulo). Foram sequenciadas amostras de tecido tumoral, assim como do sangue do mesmo paciente para identificação de alterações somáticas no número de cópias de DNA. Para esta reação, foi utilizado o *Nextera Rapid Capture Expanded Exome* (Illumina), o qual permite realizar o sequenciamento de todos os exons, regiões 5' e 3' UTR e sítios de ligação a microRNAs.

O sequenciamento do exoma foi feito para 78 amostras. As regiões sequenciadas englobaram toda a região codificadora do genoma. A cobertura média do exoma para cada amostra tumoral foi de 74,2x (com mínimo de 41,5x e máximo de 154,0x). Para as

amostras normais, a média foi 69,5x (variando entre 27,8x a 117,5x) (Figura 11).

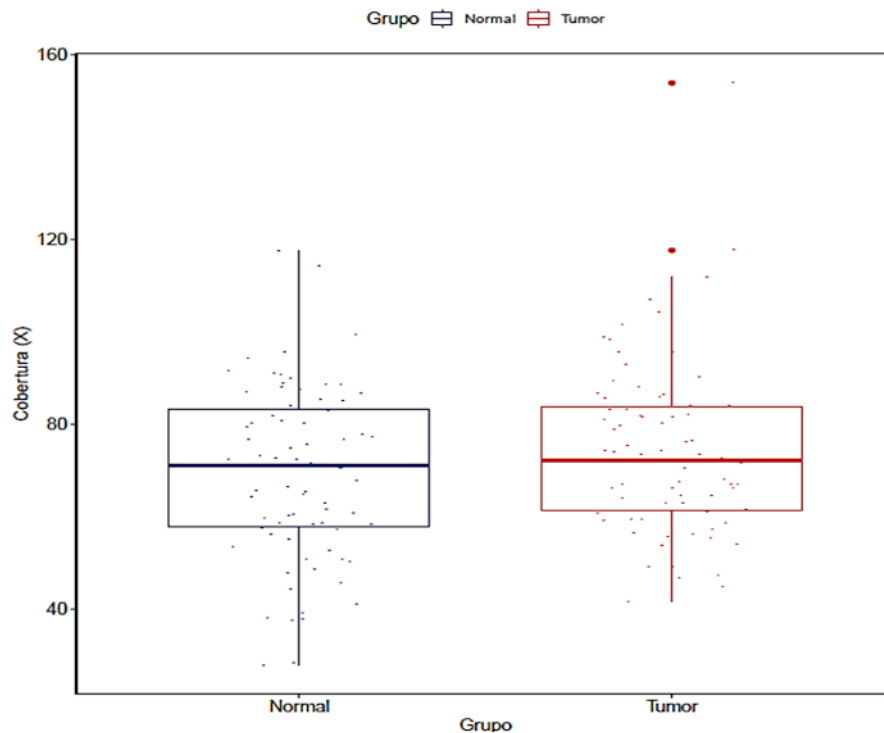


Figura 11. Gráfico Box-plot representativo da cobertura nos experimentos de Exoma; tecido tumoral e normal.

O protocolo envolve a etapa de fragmentação do DNA genômico e ligação dos adaptadores e índices às extremidades dos fragmentos gerados. Após a hibridização, são utilizadas *beads* de estreptavidina, a fim de capturar as sondas contendo as regiões de interesse ligadas. Posteriormente, foram realizados diversos passos de lavagens para a remoção das ligações inespecíficas, seguido da eluição das bibliotecas. Essas bibliotecas foram submetidas a uma segunda hibridização para aumentar o enriquecimento, seguido de ciclos de lavagens e eluição. As bibliotecas quantificadas foram submetidas à etapa de clusterização, sendo que cada fragmento de DNA da biblioteca incorporado à superfície da *flowcell*, coberta com oligonucleotídeos, utilizados para amplificar o DNA de forma iso-

térmica, dando origem aos *clusters*. A linearização retira os dois adaptadores e assegura que a hibridação e o sequenciamento ocorram somente em uma das fitas de cada *cluster*. A terceira etapa de clusterização é caracterizada pelo bloqueio das hidroxilas presentes nas extremidades 3' dos *clusters* linearizados, a fim de evitar a adição de substratos de fluoróforos a qualquer outro segmento que não seja o *primer* de sequenciamento. A desnaturação permite a formação de templates de fita simples, que foram hibridizados aos *primers* de sequenciamento. A tecnologia de sequenciamento baseia-se na terminação da síntese da cadeia de DNA após a detecção do sinal fluorescente. Por terminação entende-se a clivagem do nucleotídeo marcado já detectado que possibilita a adição do próximo nucleotídeo. Os eventos de incorporação e clivagem do nucleotídeo marcado e modificado ocorrem sucessivas vezes dentro da *flowcell*, permitindo a leitura base a base e, ao mesmo tempo elimina possíveis erros em sequências com repetições da mesma base.

5.4 Análise Bioinformática

As etapas principais da análise bioinformática dos dados encontram-se representadas na Figura 12.

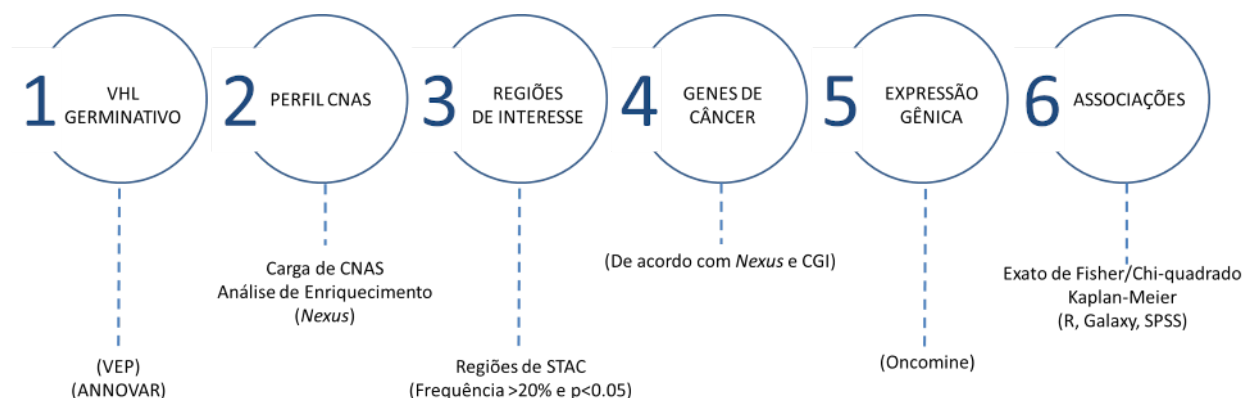


Figura 12. Fluxograma representativo das principais etapas da análise bioinformática.

5.4.1 Análise Germinativa do Gene *VHL*

Para a análise germinativa do gene *VHL* foi utilizada a ferramenta VEP (*Variant Effect Predictor*) (<https://www.ensembl.org>) para classificar, informar a localização e consequência das variantes. A anotação adicional das variantes foi realizada através do software ANNOVAR (<http://www.openbioinformatics.org/annovar>), incluindo banco de dados doença-específico ClinVar e os bancos de dados populacionais gnomAD e AbraOM para avaliação de frequência. Foram consideradas variantes raras aquelas cuja frequência foram menor do que 1% na população. Outras ferramentas de anotação também foram utilizadas para a predição do possível impacto e consequência das variantes (*SIFT*, *PolyPhen-2*, *LTR*, *Mutation Taster*, *Mutation Assessor*, *FATHMM*, *PROVEAN*, *VEST3*, *Meta SVM*, *Meta LR*, *M-CAP*, *CADD*, *DANN*, *FATHMM-MKL*, *Eigen coding or noncoding*, *Eigen-raw*, *Eigen-PC-raw*, *GenoCanyon*, *integrated fitCons*, *GERP++*, *phyloP100way*, *phastCons100way*, *SiPhy 29way* e *REVEL*).

5.4.2 Análise do Número de Cópias de DNA

A análise bioinformática das alterações no número de cópias de DNA foi feita através do software Nexus Copy Number Versão 10.0 (BioDiscovery, Inc., El Segundo, CA) (<http://www.biodiscovery.com/nexus-copy-number/>). As amostras foram processadas e corrigidas automaticamente através das definições padrões da Agilent. A opção de ajuste para mosaicismos foi usada para regular os limites utilizados para classificar as chamadas. As razões de Log2 entre a amostra e a referência normal foram calculadas. Os limites para ganho de cópia única e perda de cópia única foram estabelecidos em +0.18 e -0.18, respectivamente. Os limites da razão logarítmica para ganho de 2 ou mais có-

pias e para uma perda homozigótica foram estabelecidos em +0.7 e -1.1, respectivamente (Figura 13). As CNAs foram chamadas usando o algoritmo SNP-FASST2, baseado no Modelo Oculto de Markov. A sensibilidade do algoritmo foi ajustada para uma sensibilidade média. Os cromossomos sexuais foram normalizados pelo método Lowess com base no sexo de cada amostra. O algoritmo STAC foi utilizado para determinar as CNAs significativamente frequentes.

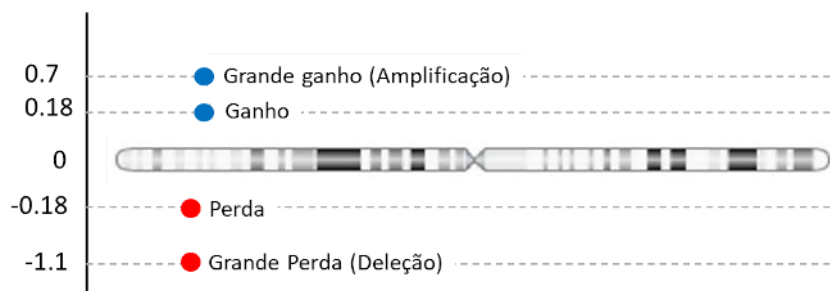


Figura 13. Corte Logarítmico estabelecido para a classificação de ganhos e perdas nos dados de CGH. O eixo Y representa os valores da razão de Log2. O eixo X é a representação de um cromossomo. Em azul, ganhos e em vermelho, perdas.

A análise de CNAs a partir dos dados do exoma de forma pareada foi baseada no algoritmo *ngCGH Matched* (<https://github.com/seandavi/ngCGH>), o algoritmo do *Nexus Copy Number* que permite o processamento de amostras pareadas. O método utilizado foi baseado no algoritmo *ngCGH* original que estima CNAs do tumor em relação ao tecido normal. A abordagem foi *matched paired*, onde calculou-se um pseudo-CGH através da cobertura (contagem de leituras/*reads*) de cada amostra. Os valores foram submetidos à correção sistemática e às etapas seguintes de segmentação e chamada. As razões de log2 foram estabelecidas em +0.2 e -0.3, para ganhos e perdas únicas e, +0.6 e -1.0, para grandes ganhos e grandes perdas.

5.4.3 Carga de Alterações no Número de Cópias do DNA

Os pacientes foram classificados em subgrupos de acordo com o número de CNAs. A classificação foi baseada em quartis, considerando a distribuição do número de eventos obtidos a partir dos dados de aCGH. Os grupos correspondentes aos valores de carga de CNAs foram submetidos a análises estatísticas de associação com as características clinico-patológicas.

5.4.4 Identificação de Regiões Cromossômicas e Genes de Interesse

As regiões de interesse foram classificadas como mais prováveis para a identificação de genes de câncer (oncogenes e genes supressores tumorais, alvos das mudanças no número de cópias de DNA). Para isso, foi utilizado o Teste de Significância para Alterações no Número de Cópias (STAC, *Significance Testing for Aberrant Copy Number*) (<http://cbil.upenn.edu/STAC>). O algoritmo identificou regiões de alteração que preenchiam os critérios de significância ($p \leq 0.05$) e de porcentagem de agregação ($>20\%$).

Tais regiões foram investigadas para alterações oncogênicas por meio da plataforma CGI (*Cancer Genome Interpreter*) (<http://www.cancergenomeinterpreter.org>). O CGI consiste em um compilado de múltiplos bancos de dados de classificação e predição, como o *Catalog of Cancer Genes* (genes validados ou preditos como oncogênicos); *Catalog of Validated Oncogenic Mutations* (mutações validadas como oncogênicas em genes *drivers*) e *OncodriveMUT* (estimação do efeito oncogênico das variantes de significado incerto). O CGI foi desenvolvido para dar suporte à identificação de alterações tumorais que conferem vantagens às células tumorais para o desenvolvimento do câncer (*drivers*) e detectar aquelas em potencial para alvos terapêuticos. Como consequência, ele também

classifica as alterações que não contribuem diretamente para o fenótipo de câncer (*passengers*). Este baseia-se no conhecimento existente coletado de vários estudos e em métodos computacionais que anotam as alterações de um tumor de acordo com níveis distintos de evidência. As alterações identificadas são classificadas em três categorias: sabidamente oncogênicas, preditas como *drivers* ou preditas como passageiras (do inglês *known oncogenic*, *predict driver* e *predicted passenger*). São identificadas pelo CGI como *drivers* aquelas alterações validadas clínica ou experimentalmente que direcionam a identificação dos fenótipos. São consideradas como oncogênicas mutações nos genes de câncer que impulsionam o crescimento do tumor ou predisõem ao câncer, e mutações que aumentam a sensibilidade às terapias-alvo. Enquanto que o efeito das alterações de significância incerta é previsto usando abordagens in silico (métodos computacionais de predição).

5.4.5 Integração com Perfil Transcriptômico por meio da ferramenta OncoPrint

Os genes presentes nas regiões de interesse foram avaliados, principalmente, quanto ao perfil de expressão nos bancos de dados de experimentos feitos com CCR de células claras disponíveis na plataforma OncoPrint™ (Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI) (<https://www.oncoprint.org/>). Os genes de interesse foram investigados quanto a ganhos e perdas nos níveis de expressão gênica no conjunto de dados do TCGA, totalizando 579 amostras de CCR contendo dados clínicos, dados de número de cópias do DNA e expressão gênica. A avaliação das alterações na expressão utilizou como estratégia a comparação tumor *versus* normal.

5.4.6 Anotação Funcional dos Genes Identificados

A anotação funcional foi aplicada para todos os 1.248 genes encontrados nas regiões significativas e foi feita através do banco de dados DAVID v6.8 (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*), considerando $p \leq 0.05$, corrigido pelo método de Benjamini Hochberg. Apenas as top 10 associações foram selecionadas. Os genes foram analisados separadamente de acordo com o tipo de alteração associada (ganho ou perda). O conjunto de ferramentas de anotação forneceu, principalmente, os termos do *Gene Ontology* (GO) mais relevantes associados aos genes, incluindo processos biológicos, função molecular e componente celular; e análise de vias (Biocarta e KeggPathway).

5.5 Análise Estatística

O pacote R utilizado para análise estatística foi implementado localmente na plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) e foi utilizado para as análises de associações. As associações entre frequências das alterações moleculares e características clínicas, histológicas e patológicas foram realizadas usando o Teste Chi-quadrado ou Exato de Fisher Uni e Bicaudal, ambos com significância estabelecida em $p \leq 0,05$. A análise multivariada pelo método de Regressão Logística Binária foi realizada pelo modelo Backward utilizando variáveis com significância igual ou abaixo de 0.2 na univariada. A sobrevida global foi definida como o tempo entre a nefrectomia até o último contato ou morte. A sobrevida foi avaliada usando o método Kaplan-Meier e comparações log-rank na análise univariada. O valor de significância adotado em todos os testes foi de $p \leq 0.05$.

5.6 Considerações Éticas

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Câncer de Barretos (n# 8042014), e obedeceu aos critérios éticos em conformidade com a resolução CNS 466/12.

Este estudo apresenta riscos mínimos por utilizar coleta retrospectiva de material biológico e dados de prontuários, sendo o principal risco para os participantes a quebra accidental de sigilo o que os pesquisadores vão procurar minimizar utilizando cuidadosamente medidas de segurança quanto à confidencialidade, privacidade e armazenamento de dados.

Outro risco potencial é a utilização total do material parafinado existente. Para isso, será sempre salvaguardada a existência de material tumoral no bloco de parafina para possível confirmação anatomopatológica, e serão seguidas as normas e protocolos pré-estabelecidas pelo procedimento operacional padrão do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos.

6 RESULTADOS

6.1 Dados Clínicopatológicos dos Pacientes com Carcinoma Renal de Células Claras

A causuística de 92 pacientes foi composta por 50 homens e 42 mulheres, vivos em sua maioria (75%), com uma idade média de 58 anos (variando entre 20 e 81 anos). Os pacientes foram diagnosticados, em sua maioria, em estádios e graus iniciais da doença (65,2% e 75%, respectivamente) com a presença de metástase ao diagnóstico em 18,5% dos casos. Os principais fatores de risco encontrados incluíram hipertensão e tabagismo, seguido da obesidade e diabetes (com hipertensão concomitante ou não) (Tabela 2) (Anexo A).

Tabela 2. Principais características epidemiológicas e clinicopatológicas dos 92 pacientes brasileiros com ccRCC.

Características	Categoria	Pacientes (n=92)	%
Gênero	Homem	50	54,3%
	Mulher	42	45,7%
Status Follow-up	Vivo	69	75,0%
	Falecido	23	25,0%
Idade	Média (min-max)	58 (20-81)	
Estadiamento	I/II	60	65,2%
	III/IV	32	34,8%
	T1a-b	47	51,1%
	T2a-b	23	25,0%
	T3a-c	17	18,5%
	T4	5	5,4%
	N0	77	83,7%
	N1	9	9,8%
Grau de Fuhrman	Nx	6	6,5%
	M0	75	81,5%
	M1	17	18,5%
	1	20	21,7%
Tamanho do tumor	2	49	53,3%
	3	16	17,4%
	4	7	7,6%
	≤ 7 cm	58 (1.5 - 7.0cm)	63,0%
> 7cm	34 (7.5 - 19.5cm)	37,0%	
Etnia Auto-Declarada	Branco	64	69,6%
	Negro	3	3,3%
	Amarelo	1	1,0%
	Pardo	20	21,7%
	Desconhecido	4	4,4%
Terapia Sistêmica	Sunitinib	12	13,1%
	Interferon	4	4,3%
	Pazopanib	1	1,1%
	Outros	1	1,1%
	Não	74	80,4%
Status Doença no último follow-up	Vivo sem doença	64	69,6%
	Vivo com progressão	2	2,1%
	Progreção e óbito pela doença	18	19,6%
	Óbito sem recorrência	8	8,7%

(*) Follow-up: acompanhamento; min: mínimo; max: máximo; cm: centímetros

A taxa de sobrevida global em 5 anos para os pacientes com câncer de rim foi de 77,3%, com tempo médio de sobrevida estimado em 53,5 meses (Figura 14).

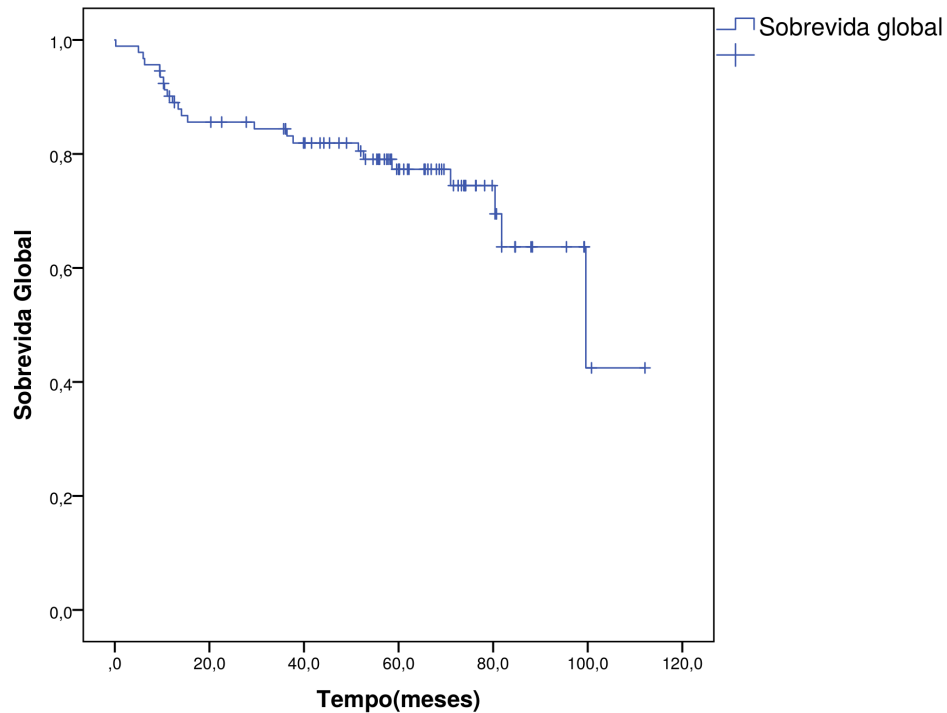


Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global dos 92 pacientes com ccRCC.

A sobrevida global foi significativamente menor para pacientes em estadiamento (A; $p=0,01$) e grau histológico (B; $p=0,000$) avançados, metástase ao diagnóstico (C; $p=0,002$) e tumores maiores que 7 centímetros (D; $p=0,003$) (Figura 15). Não houve associação significativa da sobrevida global com sexo, etnia, alcoolismo, tabagismo, diabetes, hipertensão ou obesidade.

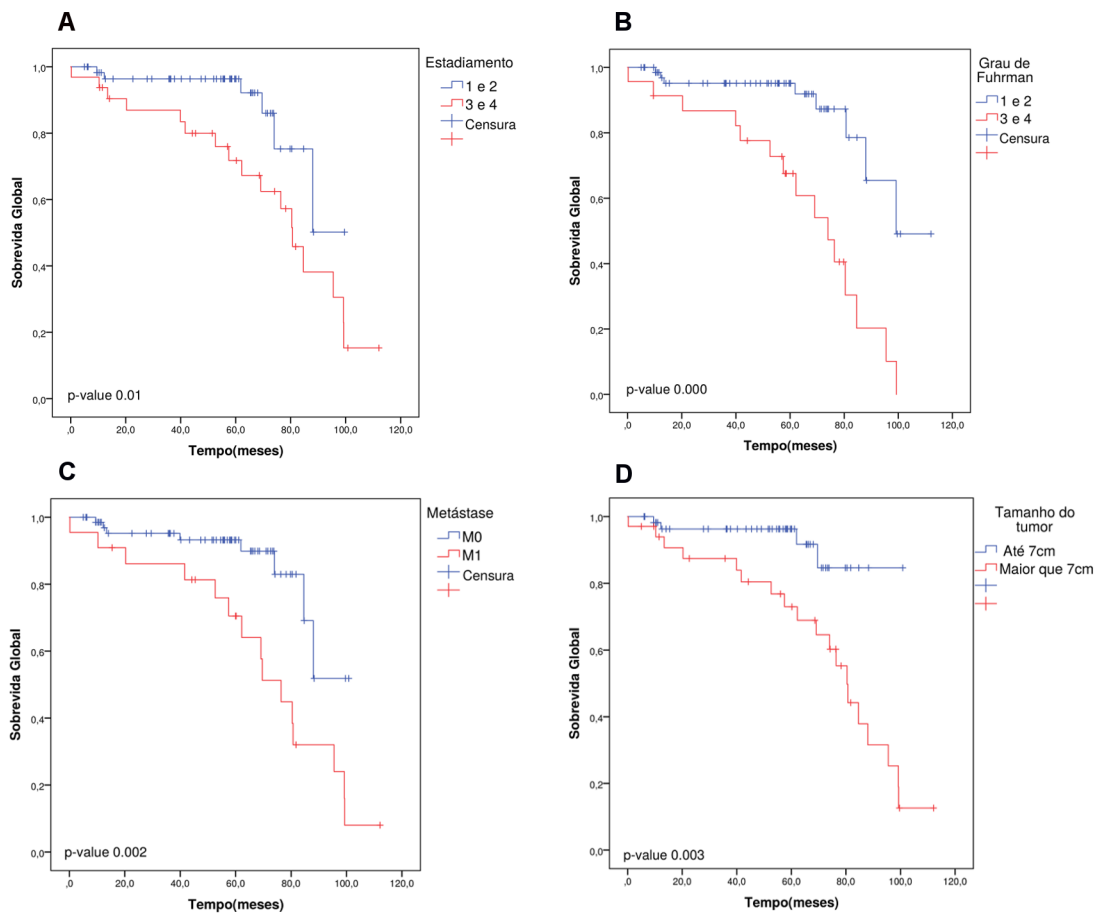


Figura 15. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevivência global de acordo com (A) estadiamento clínico, (B) grau histológico, (C) metástase e (D) tamanho do tumor. O tempo foi calculado em meses e a significância (p-valor) pelo teste de Log-rank.

6.2 Dados Genômicos dos Pacientes com Carcinoma Renal de Células Claras

6.2.1 Análise Germinativa do Gene *VHL*

A análise germinativa do gene *VHL* foi feita em 78 pacientes que possuíam dados de exoma. O gene *VHL* apresentou-se alterado em 33 pacientes, com um total de 89 variantes. Destas, 10 eram únicas. A anotação dessas 10 variantes foi realizada através do ANNOVAR (Tabela 3) que classificou as variantes como sendo 6 intrônicas, 1 variante exônica, 2 em região 3'-UTR e 1 em região 5'-UTR. Apenas 2 variantes já foram descritas no Clinvar, ambas como beningas. Seis variantes encontraram-se registradas do dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Entre as 10 variantes, 5 não possuem dados de frequência populacional e 2 foram consideradas raras (frequência < 1% nos bancos de dados populacionais). Apenas 2 variantes já foram descritas no Clinvar, ambas como benignas. A ferramenta de anotação *in silico* *Combined Annotation Dependent Depletion* (CADD) permitiu a anotação de 9 variantes e não indicou patogenicidade em nenhuma delas. Enquanto que a ferramenta de anotação de *splicing Human Splicing Finder* permitiu a identificação de 5 variantes e revelou fracos indícios de alteração patogênica de *splicing* em 3 variantes (Tabela 3).

Apesar de não terem sido encontradas mutações germinativas potencialmente patogênicas no gene *VHL*, a maioria dos casos apresentou alterações somáticas (deleções) por ambas as técnicas, aCGH e Exoma, com frequências relativamente similares à reportada pelo TCGA (78%, 54% e 72%, respectivamente).

Tabela 3. Anotação das variantes germinativas do gene *VHL* (ANNOVAR).

Posição	Região	HGVS	1000 Genomas	ExAC	gnomAD	dbSNP	ID COSMIC	Descrição COSMIC	Mutation Taster	Human Splicing Finder
chr3:10189929T>C	Intrônica		0.88	.	.	rs1681660	.	.	Polimorfismo	Sem impacto
chr3:10195298T>G	UTR3	NM_000551:c.*3649T>G	Invalído	Invalído
chr3:10195303T>G	UTR3	NM_000551:c.*3654T>G	Invalído	Invalído
chr3:10188363A>G	Intrônica		0.0048	0.0119	0.0121	rs34661876	.	.	Polimorfismo	Sem impacto
chr3:10189788A>-	Intrônica		.	.	.	rs142265244	.	.	Polimorfismo	Sem impacto
chr3:10183455C>T	UTR5	NM_000551:c.-77C>T	Polimorfismo	Sem impacto
chr3:10191372A>G	Intrônica	
chr3:10188161G>A	Intrônica		0.025	0.0062	0.0052	rs115744107
chr3:10183714C>G	Exônica		0.0004	0.0025	.	rs63650860	COSM25363	1(Rim)	.	.
chr3:10186216T>A	Intrônica		0.21	.	.	rs34232505

6.2.2 Descrição do Perfil de Alterações Somáticas no Número de Cópias de DNA

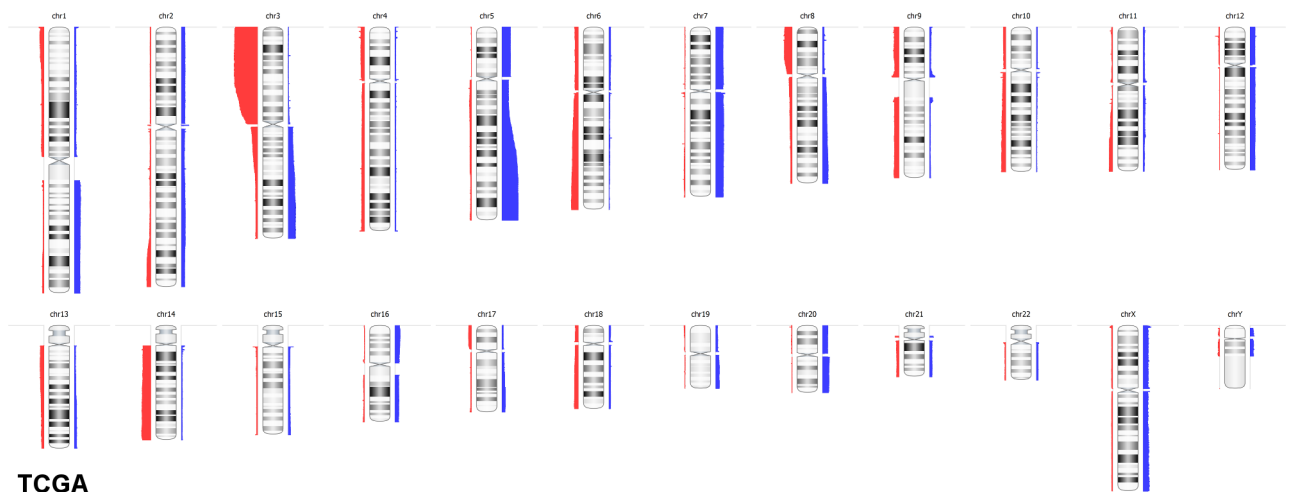
As alterações somáticas no número de cópias de DNA (CNAs) foram avaliadas em um conjunto de 92 amostras de cCCR. A partir dos dados de aCGH foram identificadas o total de 10.525 CNAs, com uma mediana de 67,5 alterações por paciente. Enquanto que, a partir dos dados de exoma, foram identificadas 4.448 CNAs e uma mediana de 17 por paciente. Verificou-se que em média de 10 a 12% do genoma de cada paciente apresentou-se alterado para CNAs. O número total de alterações e o valor mediano por amostra são especificados na Tabela 4, bem como a comparação dos mesmos valores com dados do TCGA.

Tabela 4. Resumo dos eventos de CNAs divididos por número total e mediana por paciente. As colunas representam o número de CNAs de acordo com a técnica (a-CGH e Exoma) em comparação aos dados do TCGA.

Alterações	Total			Mediana por paciente		
	CGH	Exoma	TCGA	CGH	Exoma	TCGA
Total de CNAs	10.525	4.448	44.502	67,5 (31-565)	17 (0-636)	77,5 (0-762)
Ganho de 1 cópia	5.371	1.774	27.444	27,0 (4-296)	7,5 (0-431)	36 (0-403)
Ganho de 2 cópias ou mais	625	576	507	5,0 (1-139)	4,0 (0-148)	0 (0-251)
Perda de 1 cópia	4.348	1.707	16.402	28,5 (9-272)	15 (0-113)	27 (0-403)
Perda de 2 cópias ou mais	181	391	149	1,0 (0-10)	1,0 (0-108)	0 (0-30)
% LOH	1.133	-	506	7,5 (1-158)	7,5 (1-158)	0 (0-24)
% Genoma Alterado	-	-	-	11,8%	10,0%	12,3%

(*) LOH: Perda de Heterozigossidade

A figura 16 consiste em uma representação visual da frequência de todas as alterações ao longo do genoma de todos os pacientes de acordo com cada técnica empregada neste trabalho (aCGH e exoma) e de acordo com os dados do TCGA. As análises posteriores tiveram um foco maior nos dados de aCGH devido ao maior número de amostras e regiões identificadas. Sendo assim, a figura 17 representa graficamente as regiões mais frequentes identificadas pelo teste de frequência significativa (STAC) nos dados de aCGH. As alterações mais significativas incluem a perda dos cromossomos 3p (87,3%), 14q (35,8%), 6q (29,3%), 9p (28,6%) e 10q (25%), e ganho dos cromossomos 5q (59,7%), 7p (29,3%) e 16q (20,6%) (Figura 17).



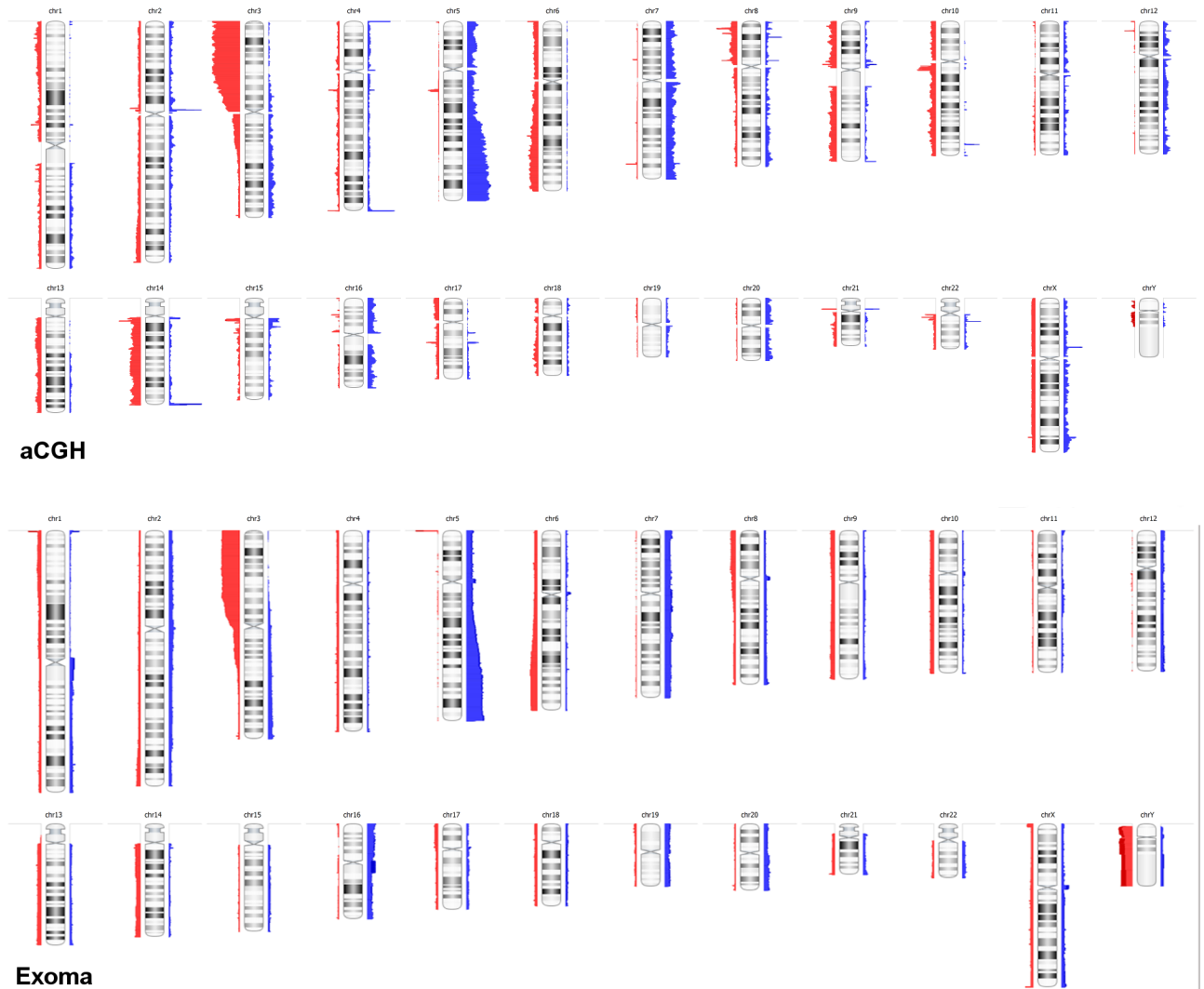


Figura 16. Representação das CNAs ao longo de todo o genoma, por cromossomo. Regiões de ganhos em azul e regiões de perda em vermelho. (Dados do TCGA, aCGH e exoma, respectivamente)

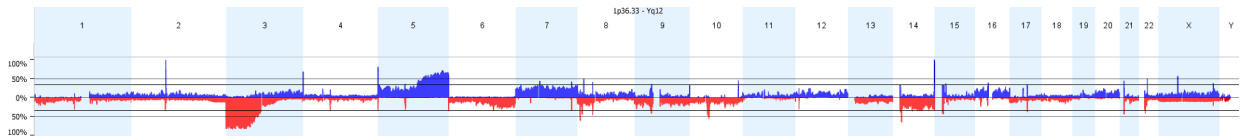


Figura 17. Frequência das alterações significativas nos tumores de cCCR identificadas pela ferramenta STAC nos dados de aCGH. A parte superior da imagem indica os cromossomos. A lateral esquerda representa a frequência das alterações. Ganhos são indicados em azul e perdas em vermelho.

6.2.3 Carga de Alterações no Número de Cópias do DNA e Associações Clínico-patológicas

A análise univariada foi realizada com o objetivo de investigar as associações entre a carga de CNAs (número total de eventos) e características clínicas (Tabela 5) (a versão completa encontra-se no Anexo A). Para essa análise, o genoma dos pacientes foi dividido em quartis afim de estabelecer um valor de corte para as associações seguintes. O valor de corte de aproximadamente 50 eventos (1º quartil), foi capaz de estabelecer perfis diferentes da doença em comparação às outras divisões. Pacientes com menos de 50 eventos ao todo (ganhos e perdas) foram significativamente associados a tumores menores, além de estadio ($p=0,0003$) e grau histológico ($p=0,0008$) iniciais. Por outro lado, pacientes com mais de 50 CNAs por genoma ($n=16$) foram associados com o Grau de Fuhrman 3 ($p=0,006$) (Tabela 5) (Anexo A).

Tabela 5. Análise Univariada de características significativamente enriquecidas de acordo com a carga de CNAs e o tipo de evento.

Variáveis	Parâmetros	Quartis				p-valor
		Q1 (n%)	Q2 (n%)	Q3 (n%)	Q4 (n%)	
Tamanho	< 7cm	91.3%	56.5%	54.2%	50%	0.01
	>7cm	8.7%	43.5%	45.8%	50%	
Fuhrman	I e II	95.7%	82.6%	66.7%	54.5%	0.008
	III e IV	4.3%	17.4%	33.3%	45.5%	
Metástase ao diagnóstico	M0	100%	73.9%	83.3%	68.2%	0.01
	M1	0%	26.1%	16.7%	31.8%	
Desfecho	Vivo	91.3%	69.6%	70.8%	68.2%	0.05
	Óbito	8.7%	30.4%	29.2%	31.8%	

(*) Q1: primeiro quartil; Q2: segundo quartil; Q3: terceiro quartil; Q4: quarto quartil; cm: centímetros; M1:metástase; M0: sem metástase;

A análise multivariada de regressão logística binária (método *Backward*) foi realizada a fim de estimar a probabilidade associada à ocorrência dos eventos clínicos em face à quantidade de CNAs (Tabela 6). De acordo com os resultados, pacientes com mais de 50 eventos no total possuem um risco aumentado para tumores acima de 7 centímetros ($p=0.002$; IC95% 2,1-28,5) e com grau histológico avançado ($p=0.01$; IC95% 1.80-111.13), além de possuírem um risco aproximadamente 4 vezes maior de vir a óbito ($p=0.04$; IC95% 1.02-14.02) quando comparados aos pacientes com menos de 50 eventos (Tabela 6).

Tabela 6. Regressão Logística Binária para as variáveis clínicas significativas na univariada, de acordo com o valor de corte de 50 CNAs.

Variável	>50 eventos	Regressão Logística Binária (Método <i>Backward</i>)			
		B	p-valor	RR	IC95%
Tumores >7cm	Total	2.05	0.002	7.8	2.14 - 28.55
Evento (óbito)	Total	1.33	0.046	3.7	1.02 - 14.02
Fuhrman 3 e 4	Total	2.64	0.012	14.1	1.80 - 111.13

(*) cm: centímetros; M1:metástase; N1: linfonodo comprometido; B: Coeficiente de Regressão; RR: Razão de Risco; IC: Intervalo de Confiança.

6.2.4 Regiões Cromossômicas de Interesse

Com base nos resultados do teste de frequência significativa (STAC), foram identificadas 158 regiões significativas presentes em pelo menos 20% dos pacientes (Tabelas 7 e 8). No total, 1.248 genes foram identificados nestas regiões. No entanto, foram consideradas para análise de associações apenas regiões que continham genes de câncer, referidas aqui como regiões de interesse. A tabela 7 lista todas as regiões de interesse identificadas nos dados de aCGH, exoma e TCGA sob às mesmas condições de análise (20, 2 e 16 regiões, respectivamente) e a Tabela 8 apresenta uma descrição apenas das regiões de interesse identificadas nos dados de aCGH que foram consideradas para as análises posteriores. Para fins de associações clínicas, regiões próximas e de mesma frequência foram agrupadas em uma só, conforme descrito na Tabela 8 (12 regiões).

Tabela 7. Resultado do teste de frequência significativa (STAC), ranqueados por frequência de ambas técnicas nos dados do Hospital de Câncer de Barretos (aCGH e exoma) e nos dados do TCGA. Os resultados foram filtrados para regiões com genes de câncer. Dados gerados pelo software Nexus Copy Number. Significância ajustada para $p \leq 0.05$ e porcentagem de agregação mínima de 20%)

Regiões de STAC	Mb	Citobanda	Evento	(%)	Genes de Câncer
EXOMA					
chr5:176,517,351-176,544,759	0.02	q35.2	Ganho	52,6	FGFR4
chr5:176,563,087-180,698,889	0.4	q35.2-q35.3	Ganho	52,6	NSD1, FLT4
CGH					
chr3:38,173,964-39,193,986	1.0	p22.2	Perda	83,7	MYD88
chr3:45,826,102-48,474,760	2.6	p21.31	Perda	83,7	SETD2
chr3:51,332,164-52,559,238	1.2	p21.2-p21.1	Perda	83,7	BAP1
chr5:161,333,199-170,342,358	0.9	q34-q35.1	Ganho	59,8	RANBP17
chr5:170,588,789-170,723,529	0.1	q35.1	Ganho	59,8	RANBP17
chr5:170,745,697-171,183,375	0.4	q35.1	Ganho	59,8	NPM1
chr5:176,350,789-176,708,657	0.3	q35.2-q35.3	Ganho	59,8	NSD1
chr5:176,726,398-180,221,523	0.3	q35.3	Ganho	59,8	NSD1
chr14:51,187,270-51,235,347	0.04	q22.1	Perda	35,9	NIN
chr6:134,920,073-136,106,987	0.1	q23.2-q23.3	Perda	29,3	MYB
chr7:13,973,325-14,769,783	0.07	p21.2	Ganho	29,3	ETV1
chr9:20,583,920-20,702,979	0.01	p21.3	Perda	28,3	MLL3
chr9:5,025,887-5,090,677	0.006	p24.1	Perda	27,2	JAK2
chr9:5,146,770-5,476,277	0.3	p24.1	Perda	27,2	CD274
chr10:89,651,372-89,726,830	0.07	q23.31	Perda	25,0	PTEN
chr10:89,727,369-90,626,330	0.08	q23.31	Perda	25,0	PTEN
chr16:60,194,892-65,008,456	4.8	q21	Ganho	20,7	CDH11
chr16:65,074,029-65,582,068	0.5	q21	Ganho	20,7	CDH11
chr3:104,117,864-106,057,292	1.9	q13.11	Perda	20,7	CBLB
chr3:96,925,000-103,350,030	6.4	q11.2-q13.11	Perda	20,7	TFG
TCGA					
chr3:8,888,670-9,186,943	0.2	p25.3	Perda	72,3	SRGAP3
chr3:9,965,521-10,141,120	0.1	p25.3	Perda	72,3	FANCD2
chr3:13,621,750-14,344,930	0.7	p25.1	Perda	72,3	XPC
chr3:36,179,708-37,558,061	1.3	p22.3-p22.2	Perda	72,3	MLH1
chr3:37,987,464-41,254,734	3.2	p22.2-p22.1	Perda	72,3	MYD88, CTNNB1
chr3:41,255,245-41,255,501	0.02	p22.1	Perda	72,3	CTNNB1
chr3:47,036,240-47,816,121	0.7	p21.31	Perda	72,3	SETD2
chr3:52,383,181-52,782,335	0.3	p21.1	Perda	72,3	BAP1, PBRM1
chr5:125,472,324-179,052,573	5.3	q23.2-q35.3	Ganho	47,6	PDGFRB, CD74, ITK, EBF1, RANBP17, TLX3, NPM1, NSD1
chr3:0-91,000,000	9.1	p26.3-q11.1	DA	27,3	SRGAP3, FANCD2, VHL, PPARG, RAF1, XPC, MLH1, MYD88, CTNNB1, SETD2, BAP1, PBRM1, FHIT, MITF, FOXP1
chrX:1,477,511-1,700,299	0.2	p22.33	Ganho	20,1	CRLF2, P2RY8
chr3:93,605,126-109,820,299	1.6	q11.1-q13.13	DA	20,1	TFG, CBLB
chr5:111,861,831-112,047,863	0.1	q22.2	DA	20,1	APC
chr5:114,438,632-180,915,260	6.6	q22.3-q35.3	DA	20,1	PDGFRB, CD74, ITK, EBF1, RANBP17, TLX3, NPM1, NSD1
chr14:41,657,299-53,455,308	1.1	q21.1-q22.1	DA	20,1	NIN
chr14:55,916,996-106,342,971	5.0	q22.3-q32.33	DA	20,1	KTN1, GPHN, TSHR, TRIP11, GOLGA5, DICER1, TCL6, TCL1A, BCL11B, AKT1

(*) Mb: Mega bases (Tamanho); STAC: Teste de Frequência Significativa; CGH: Hibridização Genômica Comparativa; DA: Desequilíbrio Alélico

A frequência das alterações mais significativas encontradas na coorte em questão foi relativamente similar à frequência encontrada nos dados TCGA e superior à frequência reportada pelo exoma (Tabela 8). Os eventos a nível de braço cromossômico (maiores que 3Mb)⁽¹¹⁰⁾ foram representados pelo ganho dos cromossomos 5q e 16q e perda do cromossomo 3. A análise *in silico* revelou 19 genes mapeados nas regiões de interesse (Tabela 8). De acordo com as evidências do CGI, as alterações nos genes *SETD2*, *BAP1*, *FLT4* e *PTEN* foram interpretadas como oncogênicas, e as alterações dos genes *FGFR4* e *NSD1* como prováveis *drivers*. As deleções dos genes *PTEN*, *SETD2* e *BAP1* são descritas como biomarcadores para CCR responsivas a medicamentos em ensaios pré-clínicos e clínicos de fase I-II ^(111; 112; 113; 114; 115). Outras alterações como a deleção dos genes *JAK2*, *CD274* e *MYD88*, e a amplificação dos genes *FGFR4* e *NPM1*, também estão envolvidos em ensaios clínicos para outros tipos tumorais ^(116; 117; 118; 119), sendo que para as alterações nos genes *JAK2*, *MYD88* e *NPM1*, já existem drogas aprovadas pela FDA para outros tumores ^(120; 121; 122). Nenhum dos 19 genes encontrados nas regiões de interesse permaneceu significativo após análise multivariada ou foi associado com sobrevida nos nossos dados.

Tabela 8. Resultado do teste de frequência significativa (STAC) ranqueados por frequência para os dados de aCGH em comparação com dados de exoma e TCGA. Para fins de associação clínica, regiões próximas e de mesma frequência (coluna "Citobandas") foram agrupadas em 12 regiões (coluna "Região"). Resultados filtrados para regiões com genes de câncer. Dados gerados pelo software Nexus Copy Number. Significância ajustada para $p \leq 0.05$ e porcentagem de agregação mínima de 20%

Cromossomo	Tamanho (Mb)	Região	Citobandas	Evento	Frequências (%)			Genes de Câncer
					HCB (CGH)	HCB (Exoma)	TCGA	
3	1.2	p21.2 - p21.3	p21.2-p21.1	Perda	83.7	52.5	72.2	BAP1
	2.6		p21.31	Perda				SETD2
3	1.0	p22.2	p22.2	Perda	83.7	57.6	72.2	MYD88
3	0.7	p25.2	p25.2	Perda	83.7	53.8	72.2	PPARG
3	6.4	q11.2 - q13.11	q11.2-q13.11	Perda	20.6	24.3	25.7	TFG
	1.9		q13.11	Perda				CBLB
	9.0		q34 - q35.1	Ganho				RANBP17
	0.1		q35.1	Ganho				NPM1
5	0.4	q34 - q35.3	q35.1	Ganho	59.7	55.1	47.6	NSD1
	0.3		q35.2 - q35.3	Ganho				FGFR4
	3.4		q35.3	Ganho				FLT4
6	1.1	q23.2 - q23.3	q23.2 - q23.3	Perda	29.3	21.7	19.0	MYB
7	0.7	p21.2	p21.2	Ganho	29.3	16.6	22.9	ETV1
9	0.1	p21.3	p21.3	Perda	28.2	16.6	17.9	MLLT3
9	0.6	p24.1	p24.1	Perda	27.1	14.1	20.7	JAK2
	0.3		p24.1	Perda				CD274
10	0.7	q23.31	q23.31	Perda	25.0	14.1	13.6	PTEN
	0.8		q23.31	Perda				
14	0.4	q22.1	q22.1	Perda	35.9	15.3	29.0	NIN
16	4.8	q21	q21	Ganho	20.6	19.2	11.9	CDH11
	0.5		q21	Ganho				

(*) HCB: Hospital de Câncer de Barretos; CGH: Hibridização Genômica Comparativa; Mb: Mega bases

6.2.5 Regiões Cromossômicas de Interesse e Impacto Clínico

Toda as regiões de interesse, isto é, aquelas que continham genes de câncer, foram investigadas para associações clínico-patológicas (Tabela 9) (Anexo B). Dentre elas, deleções nos cromossomos 9p e 14q, e o ganho do 7p foram significativamente associados à características de doença avançada (tumores grandes, metástase ao diagnóstico, grau histológico e estadiamentos avançados) (Tabela 9) (Anexo B).

Tabela 9. Análise univariada de associação entre características clinicopatológicas e alterações moleculares das regiões de interesse.

Cromossomo	Citobanda	Evento	Característica	P-valor
3	p21.2	Perda	Grau de Fuhrman (1-2)	0.02
3	p25.2	Perda	Grau de Fuhrman (1-2)	0.01
5	q34-35.1	Ganho	Presença de Metástase	0.03
			Tumor ≥ 7cm	0.01
7	p21.2	Ganho	Etnia (Pardos e Negros)	0.01
			Grau de Fuhrman (3-4)	0.01
			Tumores T3-T4	0.02
9	p21.3	Perda	Presença de Metástase	0.01
			Tumor ≥ 7cm	0.02
			Tumores T3-T4	0.04
			Estadiamento (3-4)	0.01
9	p24.1	Perda	Tumor ≥ 7cm	0.04
			Tumores T3-T4	0.05
14	q22.1	Perda	Estadiamento (3-4)	0.05
			Desfecho (óbito)	0.02
			Presença de Metástase	0.03
			Grau de Fuhrman (3-4)	0.01

(*) cm: centímetros

Além disso, a perda do cromossomo 14q, que engloba o gene *NIN*, foi a única região associada a menor sobrevida (Figura 18). Curiosamente, o ganho do 5q também se mostrou associado a piores resultados (Tabela 9). E o ganho do 7p, associado a tumores em estadiamento e grau histológico avançados. Perdas no cromossomo 3p mostraram-se relacionadas a sinais de doença inicial, principalmente com grau histológico de Fuhrman 1 ($p=0.01$) (Tabela 9) (Anexo B).

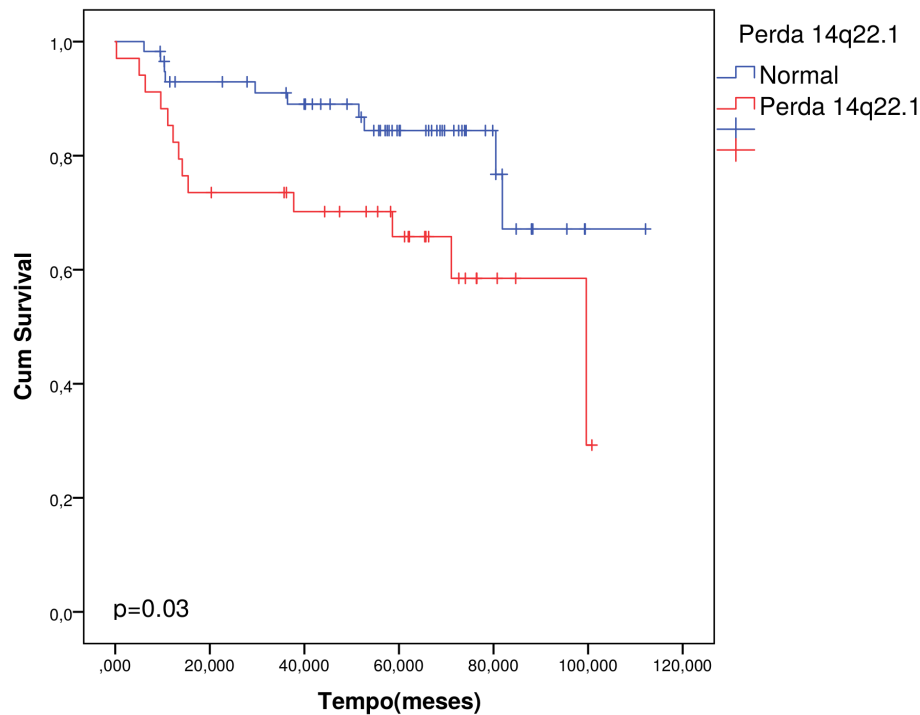


Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global para pacientes com perda de 14q.

As características clínico-patológicas significativamente associadas às regiões de interesse na univariada foram analisadas simultaneamente por meio de de uma regressão logística binária (método *Backward*), a fim de estimar a probabilidade associada à ocorrência dos eventos clínicos em face aos eventos de cada região (Tabela 10). De acordo com a análise multivariada, o ganho no 5q mostrou aumentar o risco para tumores grandes (acima de 7 centímetros) ($p=0.03$; IC95% 1.084-8.144). Pacientes com ganho de 7p21.2

possuem maiores chances de serem diagnosticados com tumores que comprometem estruturas adjacentes (T3 e T4) ($p=0.02$; IC95% 1.119-8.045) e em graus histológicos avançados ($p=0.01$; IC95% 1.285-9.107). Pacientes com perda de 9p21.3 possuem maiores chances de serem diagnosticados com tumores grandes ($p=0.01$; IC95% 1.256-9.049), em estadiamento avançado ($p=0.005$; IC95% 1.514-10.202) e com doença metastática ($p=0.003$; IC95% 1.731-16.028). Além de possuírem risco aumentado para o surgimento de recidivas ($p=0.04$; IC95% 1.027-7.704) em comparação àqueles sem este evento. Por fim, pacientes com perda de 14q22.1 tiveram o risco de vir a óbito aumentado em aproximadamente 3 vezes em comparação aos pacientes sem este evento ($p=0.02$; IC95% 1.125-7.845) (Tabela 10).

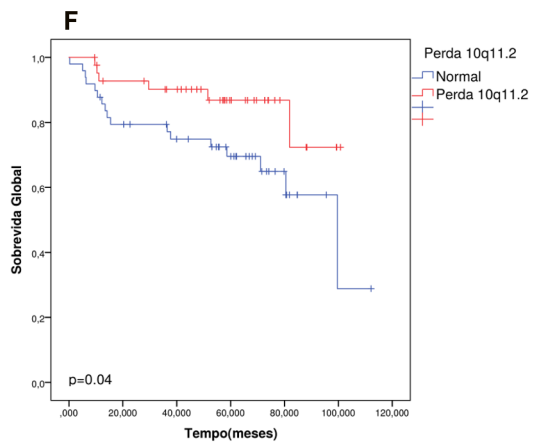
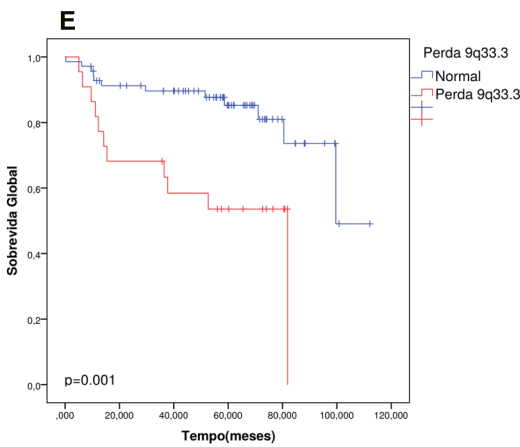
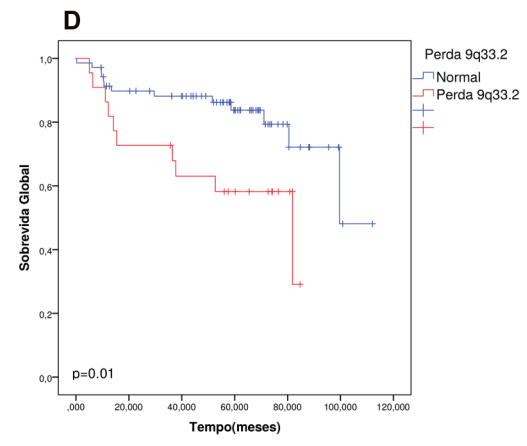
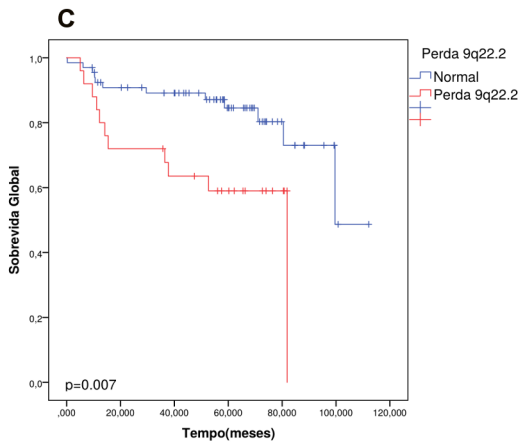
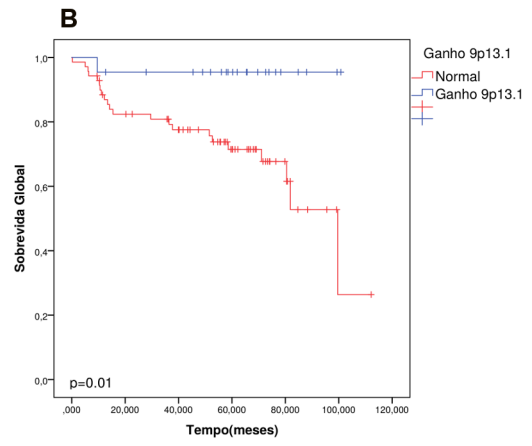
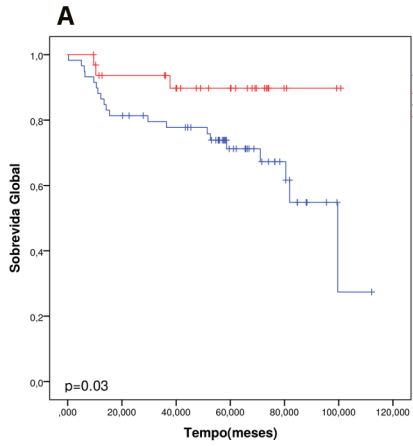
Tabela 10. Regressão Logística Binária a partir das variáveis clínico-patológicas associadas às regiões cromossômicas de interesse.

Variável	Regiões	Regressão Logística Binária (Método <i>Backward</i>)			
		B	p-valor	RR	IC95%
Tumores T3 e T4	Ganho 7p21.2	1.09	0.02	3.0	1.11 – 8.04
Tumores >7cm	Ganho 5q35.2-q35.3	1.08	0.03	2.9	1.08 – 8.14
	Perda 9p24.1	1.21	0.01	3.3	1.25 – 9.04
Recidiva	Perda 9p21.3	1.03	0.04	2.8	1.02 – 7.70
Estadiamento 3 e 4	Perda 9p21.3	1.36	0.005	3.9	1.51 – 10.20
Desfecho (óbito)	Perda 14q22.1	1.08	0.02	2.9	1.12 – 7.84
Fuhrman 3 e 4	Perda 7p21.2	1.23	0.01	3.4	1.28 – 9.10
Metástase ao diagnóstico	Perda 9p21.3	1.66	0.003	5.2	1.73 – 16.02

(*) cm: centímetros; M1:metástase; N1: linfonodo comprometido; B: Coeficiente de Regressão; RR: Razão de Risco; IC: Intervalo de Confiança.

6.2.6 Outras Regiões Cromossômicas Frequentes e Impacto na Sobrevida dos Pacientes com Carcinoma Renal de Células Claras

Todas as 158 regiões identificadas pelo STAC (com ou sem genes de câncer) foram associadas com a sobrevida dos pacientes. Dez regiões que não continham genes sabidamente associados ao câncer se mostraram significativamente associadas a sobrevida (Figura 19). Pacientes com perda das regiões 7q35 (A) e 10q11.2 (F) e ganho da região 9p13.1 (B), apresentaram maior sobrevida comparado a pacientes normais para estas regiões ($p=0.03$, $p=0.04$ e $p=0.01$, respectivamente). Enquanto que outras 7 regiões foram associadas a menor sobrevida: perda das regiões 9q22.2 (C; $p=0.007$), 9q33.2 (D; $p=0.01$), 9q33.3 (E; $p=0.01$), 14q11.2 (H; $p=0.02$) e 22q11.1 (J; $p=0.02$); e ganho do 10q26.1 (G; $p=0.03$) e 20q13.3 (I; $p=0.03$) (Figura 19). A identificação dessas alterações no genoma pode fornecer informações importantes sobre processos que interferem no surgimento e progressão da doença e, portanto, sugerir possíveis novos alvos prognósticos e terapêuticos.



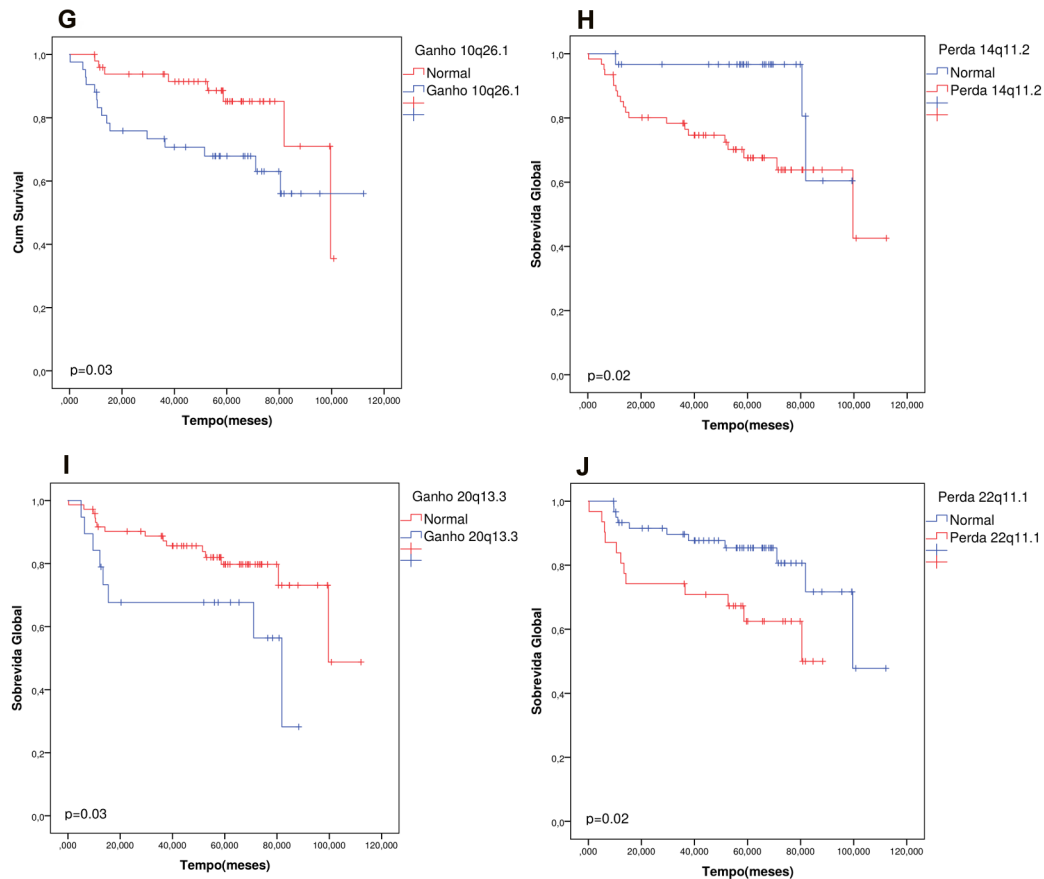


Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de acordo com regiões significativas para alterações no número de cópias e ausentes para genes de câncer.

A anotação funcional feita com os genes contidos nessas regiões não identificou categorias de relevância ao processo tumoral. Nem para os genes deletados, nem para os amplificados. O que, provavelmente, se deve ao fato de ter um número grande de genes de diferentes processos e muitos com funções ainda desconhecidas (Anexo E).

6.2.7 Região 14q22.1 e Impacto na Sobrevida dos Pacientes com Carcinoma Renal de Células Claras

A análise de sobrevida de todas as regiões alteradas nas amostras de cCCR apontou para a associação da perda do cromossomo 14 e pior sobrevida dos pacientes. A

região 14q22.1, associada à diminuição de sobrevida global, e o gene *NIN* identificado nessa região, também foram identificados nos dados do TCGA. No presente estudo, além da associação da perda do gene *NIN* com diminuição da sobrevida global (Figura 20), a análise estatística demonstrou associação significativa com estadio e grau histológico avançados ($p=0.04$ e $p=0,006$, respectivamente), além de metástase ao diagnóstico ($p=0.03$) e pior desfecho ($p=0.02$) (Anexo C).

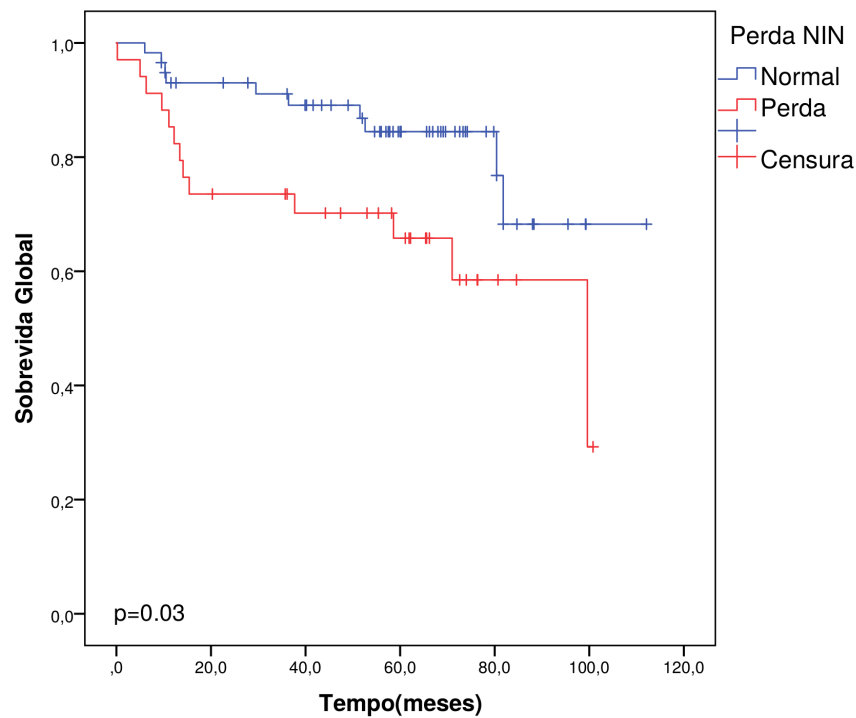


Figura 20. Kurvas de Kaplan-Meier para sobrevida global para pacientes com perda do gene *NIN*.

6.2.8 Integração in silico das Alterações no Número de Cópias do DNA com Perfil de Expressão Gênica

A fim de procurar associações entre as CNAs e expressão gênica, todos os 19 genes identificados nas regiões de interesse foram investigados para ganho ou perda de expressão em 579 amostras clínicas de ccRCC nos dados públicos do TCGA através da plataforma *Oncomine*⁽¹⁰³⁾. O resultado da análise de associação está representado em forma de *circus plot* (Figura 21), onde são apresentados apenas genes com alterações no número de cópias de DNA e expressão gênica concordantes. A perda dos genes *BAP1*, *MYB*, *MLLT3* e *TFG* apresentaram perda de expressão gênica concordantes. Da mesma forma, o ganho dos genes *CDH11*, *NSD1* e *FLT4* exibiu ganho de expressão gênica simultânea nas amostras clínicas do TCGA (Figura 22).

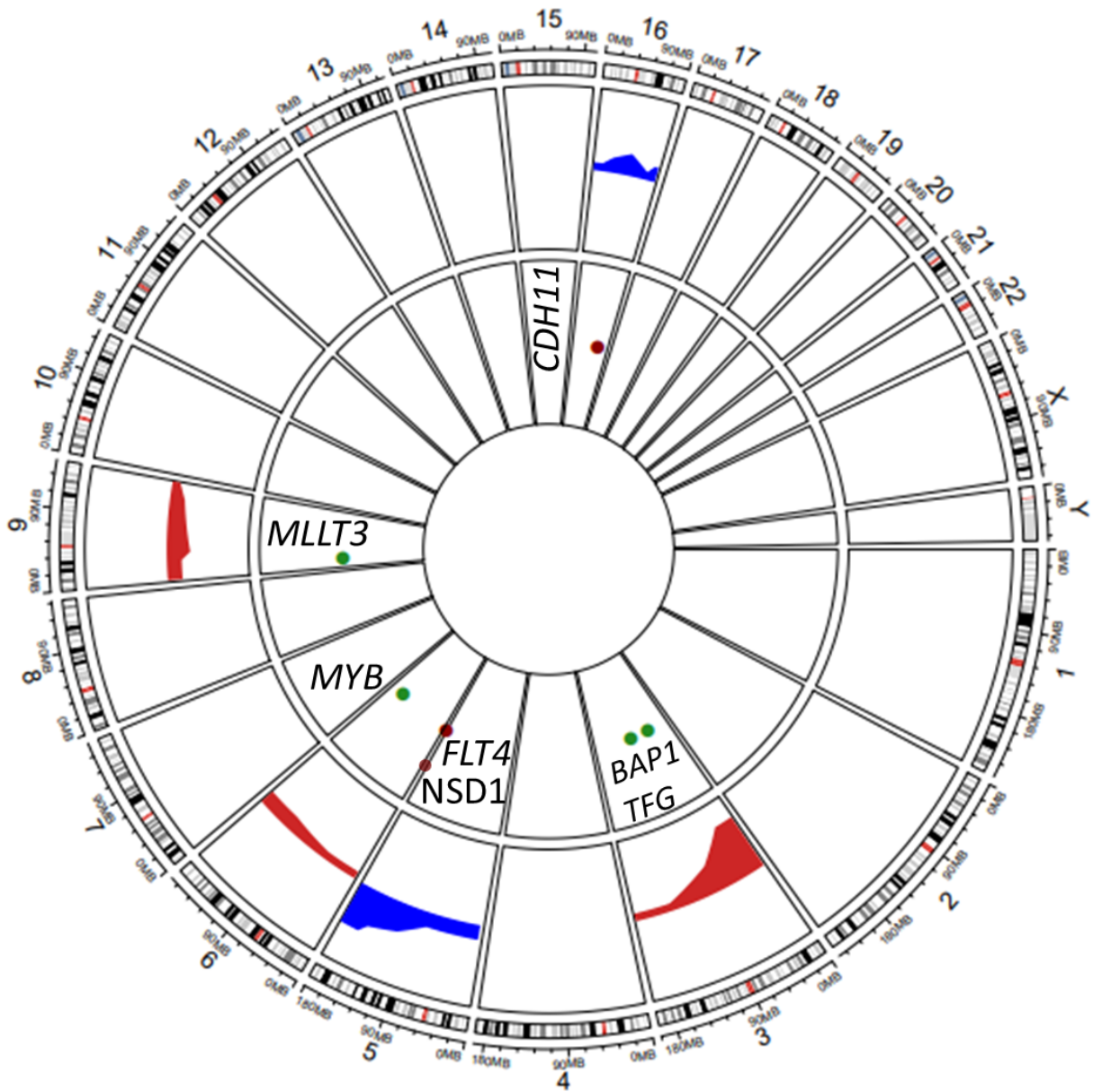


Figura 21. *Circus plot* evidenciando a associação de CNAs e expressão gênica a partir dos dados de 579 amostras clínicas de cCCR do TCGA. O círculo externo representa regiões de CNAs ao longo do genoma por cromossomo. Em azul, ganhos e em vermelho, perdas. O círculo interno contém genes com alteração na expressão gênica concomitante. Pontos verdes representam genes com perda de expressão e pontos vermelhos, genes com ganho de expressão.

Os genes com alterações no número de cópias e expressão gênica condordantes pela plataforma Oncomine foram investigados para associações clínicas nos nossos dados (Tabela 11) (Anexo C). A perda dos genes *MYB* e *MLLT3* foram significativamente associadas a características de doença avançada. A perda do gene *MLLT3* foi associada a metástase ao diagnóstico ($p=0.005$), estadiamento IV ($p=0.02$), tumores grandes ($p=0.01$) e pior desfecho ($p=0.02$), e a perda do *MYB* ao Grau Histológico 3 ($p=0.02$) (Tabela 11) (Anexo C). O ganho dos genes no 5q, apresentou associação significativa a sinais de doença agressiva. A perda do gene *FLT4* foi associada a tumores grandes (maiores que 10 centímetros; $p=0.007$). E a perda do gene *NSD1* também associou-se a tumores grandes (acima de 10 centímetros; $p=0.007$) e estadiamento IV ($p=0.01$). A perda do gene *BAP1* foi associado apenas com grau histológico Fuhrman 1 ($p=0.02$). Não houve significância nas associações para as alterações nos genes *TFG* e *CDH11*. Nenhum dos 7 genes permaneceu significativo após análise multivariada ou foi associado com sobrevida nos nossos dados.

Tabela 11. Análise Univariada para genes associados a expressão gênica nas 579 amostras clínicas de cCCR do TCGA e as características clínicas significativamente enriquecidas para cada gene.

Cromossomo	Região	Genes de Câncer	Evento	Expressão Gênica	Característica Clínica	P-valor
3	p21.2 - p21.3	BAP1	Perda	Perda	Fuhrman 1	0.02
5	q34 - q35.3	FLT4	Ganho	Ganho	Tumores >10cm	0.007
5	q34 - q35.3	NSD1	Ganho	Ganho	Tumores >10cm	0.007
					Estadiamento Clínico 4	0.01
6	q23.2 - q23.3	MYB	Perda	Perda	Fuhrman 3	0.02
9	p21.3	MLLT3	Perda	Perda	Metástase ao diagnóstico	0.005
					Estadiamento Clínico 4	0.02
					Tumores >7cm	0.01
					Desfecho (Óbito)	0.02
					Fuhrman 3	0.01

(*) cm: centímetros

6.2.9 Anotação Funcional dos Genes Identificados

A fim de explorar características funcionais e relevância biológica das regiões afetadas por CNAs, uma anotação funcional foi aplicada para todos os 1.248 genes encontrados nas regiões significativas (com ou sem genes de câncer) regiões funcionais ou de relevância biológico. Apesar da anotação funcional não ter identificado associações significativas para os genes amplificados, para os genes deletados, por outro lado, foi demonstrado grupos de anotação relacionados a processos biológicos potencialmente importantes, principalmente ligados ao sistema imune (quimiotaxia, atividade de citocinas e quimiocinas e ligantes de Interferon I) ($p \leq 0.05$) e possivelmente associados a processos oncogênicos (diferenciação celular e via PI3K-Akt) ($p \leq 0.005$) (Figura 22). Tais achados reforçam que esses genes podem ser de particular interesse para a patologia do CCR, pois entre eles podem estar oncogenes ou genes supressores tumorais localizados em regiões amplificadas ou deletadas, respectivamente, e, portanto, potencialmente envolvidos na etiologia do tumor. A análise de todos os outros genes dessas regiões (além dos genes de câncer) também foi feita para explorar possíveis associações. No entanto, não foram identificadas categorias de relevância ao processo tumoral, o que se deve ao fato de ter um número grande de genes de diferentes processos e muitos com funções ainda desconhecidas (Anexo D).

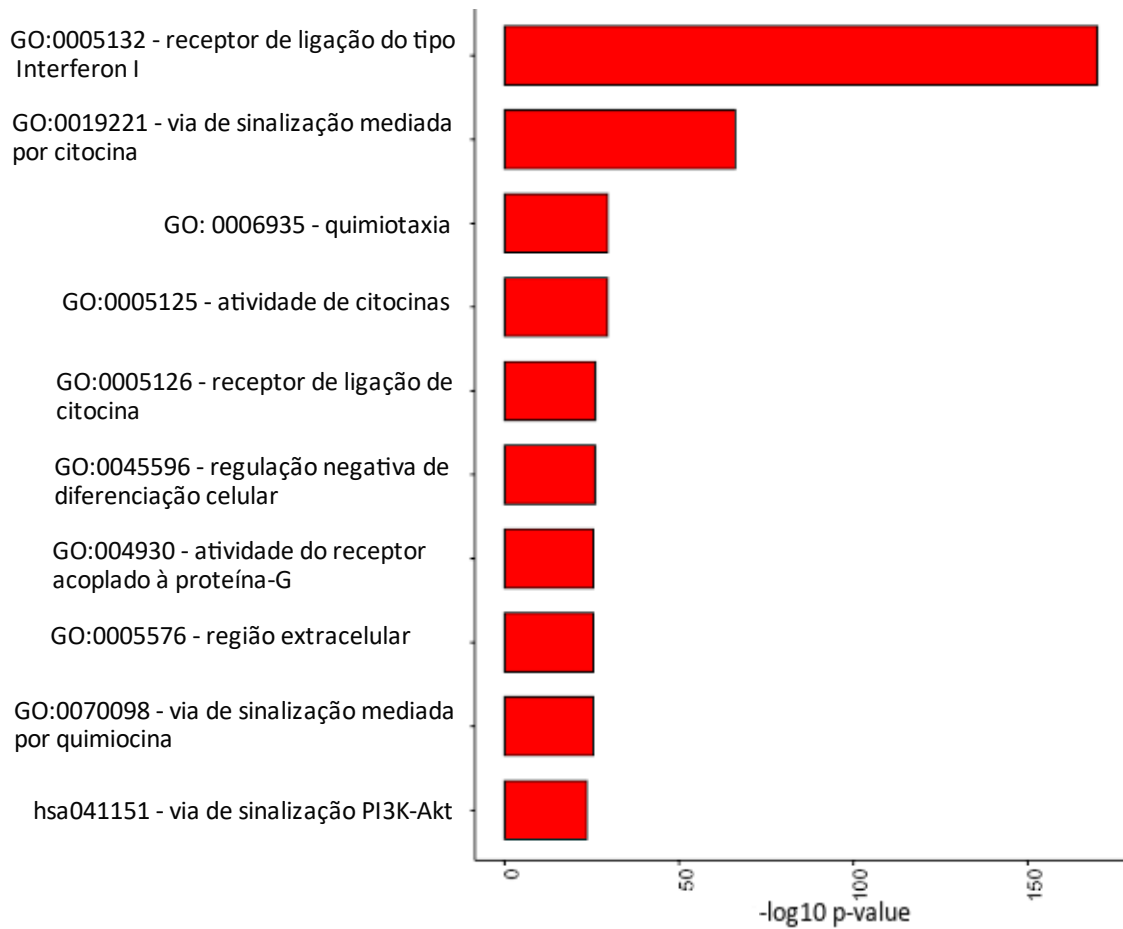


Figura 22. Anotação funcional dos genes identificados nas regiões de interesse. Os dados foram gerados por meio do banco de dados DAVID. No eixo y encontram-se as top 10 categorias enriquecidas do *Gene Ontology* e do Kegg. No eixo x está representado o valor de P corrigido por Benjamini-Hochberg em escala de -10 vezes o log10 do mesmo.

7 DISCUSSÃO

O carcinoma de células renais, em especial o subtipo histológico de células claras (cCCR), corresponde ao alvo de estudo do presente trabalho. Este, compreende a maioria de casos observados na incidência global de câncer de rim, sendo frequentemente descrito na literatura como o mais agressivo e responsável pelo maior número de mortes^{5; 6}. Além disso, o aumento contínuo nas taxas de incidência e mortalidade relacionadas ao tipo tumoral em questão tem sido observado no mundo todo, mesmo em vista dos recentes avanços no controle da doença e nas diferentes modalidades de tratamento sistêmico^{5; 123}. Tais evidências apontam o cCCR como um tipo tumoral complexo, com particularidades genéticas, histopatológicas e clínicas, ainda a ser explorado sob diversos aspectos no âmbito da pesquisa.

Em paralelo, a caracterização molecular de diversos tumores têm apresentado um grande aumento nos últimos cinco anos, principalmente em decorrência da maior acessibilidade a técnicas de investigação em larga escala, identificando alterações em nível genômico, ampliando a compreensão dos mecanismos de desenvolvimento do câncer e fornecendo novas possibilidades no campo dos biomarcadores prognósticos e terapêuticos^{124; 125}. Dentro desse contexto, as alterações do número de cópias do DNA correspondem a bons alvos candidatos por compreender regiões genômicas de ampla extensão, com grande impacto em determinados tipos tumorais, tais como cCCR¹²⁶. Apesar da descrição em outras populações, o perfil completo de CNAs do cCCR nunca foi relatado na população brasileira.

Os achados deste trabalho incluem a avaliação do perfil de alterações do número de cópias de DNA com foco somático de 92 pacientes com cCCR da população brasileira por meio da técnica de aCGH, e, em parte dos pacientes (n = 78), por análise do

exoma. A comparação dos resultados entre técnicas diferentes forneceu uma validação interna das análises de bioinformática da instituição, uma vez que os mesmos devem ser, pelo menos em parte, concordantes. Os dados obtidos também permitiram a associação de regiões frequentemente alteradas nos pacientes avaliados com diversas características clínicas, validando achados da literatura e apontando regiões e genes de interesse para estudos futuros.

7.1 Visão Geral dos Dados da Série de Carcinoma Renal de Células Claras

O presente projeto utilizou dados provenientes de experimentos conduzidos em projetos prévios, tendo como foco, portanto, a bioinformática e análise dos dados. Essa estratégia permitiu maior agilidade na obtenção dos resultados e também a avaliação do mesmo paciente por meio de diferentes metodologias. Dentro desse contexto, em relação ao impacto da técnica, buscou-se primeiramente avaliar a reprodutibilidade entre as diferentes metodologias empregadas (aCGH e exoma). Evidências prévias mostram que mesmo para os eventos de maior extensão, os resultados podem não ser consistentes entre diferentes plataformas e estudos⁹⁷. Entretanto, é importante considerar a qualidade dos experimentos moleculares e o avanço dos algoritmos de identificação de CNAs que possibilitaram as análises deste estudo. Dessa forma, amostras de aCGH com valor de DLRS maior que 0.3, o que corresponde a um grande efeito associado à variância técnica e experimental conforme recomendações do fabricante, foram excluídas da análise. Além disso, a cobertura média do sequenciamento do exoma foi de aproximadamente 70x, considerado de boa qualidade para as análises¹²⁷. Adicionalmente, todos os dados foram analisados utilizando os mesmos algoritmos, incluindo a re-análise dos dados do TCGA

na mesma plataforma sob os mesmos parâmetros. Assim, foram comparados os perfis de CNAs do aCGH e do exoma da casuística deste trabalho, que apresentou resultados similares e também foi possível observar uma concordância com o perfil de CNAs dos dados do TCGA (Figura 16).

Ainda, a comparação do perfil geral de CNAs entre diferentes técnicas (aCGH e exoma) e entre diferentes instituições (comparação com o TCGA) é um ponto de partida importante em relação a reprodutibilidade das análises. Isso torna-se ainda mais evidente quando se considera a análise de CNAs advinda de NGS (exoma), pois, apesar de diversos *guidelines* estarem disponíveis para variantes tais como SNVs e *indels* a partir desse tipo de experimento, não existe um consenso sobre os parâmetros básicos de análise de CNAs, e a forma de reportar os resultados, além de variar consideravelmente entre laboratórios¹²⁸. Dentre as recomendações mais atuais encontram-se a variação de parâmetros para avaliação de CNAs, avaliando com cautela genes/loci, os quais poderiam ser superestimados ou subestimados em decorrência da aneuploidia tumoral. Além disso, recomenda-se avaliar regiões que não deveriam ser afetadas pela doença de estudo¹²⁸. No presente estudo, foram alterados diversos parâmetros de análises e o perfil de CNAs se manteve similar entre todos os conjuntos de dados (Figura 16).

Em relação ao número de alterações, o exoma apresentou um número menor destas em comparação ao aCGH, sendo aproximadamente 4 mil (mediana de 17 por paciente) *versus* aproximadamente 10 mil (mediana de 67 por paciente), respectivamente. Estudos prévios mostraram uma mediana e média de 12 e 20 CNAs por paciente, respectivamente^{129; 103}. Enquanto aos dados do TCGA, mesmo em re-análise pela mesma plataforma, apresentou 44 mil alterações no total, com uma mediana de 77 alterações por paciente. Dessa forma, apesar do perfil global ser muito similar, a correspondência em re-

lação ao número de alterações ainda é baixa, não havendo um consenso quanto ao número de alterações globais em cCCR. Além disso, apenas 28% de todas as regiões significativas identificadas pelo STAC nos dados de exoma foram sobrepostas às regiões identificadas nos dados de aCGH. E, ao se considerar apenas as regiões que englobam genes de câncer, nosso estudo indica uma sobreposição ainda mais baixa entre as CNAs detectadas em ambas fontes de dados. Esses resultados mostram que os dados provenientes de estatísticas baseadas em frequência do aCGH forneceram mais regiões que o exoma. Dessa forma, para situações onde o interesse for apenas na identificação das principais CNAs em cada paciente ou mesmo para um perfil geral dos tumores de cCCR, o exoma pode ser uma alternativa ao aCGH devido sua relação custo-benefício. Mas no presente trabalho, o foco das análises foi maior no aCGH devido ao número maior de alterações e em frequência e por ser ainda a técnica de escolha de grandes projetos, como o próprio TCGA¹⁰³.

Considerando o impacto da série deste trabalho, a principal comparação envolve os dados do TCGA. Trata-se da maior casuística avaliada da maioria dos 33 tipos tumorais com diferentes re-análises e interpretações, conferindo maior confiabilidade e reprodutibilidade dos achados¹³⁰. Em relação ao cCCR, um total 446 amostras foram inicialmente avaliadas pelo TCGA¹⁰³ com dados disponíveis para 441 casos que foram re-analisados neste trabalho. Posteriormente, os estudos mais recentes de pan-cancer do TCGA estenderam a casuística para 488 pacientes com ccRCC^{6; 131}. Apesar da crescente taxa de mortalidade da doença, a taxa de pacientes vivos neste trabalho é de 78%, e a do TCGA apresentou uma taxa de aproximadamente 67% em ambos os estudos^{103; 6}.

É importante reforçar que, apesar da casuística do presente trabalho ser diferente da do TCGA, o perfil de CNAs é bem similar, conforme já mencionado. Uma provável explicação para a similaridade é que os eventos tumorais ocorrem ao longo do tempo, e

aqueles considerados *drivers* em geral ocorrem no início do processo da carcinogênese¹³². Um exemplo é a alteração correspondente à perda do cromossomo 3, típica dos tumores de cCCR e que tem sido caracterizada como um evento inicial da tumorigênese desse subtipo específico de carcinoma renal¹³³. Além disso, o TCGA também confirmou o ganho do 5q e a perda do 14q em câncer renal de células claras e estudos posteriores confirmaram tratar-se de eventos iniciais no desenvolvimento dessa neoplasia^{131; 134}. Além disso, as principais características clínico-patológicas avaliadas para sobrevida apresentaram associações significativas: estadiamento, grau histológico, metástase e tamanho do tumor. Mostrando, dessa forma, que mesmo com um número menor de casos, ainda foi possível identificar associações importantes.

Finalmente, considerando os principais fatores de risco associados ao cCCR, foram avaliadas diversas variáveis clínicas neste trabalho de forma sistemática. Os pacientes avaliados apresentaram em sua maioria hipertensão, tabagismo, obesidade e diabetes. No entanto, as análises estatísticas realizadas não identificaram nenhuma região associada a esses fatores (Anexo B).

7.2 Carga de Alterações no Número de Cópias de DNA e Associações Clínico-patológicas

A análise do genoma completo do presente estudo revelou aberrações frequentes de braços cromossômicos ou cromossomos inteiros nos tumores de cCCR, como já demonstrado por outros estudos^{107; 103; 6}. Poucos estudos avaliaram a relação entre a carga de CNAs e dados clínicos no cCCR. Para os tumores de células claras, acredita-se que alterações cromossômicas acumuladas possam desempenhar um papel significativo no potencial

maligno dos tumores¹⁰⁷), onde o cariótipo dos tumores metastáticos são reportados como mais complexos (com mais aberrações) em comparação aos tumores não-metastáticos¹⁰⁵.

No presente estudo, o grupo de pacientes que apresentou menos de 50 CNAs foi significativamente associado à características de doença localizada como tumores menores, estadiamento e grau histológico iniciais, ausência de metástases e melhor desfecho. Além disso, pacientes metastáticos apresentaram mais aberrações em relação aos não-metastáticos (mediana de 126 CNAs *versus* 62, respectivamente). Arai e colaboradores em uma análise de cluster hierárquica não supervisionada baseada em resultados de aCGH, conseguiram separar os pacientes em 2 grupos de acordo com seu padrão de CNAs. Pacientes que apresentaram graus histológicos mais elevados, envolvimento vascular, trombos de tumores nas veias renais e estágios patológicos mais elevados foram acumulados no grupo com maior número de alterações cromossômicas¹⁰⁷. Além disso, apesar da associação significativa entre o número de alterações e o grau de malignidade da doença, os níveis não foram associados com sobrevida, como também observado por um estudo prévio¹⁰².

7.3 Perfil de Alterações no Número de Cópias de DNA e Associações Clínico-patológicas

As alterações mais significativas incluíram a perda dos cromossomos 3p (87,3%), 14q (35,8%), 6q (29,3%), 9p (28,6%) e 10q (25%), e ganho dos cromossomos 5q (59,7%), 7p (29,3%) e 16q (20,6%). Exceto pela região do 3p, todas as regiões foram associadas a sinais de doença avançada. Também foram investigados os dados de CNAs em uma coorte de 441 amostras clínicas de cCCR do TCGA, cuja casuística é majoritariamente composta por pacientes europeus com doença avançada (metastáticos e com estadiamento e grau

histológico avançados)¹⁰³. Em comparação aos dados do TCGA, a frequência das alterações mostrou-se consideravelmente similar, com um percentual máximo de diferença de 12%. As alterações mais recorrentes foram a perda do 3p (83.7% *versus* 72.2% no TCGA), seguido do ganho no cromossomo 5q (59.7% *versus* 47.6%) e da perda do 14q (35.9% *versus* 29%). Foram identificadas 12 regiões significativamente frequentes que continham genes de câncer. Com exceção das regiões de perda no 3p, a perda nos cromossomos 9p e 14q, e as regiões de ganho nos cromossomos 5q e 7p foram significativamente associados à características mais agressivas na análise univariada e muitas delas permaneceram significativas após o modelo multivariado.

Tumores com perda do 3p são um *hallmark* no cCCR e estão associados a estágios menos avançados e melhor sobrevida^{101; 135; 136}. Essa região codifica um dos principais genes descritos na patologia do cCCR, o *VHL*, identificado previamente em estudos de alterações germinativas de susceptibilidade ao carcinoma renal⁵⁰. Em decorrência da importância desse gene nesse contexto, nesse estudo foram avaliadas as variantes germinativas do gene em questão. No entanto, não foram identificadas variantes consideradas patogênicas. Uma possível explicação é a composição da população de pacientes deste estudo, composta quase que inteiramente por casos de câncer renal esporádico, excluindo assim potenciais influências de tumores hereditários. Além disso, dados do TCGA identificaram outros genes envolvidos no mesmo mecanismo biológico do *VHL*, o complexo E3 ubiquitina ligase que atuam como mutuamente exclusivos em relação a ele¹⁰³. Dessa forma, o fenótipo é o mesmo mas sem a alteração desse gene em si. Finalmente, por se tratar de uma doença complexa, muitos fatores associados ao caráter somático ainda carecem de ser identificados.

No presente estudo, a perda do 3p foi identificada de forma relativamente similar

nos tumores metastáticos e não-metastáticos (88% vs 84%, respectivamente) e, apesar de haver associação da perda do 3p com graus histológicos iniciais de acordo com a análise univariada, houve ausência de significância na multivariada e de associação com sobrevida. Observações semelhantes foram feitas por outros autores^{136; 70; 105; 101}.

Gunawan e colaboradores sugerem que o ganho no 5q seja uma alteração clinicamente favorável no cCCR com aumento da taxa de sobrevida global. Apesar do aumento de sobrevida em pacientes avançados, eles não observaram associação com nenhuma variável clinicopatológica¹⁰². Além disso, ganhos de 5q foram relatados por Kardas e colaboradores com uma frequência duas vezes maior em tumores não-metastáticos do que nos metastáticos, no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa¹⁰⁵. Por outro lado, os dados de sobrevida para o ganho do 5q na coorte em questão não apresentou diferença significativa na sobrevida global. Mesmo considerando apenas pacientes em estadiamento clínico avançado, o ganho do 5q não influenciou na taxa de sobrevida dos pacientes. Curiosamente, o ganho do 5q foi associado a piores resultados como presença de metástase ao diagnóstico e tumores grandes, com permanência da significância no modelo multivariado como um fator de risco para tumores grandes aumentado em aproximadamente 3 vezes ($p=0.03$; IC95% 1.084-8.144). Apesar do ganho do 5q ter sido identificado como uma alteração clinicamente favorável¹⁰², essa alteração é freqüentemente sugerida como uma região cromossômica muito provável de conter genes responsáveis pela tumorigênese dos tumores de células claras^{137; 138}. Além disso, os ganhos detectados no cromossomo 5q, bem como no 7q, já foram associados com aumento de expressão gênica, sugerindo fortemente a presença de genes importantes nessas regiões¹⁰⁴. Ainda não é claro a importância dessa região desde que foi descrita. Mais estudos são necessários para elucidar o papel do ganho do 5q no CCR.

Os principais achados deste trabalho no que diz respeito à deleção no 9p é que ela está associada às lesões mais agressivas, com maior probabilidade de envolver tumores grandes em estadiamentos avançados, metástase ao diagnóstico e com maior probabilidade de recidivas após nefrectomia. Apesar da tendência de associação, a perda do 9p não atingiu significância para sobrevida ($p=0.07$). A falta de associação com sobrevida neste estudo pode ser explicada pelo fato de essa associação ter sido feita em uma população majoritariamente composta por pacientes com doença inicial, ou seja, poucos pacientes metastáticos ao diagnóstico, ao contrário da população de estudos prévios, que indicaram a perda do 9p como um fator prognóstico independente^{106; 101; 139}. Embora esses tumores sejam mais prováveis de serem maiores e em estádios avançados, a perda do 9p também esteve presente em tumores menores (24.1%, 14 dos 58 tumores <7cm) e estádios (43.7%, 14 dos 32 tumores em estádios iniciais) e graus histológicos iniciais (27.5%, 19 dos 69 tumores Fuhrman 1 e 2). Atualmente, não existem fatores prognósticos confiáveis que possam ser usados para prever o potencial maligno de tumores menos agressivos e não há características suficientes para basear uma decisão sobre necessidade de tratamento imediato ou a segurança de seguir com vigilância ativa. Principalmente no que diz respeito a tumores pequenos, menores que 4 centímetros, conhecidos como pequenas massas renais. O conhecimento do status da deleção do 9p poderia, portanto, fornecer informações adicionais sobre o curso clínico desses pacientes. Apesar do tamanho do tumor (>7cm) ter retido significância, tanto para o número de eventos quanto para as regiões de interesse, no modelo multivariado o tamanho por si só não é suficiente para distinguir o comportamento benigno ou agressivo do cCCR. A biologia desses tumores deve ser melhor compreendida. La Rochelle e colaboradores indicaram que a perda do 9p estava, especificamente, associada a um desfecho ruim em pacientes com pequenas

massas renais localizadas¹³⁹, sugerindo que a perda do 9p não influenciaria no prognóstico de tumores grandes (avançados) ou já metastáticos. Sendo assim, a possibilidade de realizar uma análise coromôssômica pré-operatória para caracterizar o potencial maligno dos tumores pequenos e localizados ajudaria a determinar quais lesões devem ser tratadas de imediato. Mais estudos são necessários para validar esses achados e elucidar os genes específicos de 9p envolvidos na concessão desse fenótipo agressivo.

Os tumores que apresentaram ganho do 7p (29%), foram associados a doença localmente avançada (tumores T3 e T4) e permaneceram significativos após o modelo multivariado, mostrando conferir um risco 3 vezes maior para tumores avançados em relação à pacientes sem a presença deste evento. No entanto, a amplificação do gene *ETV1* contido nesta região de ganho, não apresentou ganho de expressão gênica de acordo com a análise *in silico* dos dados do TCGA, nem associação com sobrevida na análise de *log rank*. Sugerindo, assim, que talvez haja outros genes possivelmente responsáveis pelo fenótipo agressivo dos tumores com ganho do 7p além do *ETV1*. Outros estudos apontam o ganho do cromossomo 7 como um possível responsável pela tumorigênese do CCR devido à amplificação do gene *EGFR* localizado em 7p11.2^{137; 102; 138}. Neste estudo, no entanto, a região significativa de ganho foi 7p21.2, que engloba o gene *ETV1*. Além disso, há evidências de aumento de sobrevida global para pacientes com ganho do chr7 em outros tipos tumorais, mostrando a importância desses loci na tumorigênese¹⁴⁰.

Assim como os ganhos do 5q e 7q e a perda de 3p, a perda do 14q também é freqüentemente detectada nos tumores de cCCR. Em 2007, Yoshimoto e colaboradores revelaram que as CNAs em 14q estão significativamente associadas com a desregulação da expressão gênica nos cCCRs (perda) e foi sugerida como uma alteração específica de tumores de alto grau¹⁰⁴. Mais tarde, no entanto, diversos estudos mostraram a associa-

ção significativa com pior prognóstico (estadio e grau histológico avançados), metástase a distância e menor sobrevida também em pacientes não metastáticos^{108; 102; 106; 101; 139}. A perda do cromossomo 14q é associada, portanto, a estadios avançados, alto risco de recorrência e diminuição da sobrevida global no cCCR esporádico. Foi demonstrado ainda que a perda do cromossomo 14 leva à diminuição dos níveis da proteína HIF1 , uma vez que seu gene (*HIF1A*) reside nesse cromossomo (14q23.2). Apesar da importância do 14q para a agressividade da doença, até o momento, estudos indicam que a perda do 14q não é associada à resposta aos agentes antiangiogênicos, especialmente sorafenibe ou bevacizumabe¹⁰⁸. Os resultados do estudo em questão estão em acordo com o perfil agressivo visto na literatura: estadios e grau histológico avançados, metástase ao diagnóstico e pior desfecho. Além disso, a região 14q22 foi a única região que abriga um gene de câncer associada com diminuição de sobrevida global.

A região 14q22.1, associada à diminuição de sobrevida global, e o gene *NIN* identificado nessa região, também foram identificados nos dados do TCGA. Não há relatos, no entanto, do papel deste gene no RCC. No presente estudo, além da associação da perda do gene *NIN* com diminuição da sobrevida global, a análise estatística demonstrou associação significativa com estadio e grau histológico avançados, além de metástase ao diagnóstico e pior desfecho. No entanto, apesar de ser um bom candidato para avaliações futuras, é importante considerar que outros genes próximos podem contribuir para o papel da região em cCCR. De forma comparativa, a região do 3p corresponde a perda de pelo menos 4 supressores tumorais. Portanto, uma avaliação cautelosa do papel desse gene deve levar em consideração os mecanismos biológicos envolvidos e, ao mesmo tempo, genes localizados próximo do gene *NIN* que talvez ainda não tenham um papel associado ao câncer até o momento.

O gene *NIN* codifica uma das proteínas importantes para a função centrossomal⁽¹⁴¹⁾, a Nineína. Trata-se de uma proteína necessária para o posicionamento e ancoragem dos microtúbulos^(142; 143). Recentemente, várias proteínas-quinases foram encontradas localizadas no centrossomo⁽¹⁴⁴⁾ tendo possíveis envolvimento em erros na segregação cromossômica, aneuploidia e instabilidade genômica^(144; 145; 146). Acredita-se que muitas quinases possam ser resultado da ligação direta ou indireta com a Nineína. E que o declínio/depleção desta proteína durante a mitose possa influenciar na regulação da função centrossomal⁽¹⁴⁷⁾, bem como interferir na segregação cromossômica durante o ciclo de divisão celular. A perturbação desses processos celulares pode induzir alterações ao longo do ciclo celular que, podem não ser suficientes para iniciar a tumorigênese, mas podem induzir o estado contínuo de instabilidade cromossômica que facilita a tumorigênese⁽¹⁴⁸⁾. Estudos futuros devem ser conduzidos a fim de esclarecer o papel do gene *NIN* na tumorigênese do ccRCC.

7.4 Integração in silico das Alterações no Número de Cópias de DNA com Perfil de Expressão Gênica

Alterações do número de cópias de DNA são conhecidas como mecanismos que podem levar à ativação de oncogenes ou a inativação de genes supressores tumorais. Uma maneira poderosa de descobrir genes-chave que desempenham papéis importantes no desenvolvimento e evolução do câncer é identificar regiões genômicas que sofrem alterações cromossômicas frequentes. O principal desafio, no entanto, é identificar os alvos de cada um desses eventos, que podem ser genes de câncer ou não. Além disso, algumas CNAs podem afetar vários alvos funcionais ao mesmo tempo. Para câncer renal, alguns genes

incluídos em regiões de CNA desempenham papéis fundamentais na tumorigênese, no prognóstico ou resposta ao tratamento¹⁴⁹.

No presente estudo, menos de 10% (n=12) das 158 regiões significativas contém alvos previamente validados no câncer. A análise de significância das regiões aponta para mais de mil genes candidatos, enquanto apenas 19 deles são reportados como genes de câncer. A fim de procurar associações entre CNAs e perfil de expressão gênica, os 19 genes foram investigados para ganho ou perda de expressão em 579 amostras clínicas de cCCR nos dados públicos do TCGA através da plataforma Oncomine. Os resultados mostram que os genes *BAP1* (3p), *TFG* (3q), *NSD1* e *FLT4* (5q), *MYB* (6q), *MLLT3* (9p) e *CDH11* (16q) apresentam alterações cromossômicas e de expressão gênica concordantes, sugerindo que estes, ou outros genes importantes responsáveis pela tumorigênese do CCR, podem estar presentes nessas regiões cromossômicas.

Ao analisar os genes contidos nas regiões significativas de alteração, a perda dos genes *MYB* e *MLLT3*, apesar de serem alterações tidas como alterações *passengers* pelos bancos de dados^{150; 151; 152; 153; 154; 155}, foram significativamente associadas à características de doença avançada. A perda do gene *FLT4*, uma alteração oncogênica, foi associada a tumores grandes. E a perda do gene *NSD1*, considerada uma alteração possivelmente *driver* pela plataforma CGI^{150; 151; 152; 153; 154; 155}, também associou-se a tumores acima de 10 centímetros e estadiamento avançado. A perda do gene *BAP1*, uma alteração oncogênica demonstrada como biomarcador para CCR, foi associado apenas com grau histológico Fuhrman 1. Alterações nos genes *TFG* e *CDH11*, apesar de apresentarem mudanças de expressão gênica concomitante, não apresentaram associações clínicas e são reportadas como alterações *passengers* pela análise *in silico*^{150; 151; 152; 153; 154; 155}

Apenas as CNAs dos genes *BAP1*, *FLT4* e *NSD1* são relatadas como alterações

oncogênicas ou *drivers* para CCR^{150; 151; 152; 153; 154; 155}. Apesar dos genes *TFG*, *MYB*, *MLLT3* e *CDH11* serem reconhecidos como genes de câncer e apresentarem mudança no número de cópias de DNA e de expressão gênica concordantes, tais alterações ainda são reportadas como eventos *passengers* pelos bancos de dados^{150; 151; 152; 153; 154; 155}. Uma vez que as CNAs são conhecidas como mecanismos possivelmente responsáveis pela ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais, genes que apresentam alterações nos padrões de expressão gênica coexistente e em conformidade com CNAs, devem ser alvos de futuras investigações e melhor compreensão dos seus efeitos.

A literatura propõe que as CNAs no CCR são suspeitas de interferir em funcionalidades gênicas, principalmente expressão^{156; 103}. Essa afirmação é bem exemplificada pela perda do 14q e a haploinsuficiência de *HIF1A*¹⁵⁷, ganho do gene *MYC* através do ganho do cromossomo 8q¹⁵⁸ e diminuição na expressão do gene *MPDZ* associada à deleção do 9p¹⁵⁹, todas associadas a piores desfechos clínicos e sobrevida no CCR, demonstrando a importância dos genes contidos nas regiões de CNAs no desenvolvimento do cCCR. Ademais, o gene *SQSTM1* (5q) foi considerado um alvo patogênico dos ganhos deste cromossomo no câncer renal. Li e colaboradores mostraram que a amplificação do 5q levou à superexpressão do oncogene *SQSTM1* em linhagens e em tumores, e foi capaz de regular outros genes supressores de câncer renal conhecidos, como o *VHL*, *TSC1* (9q34.13) e *TSC2* (16p13.3)^{119; 160}. Do mesmo modo, estudos sugerem que perda dos supressores tumorais *VHL* (3p25.3) e *BAP1* (3p21.1), a perda do supressor tumoral *CDKN2A* em 9p21.3 e o ganho do oncogene *MET* em 7q31.1, possuem papéis relevantes na tumorigênese e progressão do CCR, e potencial valor preditivo para orientar terapias-alvo^{161; 162; 163}. Para os genes identificados nas regiões de CNAs no presente estudo, por outro lado, ainda não há estudos sobre os possíveis efeitos funcionais dos mesmos mediante a ação das CNAs

no cCCR.

Considerando esses genes potencialmente importantes, foram exploradas associações clínicas que sugerem o gene *MLLT3* como um possível alvo da deleção em 9p21.3. O gene *MLLT3* (subunidade do complexo de super alongamento MLLT3) é um gene codificador de proteínas associado a doenças como leucemia mielóide aguda e leucemia aguda^{164; 165; 166}. Trata-se de um leitor de cromatina pertencente a um complexo necessário para aumentar a taxa de transcrição da RNA Polimerase II, suprimindo a pausa transitória pela Polimerase em vários locais ao longo do DNA^{167; 168; 169}. Sendo assim, os resultados do presente trabalho referentes à esta alteração, sugerem que genes localizados nesta e em outras regiões de CNA possam participar do fenótipo agressivo da doença. Estudos de validação são necessários para confirmar as associações. Análises funcionais podem contribuir para o melhor entendimento dos efeitos da perda do *MLLT3* na biologia tumoral do cCCR.

7.5 Limitações e Perspectivas Futuras

A principal limitação do presente estudo envolve o número relativamente pequeno de amostras, sendo o alto custo de tais ensaios o principal fator. Com exceção do TCGA, poucos estudos no presente momento contam com centenas de amostras de experimentos de larga escala. É importante ressaltar que o TCGA apresenta limitações quanto à disponibilidade de dados clínicos, viés em dados de sobrevida e problemas na integração de dados entre diferentes centros. No entanto, mesmo se tratando de uma doença geneticamente complexa, por apresentar uma amostragem mais homogênea, foi possível identificar alterações recorrentes e características clínicas semelhantes às descri-

tas em estudos prévios, além de apontar novos candidatos. Os achados reportados aqui também puderam demonstrar o impacto das alterações no número de cópias de DNAs em desfechos clínicos. Dessa forma, CNAs recorrentes previamente reportadas puderam ser confirmadas, demonstrando enriquecimentos distintos de tais CNAs na doença e sugerindo subtipos moleculares distintos com base na carga de CNAs que poderiam potencialmente ter diferentes valores prognósticos para os pacientes.

As amostras, em sua maioria de tumores primários, refletem pacientes de todos os estágios da doença adequados para nefrectomia. Portanto, outras aberrações cromossômicas relevantes ou relacionadas especificamente à doença metastática, ou à doença avançada tão extensa que a nefrectomia não pôde ser indicada, podem não ser completamente abordadas, podendo ter sido subestimadas neste estudo. Isto pode ser evidenciado por estudos futuros de análise genômica das lesões metastáticas em comparação com as primárias.

Finalmente, a comparação dos achados das análises de CNAs com dados TCGA levou à identificação de novas regiões e genes que podem ser bons candidatos para futuras investigações. Espera-se que este estudo estimule avaliações adicionais, com foco prospectivo e de validação. Também é de interesse uma possível aplicabilidade das CNAs na rotina clínica, bem como estudos de pesquisa básica para identificar genes específicos associados à alterações cromossômicas envolvidas na patogênese e progressão da doença em questão. Futuros estudos utilizando outros aspectos moleculares, tais como expressão gênica e análise proteica podem validar os presentes achados e elucidar alvos específicos envolvidos ou responsáveis pelo fenótipo do cCCR.

8 CONCLUSÃO

Diante dos resultados do presente trabalho, entende-se que o perfil de CNAs das amostras da população brasileira foi similar em relação aos experimentos de aCGH e exoma, e também aos dados externos do consórcio TCGA. A análise utilizando a mesma plataforma permitiu a reprodutibilidade dos resultados e as CNAs oriundas do aCGH conferiram um número maior de regiões que do exoma. Foi possível identificar várias regiões previamente descritas na literatura por caracterizar o cCCR, e também novas possíveis candidatas para estudos futuros, em especial na região do 14q.

REFERÊNCIAS

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68(6), 394–424.
- [2] Karumanchi, S. A., Merchan, J., and Sukhatme, V. P. Renal cancer: molecular mechanisms and newer therapeutic options. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* 11(1), 37–42 (2002).
- [3] Jonasch, E., Futreal, A., Davis, I., Bailey, S., Kim, W. Y., Brugarolas, J., Giaccia, A., Kurban, G., Pause, A., Frydman, J., Zurita, A., Rini, B. I., Sharma, P., Atkins, M., Walker, C., and Rathmell, W. K. State-of-the-science: An update on renal cell carcinoma. *Molecular Cancer Research.* 10(7), 859 (2012).
- [4] Linehan, W. M. Genetic basis of kidney cancer: Role of genomics for the development of disease-based therapeutics. *Genome Research.* 22(11), 2089–2100 (2012).
- [5] Jonasch, E., Gao, J., and Rathmell, W. K. Renal cell carcinoma. *BMJ (Clinical research ed.).* 349, g4797.
- [6] Ricketts, C. J., Cubas, A. A. D., Fan, H., Smith, C. C., Lang, M., Reznik, E., Bowlby, R., Gibb, E. A., Akbani, R., Beroukhi, R., Bottaro, D. P., Choueiri, T. K., Gibbs, R. A., Godwin, A. K., Haake, S., Hakimi, A. A., Henske, E. P., Hsieh, J. J., Ho, T. H., Kanchi, R. S., Krishnan, B., Kwiatkowski, D. J., Lui, W., Merino, M. J., Mills, G. B., Myers, J., Nickerson, M. L., Reuter, V. E., Schmidt, L. S., Shelley, C. S., Shen, H., Shuch, B., Signoretti, S., Srinivasan, R., Tamboli, P., Thomas, G., Vincent, B. G., Vocke, C. D., Wheeler, D. A., Yang, L., Kim, W. Y., Robertson, A. G., Caesar-Johnson, S. J., Demchok, J. A., Felau, I., Kasapi, M., Ferguson,

M. L., Hutter, C. M., Sofia, H. J., Tarnuzzer, R., Wang, Z., Yang, L., Zenklusen, J. C., Zhang, J. J., Chudamani, S., Liu, J., Lolla, L., Naresh, R., Pihl, T., Sun, Q., Wan, Y., Wu, Y., Cho, J., DeFreitas, T., Frazer, S., Gehlenborg, N., Getz, G., Heiman, D. I., Kim, J., Lawrence, M. S., Lin, P., Meier, S., Noble, M. S., Saksena, G., Voet, D., Zhang, H., Bernard, B., Chambwe, N., Dhankani, V., Knijnenburg, T., Kramer, R., Leinonen, K., Liu, Y., Miller, M., Reynolds, S., Shmulevich, I., Thorsson, V., Zhang, W., Akbani, R., Broom, B. M., Hegde, A. M., Ju, Z., Kanchi, R. S., Korkut, A., Li, J., Liang, H., Ling, S., Liu, W., Lu, Y., Mills, G. B., Ng, K.-S., Rao, A., Ryan, M., Wang, J., Weinstein, J. N., Zhang, J., Abeshouse, A., Armenia, J., Chakravarty, D., Chatila, W. K., Bruijn, I. d., Gao, J., Gross, B. E., Heins, Z. J., Kundra, R., La, K., Ladanyi, M., Luna, A., Nissan, M. G., Ochoa, A., Phillips, S. M., Reznik, E., Sanchez-Vega, F., Sander, C., Schultz, N., Sheridan, R., Sumer, S. O., Sun, Y., Taylor, B. S., Wang, J., Zhang, H., Anur, P., Peto, M., Spellman, P., Benz, C., Stuart, J. M., Wong, C. K., Yau, C., Hayes, D. N., Parker, J. S., Wilkerson, M. D., Ally, A., Balasundaram, M., Bowlby, R., Brooks, D., Carlsen, R., Chuah, E., Dhalla, N., Holt, R., Jones, S. J. M., Kasaian, K., Lee, D., Ma, Y., Marra, M. A., Mayo, M., Moore, R. A., Mungall, A. J., Mungall, K., Robertson, A. G., Sadeghi, S., Schein, J. E., Sipahimalani, P., Tam, A., Thiessen, N., Tse, K., Wong, T., Berger, A. C., Beroukhim, R., Cherniack, A. D., Cibulskis, C., Gabriel, S. B., Gao, G. F., Ha, G., Meyerson, M., Schumacher, S. E., Shih, J., Kucherlapati, M. H., Kucherlapati, R. S., Baylin, S., Cope, L., Danilova, L., Botwalla, M. S., Lai, P. H., Maglinte, D. T., Berg, D. J. V. D., Weisenberger, D. J., Auman, J. T., Balu, S., Bodenheimer, T., Fan, C., Hoadley, K. A., Hoyle, A. P., Jefferys, S. R., Jones, C. D., Meng, S., Mieczkowski, P. A., Mose, L. E., Perou,

A. H., Perou, C. M., Roach, J., Shi, Y., Simons, J. V., Skelly, T., Soloway, M. G., Tan, D., Veluvolu, U., Fan, H., Hinoue, T., Laird, P. W., Shen, H., Zhou, W., Bellair, M., Chang, K., Covington, K., Creighton, C. J., Dinh, H., Doddapaneni, H., Donehower, L. A., Drummond, J., Gibbs, R. A., Glenn, R., Hale, W., Han, Y., Hu, J., Korchina, V., Lee, S., Lewis, L., Li, W., Liu, X., Morgan, M., Morton, D., Muzny, D., Santibanez, J., Sheth, M., Shinbrot, E., Wang, L., Wang, M., Wheeler, D. A., Xi, L., Zhao, F., Hess, J., Appelbaum, E. L., Bailey, M., Cordes, M. G., Ding, L., Fronick, C. C., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Kandoth, C., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Miller, C. A., Schmidt, H. K., Wilson, R. K., Crain, D., Curley, E., Gardner, J., Lau, K., Mallery, D., Morris, S., Paulauskis, J., Penny, R., Shelton, C., Shelton, T., Sherman, M., Thompson, E., Yena, P., Bowen, J., Gastier-Foster, J. M., Gerken, M., Leraas, K. M., Lichtenberg, T. M., Ramirez, N. C., Wise, L., Zmuda, E., Corcoran, N., Costello, T., Hovens, C., Carvalho, A. L., Carvalho, A. C. d., Fregnani, J. H., Longatto-Filho, A., Reis, R. M., Scapulatempo-Neto, C., Silveira, H. C. S., Vidal, D. O., Burnette, A., Eschbacher, J., Hermes, B., Noss, A., Singh, R., Anderson, M. L., Castro, P. D., Ittmann, M., Huntsman, D., Kohl, B., Le, X., Thorp, R., Andry, C., Duffy, E. R., Lyadov, V., Paklina, O., Setdikova, G., Shabunin, A., Tavobilov, M., McPherson, C., Warnick, R., Berkowitz, R., Cramer, D., Feltmate, C., Horowitz, N., Kibel, A., Muto, M., Raut, C. P., Malykh, A., Barnholtz-Sloan, J. S., Barrett, W., Devine, K., Fulop, J., Ostrom, Q. T., Shimmel, K., Wolinsky, Y., Sloan, A. E., Rose, A. D., Giuliante, F., Goodman, M., Karlan, B. Y., Hagedorn, C. H., Eckman, J., Harr, J., Myers, J., Tucker, K., Zach, L. A., Deyarmin, B., Hu, H., Kvecher, L., Larson, C., Mural, R. J., Somiari, S., Vicha, A., Zelinka, T., Bennett, J., Iacocca, M., Rabeno, B., Swanson, P., Latour, M.,

Lacombe, L., Têtu, B., Bergeron, A., McGraw, M., Staugaitis, S. M., Chabot, J., Hibshoosh, H., Sepulveda, A., Su, T., Wang, T., Potapova, O., Voronina, O., Desjardins, L., Mariani, O., Roman-Roman, S., Sastre, X., Stern, M.-H., Cheng, F., Signoretti, S., Berchuck, A., Bigner, D., Lipp, E., Marks, J., McCall, S., McLendon, R., Secord, A., Sharp, A., Behera, M., Brat, D. J., Chen, A., Delman, K., Force, S., Khuri, F., Magliocca, K., Maithel, S., Olson, J. J., Owonikoko, T., Pickens, A., Ramalingam, S., Shin, D. M., Sica, G., Meir, E. G. V., Zhang, H., Eijckenboom, W., Gillis, A., Korpershoek, E., Looijenga, L., Oosterhuis, W., Stoop, H., Kessel, K. E. v., Zwarthoff, E. C., Calatuzzolo, C., Cuppini, L., Cuzzubbo, S., DiMeco, F., Finocchiaro, G., Mattei, L., Perin, A., Pollo, B., Chen, C., Houck, J., Lohavanichbutr, P., Hartmann, A., Stoehr, C., Stoehr, R., Taubert, H., Wach, S., Wullich, B., Kycler, W., Murawa, D., Wiznerowicz, M., Chung, K., Edenfield, W. J., Martin, J., Baudin, E., Bublely, G., Bueno, R., Rienzo, A. D., Richards, W. G., Kalkanis, S., Mikkelsen, T., Noushmehr, H., Scarpace, L., Girard, N., Aymerich, M., Campo, E., Giné, E., Guillermo, A. L., Bang, N. V., Hanh, P. T., Phu, B. D., Tang, Y., Colman, H., Evason, K., Dottino, P. R., Martignetti, J. A., Gabra, H., Juhl, H., Akeredolu, T., Stepa, S., Hoon, D., Ahn, K., Kang, K. J., Beuschlein, F., Breggia, A., Birrer, M., Bell, D., Borad, M., Bryce, A. H., Castle, E., Chandan, V., Cheville, J., Copland, J. A., Farnell, M., Flotte, T., Giama, N., Ho, T., Kendrick, M., Kocher, J.-P., Kopp, K., Moser, C., Nagorney, D., O'Brien, D., O'Neill, B. P., Patel, T., Petersen, G., Que, F., Rivera, M., Roberts, L., Smallridge, R., Smyrk, T., Stanton, M., Thompson, R. H., Torbenson, M., Yang, J. D., Zhang, L., Brimo, F., Ajani, J. A., Gonzalez, A. M. A., Behrens, C., Bondaruk, J., Broaddus, R., Czerniak, B., Esmaeli, B., Fujimoto, J., Gershenwald, J., Guo, C., Lazar, A. J., Logothetis, C.,

Meric-Bernstam, F., Moran, C., Ramondetta, L., Rice, D., Sood, A., Tamboli, P., Thompson, T., Troncso, P., Tsao, A., Wistuba, I., Carter, C., Haydu, L., Hersey, P., Jakrot, V., Kakavand, H., Kefford, R., Lee, K., Long, G., Mann, G., Quinn, M., Saw, R., Scolyer, R., Shannon, K., Spillane, A., Stretch, O., Synott, M., Thompson, J., Wilmott, J., Al-Ahmadie, H., Chan, T. A., Ghossein, R., Gopalan, A., Levine, D. A., Reuter, V., Singer, S., Singh, B., Tien, N. V., Broudy, T., Mirsaidi, C., Nair, P., Drwiega, P., Miller, J., Smith, J., Zaren, H., Park, J.-W., Hung, N. P., Kebebew, E., Linehan, W. M., Metwalli, A. R., Pacak, K., Pinto, P. A., Schiffman, M., Schmidt, L. S., Vocke, C. D., Wentzensen, N., Worrell, R., Yang, H., Moncrieff, M., Goparaju, C., Melamed, J., Pass, H., Botnariuc, N., Caraman, I., Cernat, M., Chemencedji, I., Clipca, A., Doruc, S., Gorincioi, G., Mura, S., Pirtac, M., Stancul, I., Tcaciuc, D., Albert, M., Alexopoulou, I., Arnaout, A., Bartlett, J., Engel, J., Gilbert, S., Parfitt, J., Sekhon, H., Thomas, G., Rassl, D. M., Rintoul, R. C., Bifulco, C., Tamakawa, R., Urba, W., Hayward, N., Timmers, H., Antenucci, A., Facciolo, F., Grazi, G., Marino, M., Merola, R., Krijger, R. d., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Piché, A., Chevalier, S., McKercher, G., Birsoy, K., Barnett, G., Brewer, C., Farver, C., Naska, T., Pennell, N. A., Raymond, D., Schilero, C., Smolenski, K., Williams, F., Morrison, C., Borgia, J. A., Liptay, M. J., Pool, M., Seder, C. W., Junker, K., Omberg, L., Dinkin, M., Manikhas, G., Alvaro, D., Bragazzi, M. C., Cardinale, V., Carpino, G., Gaudio, E., Chesla, D., Cottingham, S., Dubina, M., Moiseenko, F., Dhanasekaran, R., Becker, K.-F., Janssen, K.-P., Slotta-Huspenina, J., Abdel-Rahman, M. H., Aziz, D., Bell, S., Cebulla, C. M., Davis, A., Duell, R., Elder, J. B., Hilty, J., Kumar, B., Lang, J., Lehman, N. L., Mandt, R., Nguyen, P., Pilarski, R., Rai, K., Schoenfield, L., Senecal, K., Wakely, P., Hansen, P., Lechan,

R., Powers, J., Tischler, A., Grizzle, W. E., Sexton, K. C., Kastl, A., Henderson, J., Porten, S., Waldmann, J., Fassnacht, M., Asa, S. L., Schadendorf, D., Couce, M., Graefen, M., Huland, H., Sauter, G., Schlomm, T., Simon, R., Tennstedt, P., Olabode, O., Nelson, M., Bathe, O., Carroll, P. R., Chan, J. M., Disaia, P., Glenn, P., Kelley, R. K., Landen, C. N., Phillips, J., Prados, M., Simko, J., Smith-McCune, K., VandenBerg, S., Roggin, K., Fehrenbach, A., Kandler, A., Sifri, S., Steele, R., Jimeno, A., Carey, F., Forgie, I., Mannelli, M., Carney, M., Hernandez, B., Campos, B., Herold-Mende, C., Jungk, C., Unterberg, A., Deimling, A. v., Bossler, A., Galbraith, J., Jacobus, L., Knudson, M., Knutson, T., Ma, D., Milhem, M., Sigmund, R., Godwin, A. K., Madan, R., Rosenthal, H. G., Adebamowo, C., Adebamowo, S. N., Boussioutas, A., Beer, D., Giordano, T., Mes-Masson, A.-M., Saad, F., Bocklage, T., Landrum, L., Mannel, R., Moore, K., Moxley, K., Postier, R., Walker, J., Zuna, R., Feldman, M., Valdivieso, F., Dhir, R., Luketich, J., Pinero, E. M. M., Quintero-Aguilo, M., Carlotti, C. G., Santos, J. S. D., Kemp, R., Sankarankuty, A., Tirapelli, D., Catto, J., Agnew, K., Swisher, E., Creaney, J., Robinson, B., Shelley, C. S., Godwin, E. M., Kendall, S., Shipman, C., Bradford, C., Carey, T., Haddad, A., Moyer, J., Peterson, L., Prince, M., Rozek, L., Wolf, G., Bowman, R., Fong, K. M., Yang, I., Korst, R., Rathmell, W. K., Fantacone-Campbell, J. L., Hooke, J. A., Kovatich, A. J., Shriver, C. D., DiPersio, J., Drake, B., Govindan, R., Heath, S., Ley, T., Tine, B. V., Westervelt, P., Rubin, M. A., Lee, J. I., Aredes, N. D., Mariamidze, A., Spellman, P. T., Rathmell, W. K., and Linehan, W. M. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports*. 23(12), 3698 (2018).

- [7] Rini, B. I., Campbell, S. C., and Escudier, B. Renal cell carcinoma. *Lancet (London,*

- England*). 373(9669), 1119–1132 (2009).
- [8] Znaor, A., Lortet-Tieulent, J., Laversanne, M., Jemal, A., and Bray, F. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *European Urology*. 67(3), 519–530 (2015).
- [9] Lopez-Beltran, A., Carrasco, J. C., Cheng, L., Scarpelli, M., Kirkali, Z., and Montironi, R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association*. 16(5), 432–443 (2009).
- [10] Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 66(1), 7–30 (2016).
- [11] Moch, H., Cubilla, A. L., Humphrey, P. A., Reuter, V. E., and Ulbright, T. M. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology*. 70(1), 93–105 (2016).
- [12] Srigley, J. R., Delahunt, B., Eble, J. N., Egevad, L., Epstein, J. I., Grignon, D., Hes, O., Moch, H., Montironi, R., Tickoo, S. K., Zhou, M., and Argani, P. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia:. *The American Journal of Surgical Pathology*. 37(10), 1469–1489 (2013).
- [13] Shaw, G. The silent disease. *Nature*. 537, S98–S99 (2016).
- [14] Zbar, B., Brauch, H., Talmadge, C., and Linehan, M. Loss of alleles of loci on the

short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature*. 327(6124), 721–724 (1987).

- [15] Presti, J. C., Rao, P. H., Chen, Q., Reuter, V. E., Li, F. P., Fair, W. R., and Jhanwar, S. C. Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Research*. 51(5), 1544–1552 (1991).
- [16] Beroukhi, R., Brunet, J.-P., Di Napoli, A., Mertz, K. D., Seeley, A., Pires, M. M., Linhart, D., Worrell, R. A., Moch, H., Rubin, M. A., Sellers, W. R., Meyerson, M., Linehan, W. M., Kaelin, W. G., and Signoretti, S. Patterns of gene expression and copy-number alterations in VHL disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer research*. 69(11), 4674–4681 (2009).
- [17] Thorstenson, A., Bergman, M., Scherman-Plogell, A.-H., Hosseinnia, S., Ljungberg, B., Adolfsson, J., and Lundstam, S. Tumour characteristics and surgical treatment of renal cell carcinoma in Sweden 2005–2010: a population-based study from the National Swedish Kidney Cancer Register. *Scandinavian Journal of Urology*. 48(3), 231–238 (2014).
- [18] Marconi, L., Dabestani, S., Lam, T. B., Hofmann, F., Stewart, F., Norrie, J., Bex, A., Bensalah, K., Canfield, S. E., Hora, M., Kuczyk, M. A., Merseburger, A. S., Mulders, P. F. A., Powles, T., Staehler, M., Ljungberg, B., and Volpe, A. Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy. *European Urology*. 69(4), 660–673 (2016).
- [19] Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., Byrd, D. R., and Winchester, D. P. 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: a cancer journal for clinicians*. 67(2), 93–99 (2017).
- [20] Motzer, R. J. and Basch, E. Targeted drugs for metastatic renal cell carcinoma. *Lancet (London, England)*. 370(9605), 2071–2073 (2007).
- [21] Choueiri, T. K. and Motzer, R. J. Systemic Therapy for Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. 376(4), 354–366 (2017).
- [22] Middleton, R. G. Surgery for metastatic renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*. 97(6), 973–977 (1967).
- [23] Inamura, K. Renal Cell Tumors: Understanding Their Molecular Pathological Epidemiology and the 2016 WHO Classification. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(10), 2195 (2017).
- [24] Joseph, R. W., Kapur, P., Serie, D. J., Parasramka, M., Ho, T. H., Cheville, J. C., Frenkel, E., Parker, A. S., and Brugarolas, J. Clear Cell Renal Cell Carcinoma Subtypes Identified by BAP1 and PBRM1 Expression. *The Journal of urology*. 195(1), 180–187 January (2016).
- [25] Rini, B. I., Escudier, B., Martini, J.-F., Magheli, A., Svedman, C., Lopatin, M., Knezevic, D., Goddard, A. D., Febbo, P. G., Li, R., Lin, X., Valota, O., Staehler, M., Motzer, R. J., and Ravaud, A. Validation of the 16-Gene Recurrence Score in Patients with Locoregional, High-Risk Renal Cell Carcinoma from a Phase III Trial of Adjuvant Sunitinib. *Clinical Cancer Research*. 24(18), 4407–4415 (2018).
- [26] Blom, J. H. M., van Poppel, H., Maréchal, J. M., Jacqmin, D., Schröder, F. H., de Prijck, L., and Sylvester, R. Radical Nephrectomy with and without Lymph-

- Node Dissection: Final Results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Randomized Phase 3 Trial 30881. *European Urology*. 55(1), 28–34 (2009).
- [27] Wood, E. L., Adibi, M., Qiao, W., Brandt, J., Zhang, M., Tamboli, P., Matin, S. F., Wood, C. G., and Karam, J. A. Local Tumor Bed Recurrence Following Partial Nephrectomy in Patients with Small Renal Masses. *The Journal of Urology*. 199(2), 393–400 (2018).
- [28] Janowitz, T., Welsh, S. J., Zaki, K., Mulders, P., and Eisen, T. Adjuvant therapy in renal cell carcinoma-past, present, and future. *Seminars in Oncology*. 40(4), 482–491 (2013).
- [29] Motzer, R. J., Jonasch, E., Agarwal, N., Bhayani, S., Bro, W. P., Chang, S. S., Choueiri, T. K., Costello, B. A., Derweesh, I. H., Fishman, M., Gallagher, T. H., Gore, J. L., Hancock, S. L., Harrison, M. R., Kim, W., Kyriakopoulos, C., LaGrange, C., Lam, E. T., Lau, C., Michaelson, M. D., Olencki, T., Pierorazio, P. M., Plimack, E. R., Redman, B. G., Shuch, B., Somer, B., Sonpavde, G., Sosman, J., Dwyer, M., and Kumar, R. Kidney Cancer, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 15(6), 804–834 (2017).
- [30] Minasian, L. M., Motzer, R. J., Gluck, L., Mazumdar, M., Vlamis, V., and Krown, S. E. Interferon alfa-2a in advanced renal cell carcinoma: treatment results and survival in 159 patients with long-term follow-up. *Journal of Clinical Oncology*. 11(7), 1368–1375 (1993).
- [31] Fyfe, G. A., Fisher, R. I., Rosenberg, S. A., Sznol, M., Parkinson, D. R., and

- Louie, A. C. Long-term response data for 255 patients with metastatic renal cell carcinoma treated with high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 14(8), 2410–2411 (1996).
- [32] Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A. A., Rolland, F., Demkow, T., Hutson, T. E., Gore, M., Freeman, S., Schwartz, B., Shan, M., Simantov, R., and Bukowski, R. M. Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 356(2) (2007).
- [33] Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Rixe, O., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S. T., Chen, I., Bycott, P. W., Baum, C. M., and Figlin, R. A. Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 356(2), 115–124 (2007).
- [34] Escudier, B., Pluzanska, A., Koralewski, P., Ravaud, A., Bracarda, S., Szczylik, C., Chevreau, C., Filipek, M., Melichar, B., Bajetta, E., Gorbunova, V., Bay, J.-O., Bodrogi, I., Jagiello-Gruszfeld, A., and Moore, N. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *The Lancet*. 370(9605) (2007).
- [35] Sternberg, C. N., Davis, I. D., Mardiak, J., Szczylik, C., Lee, E., Wagstaff, J., Barrios, C. H., Salman, P., Gladkov, O. A., Kavina, A., Zarbá, J. J., Chen, M., McCann, L., Pandite, L., Roychowdhury, D. F., and Hawkins, R. E. Pazopanib in Locally Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 28(6), 1061–1068 (2010).

- [36] Rini, B. I., Escudier, B., Tomczak, P., Kaprin, A., Szczylik, C., Hutson, T. E., Michaelson, M. D., Gorbunova, V. A., Gore, M. E., Rusakov, I. G., Negrier, S., Ou, Y.-C., Castellano, D., Lim, H. Y., Uemura, H., Tarazi, J., Cella, D., Chen, C., Rosbrook, B., Kim, S., and Motzer, R. J. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *The Lancet*. 378(9807), 1931–1939 (2011).
- [37] Motzer, R. J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T. E., Porta, C., Bracarda, S., Grünwald, V., Thompson, J. A., Figlin, R. A., Hollaender, N., Urbanowitz, G., Berg, W. J., Kay, A., Lebwohl, D., and Ravaud, A. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *The Lancet*. 372(9637), 449–456 (2008).
- [38] Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., Kovacevic, Z., Lesovoy, V., Schmidt-Wolf, I. G., Barbarash, O., Gokmen, E., O’Toole, T., Lustgarten, S., Moore, L., and Motzer, R. J. Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 356(22), 2271–2281 (2007).
- [39] Ljungberg, B., Bensalah, K., Canfield, S., Dabestani, S., Hofmann, F., Hora, M., Kuczyk, M. A., Lam, T., Marconi, L., Merseburger, A. S., Mulders, P., Powles, T., Staehler, M., Volpe, A., and Bex, A. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *European Urology*. 67(5), 913–924 (2015).
- [40] Powles, T., Albiges, L., Staehler, M., Bensalah, K., Dabestani, S., Giles, R. H., Hofmann, F., Hora, M., Kuczyk, M. A., Lam, T. B., Marconi, L., Merseburger,

- A. S., Fernández-Pello, S., Tahbaz, R., Volpe, A., Ljungberg, B., and Bex, A. Updated European Association of Urology Guidelines: Recommendations for the Treatment of First-line Metastatic Clear Cell Renal Cancer. *European Urology*. 73(3), 311–315 (2018).
- [41] Motzer, R. J., Tannir, N. M., McDermott, D. F., Arén Frontera, O., Melichar, B., Choueiri, T. K., Plimack, E. R., Barthélémy, P., Porta, C., George, S., Powles, T., Donskov, F., Neiman, V., Kollmannsberger, C. K., Salman, P., Gurney, H., Hawkins, R., Ravaud, A., Grimm, M.-O., Bracarda, S., Barrios, C. H., Tomita, Y., Castellano, D., Rini, B. I., Chen, A. C., Mekan, S., McHenry, M. B., Wind-Rotolo, M., Doan, J., Sharma, P., Hammers, H. J., Escudier, B., and CheckMate 214 Investigators. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. 378(14), 1277–1290 (2018).
- [42] Cohen, H. T. and McGovern, F. J. Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 353(23), 2477–2490 (2005).
- [43] Schottenfeld, D. and Jr, J. F. F. *Cancer Epidemiology and Prevention*. Oxford University Press, (2006).
- [44] Benichou, J., Chow, W. H., McLaughlin, J. K., Mandel, J. S., and Fraumeni, J. F. Population attributable risk of renal cell cancer in Minnesota. *American Journal of Epidemiology*. 148(5), 424–430 (1998).
- [45] Yuan, J. M., Castela, J. E., Gago-Dominguez, M., Ross, R. K., and Yu, M. C. Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 77(9), 1508–1513 (1998).

- [46] Aviner, S. Re: The epidemiology of renal cell carcinoma: L. Lipworth, R. E. Tarone and J. K. McLaughlin. *J Urol* 2006; 176: 2353-2358. *The Journal of Urology*. 178(3 Pt 1), 1120–1121 (2007).
- [47] Karami, S., Schwartz, K., Purdue, M. P., Davis, F. G., Ruterbusch, J. J., Munuo, S. S., Wacholder, S., Graubard, B. I., Colt, J. S., and Chow, W.-H. Family history of cancer and renal cell cancer risk in Caucasians and African Americans. *British Journal of Cancer*. 102(11), 1676–1680 (2010).
- [48] Wild, C. P., WEIDERPASS, E., and STEWART, B. W. *World Cancer Report*. International Agency for Research on Cancer 2020, (2020). Lyon, 2020.
- [49] Sims, J. N., Yedjou, C. G., Abugri, D., Payton, M., Turner, T., Miele, L., and Tchounwou, P. B. Racial Disparities and Preventive Measures to Renal Cell Carcinoma. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15(6) (2018).
- [50] Latif, F., Tory, K., Gnarra, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., and Geil, L. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science (New York, N.Y.)*. 260(5112), 1317–1320 (1993).
- [51] Schmidt, L., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., Allikmets, R., Chidambaram, A., Bergerheim, U. R., Feltis, J. T., Casadevall, C., Zamarron, A., Bernues, M., Richard, S., Lips, C. J., Walther, M. M., Tsui, L. C., Geil, L., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Lipan, J., Slife, L., Brauch, H., Decker, J., Niehans, G., Hughson, M. D., Moch, H., Storkel, S., Lerman, M. I., Linehan, W. M., and Zbar, B. Germline and somatic

- mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature Genetics*. 16(1), 68–73 (1997).
- [52] Nickerson, M. L., Warren, M. B., Toro, J. R., Matrosova, V., Glenn, G., Turner, M. L., Duray, P., Merino, M., Choyke, P., Pavlovich, C. P., Sharma, N., Walther, M., Munroe, D., Hill, R., Maher, E., Greenberg, C., Lerman, M. I., Linehan, W. M., Zbar, B., and Schmidt, L. S. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Cancer Cell*. 2(2), 157–164 (2002).
- [53] Launonen, V., Vierimaa, O., Kiuru, M., Isola, J., Roth, S., Pukkala, E., Sistonen, P., Herva, R., and Aaltonen, L. A. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(6), 3387–3392 (2001).
- [54] Vanharanta, S., Buchta, M., McWhinney, S. R., Virta, S. K., Peçzkowska, M., Morrison, C. D., Lehtonen, R., Januszewicz, A., Järvinen, H., Juhola, M., Mekklin, J.-P., Pukkala, E., Herva, R., Kiuru, M., Nupponen, N. N., Aaltonen, L. A., Neumann, H. P. H., and Eng, C. Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *American Journal of Human Genetics*. 74(1), 153–159 (2004).
- [55] van Slegtenhorst, M., de Hoogt, R., Hermans, C., Nellist, M., Janssen, B., Verhoef, S., Lindhout, D., van den Ouweland, A., Halley, D., Young, J., Burley, M., Jeremiah, S., Woodward, K., Nahmias, J., Fox, M., Ekong, R., Osborne, J., Wolfe, J., Povey, S., Snell, R. G., Cheadle, J. P., Jones, A. C., Tachataki, M., Ravine, D., Sampson, J. R., Reeve, M. P., Richardson, P., Wilmer, F., Munro, C., Hawkins, T. L., Sepp,

- T., Ali, J. B., Ward, S., Green, A. J., Yates, J. R., Kwiatkowska, J., Henske, E. P., Short, M. P., Haines, J. H., Jozwiak, S., and Kwiatkowski, D. J. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science (New York, N.Y.)*. 277(5327), 805–808 (1997).
- [56] Popova, T., Hebert, L., Jacquemin, V., Gad, S., Caux-Moncoutier, V., Dubois-d'Enghien, C., Richaudeau, B., Renaudin, X., Sellers, J., Nicolas, A., Sastre-Garau, X., Desjardins, L., Gyapay, G., Raynal, V., Sinilnikova, O. M., Andrieu, N., Manié, E., de Pauw, A., Gesta, P., Bonadona, V., Maugard, C. M., Penet, C., Avril, M.-F., Barillot, E., Cabaret, O., Delattre, O., Richard, S., Caron, O., Benfodda, M., Hu, H.-H., Soufir, N., Bressac-de Paillerets, B., Stoppa-Lyonnet, D., and Stern, M.-H. Germline BAP1 mutations predispose to renal cell carcinomas. *American Journal of Human Genetics*. 92(6), 974–980 (2013).
- [57] Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de Lichy, M., Bille, K., Dessen, P., d'Hayer, B., Mohamdi, H., Remenieras, A., Maubec, E., de la Fouchardière, A., Molinié, V., Vabres, P., Dalle, S., Poulalhon, N., Martin-Denavit, T., Thomas, L., Andry-Benzaquen, P., Dupin, N., Boitier, F., Rossi, A., Perrot, J.-L., Labeille, B., Robert, C., Escudier, B., Caron, O., Brugières, L., Saule, S., Gardie, B., Gad, S., Richard, S., Couturier, J., Teh, B. T., Ghiorzo, P., Pastorino, L., Puig, S., Badenas, C., Olsson, H., Ingvar, C., Rouleau, E., Lidereau, R., Bahadoran, P., Vielh, P., Corda, E., Blanché, H., Zelenika, D., Galan, P., French Familial Melanoma Study Group, Aubin, F., Bachollet, B., Becuwe, C., Berthet, P., Bignon, Y. J., Bonadona, V., Bonafe, J.-L., Bonnet-Dupeyron, M.-N., Cambazard, F., Chevrant-Breton, J., Coupier, I., Dalac, S., Demange, L., d'Incan, M., Dugast, C., Faivre, L., Vincent-Fétita, L., Gauthier-Villars, M., Gilbert, B., Grange, F., Grob, J.-J.,

- Humbert, P., Janin, N., Joly, P., Kerob, D., Lasset, C., Leroux, D., Levang, J., Limacher, J.-M., Livideanu, C., Longy, M., Lortholary, A., Stoppa-Lyonnet, D., Mansard, S., Mansuy, L., Marrou, K., Matéus, C., Maugard, C., Meyer, N., Nogues, C., Souteyrand, P., Venat-Bouvet, L., Zattara, H., Chaudru, V., Lenoir, G. M., Lathrop, M., Davidson, I., Avril, M.-F., Demenais, F., Ballotti, R., and Bressac-de Paillerets, B. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature*. 480(7375), 94–98 (2011).
- [58] Hung, R. J., Moore, L., Boffetta, P., Feng, B.-J., Toro, J. R., Rothman, N., Zaridze, D., Navratilova, M., Bencko, V., Janout, V., Kollarova, H., Szeszenia-Dabrowska, N., Mates, D., Chow, W.-H., and Brennan, P. Family History and the Risk of Kidney Cancer: a Multicenter Case-control Study in Central Europe. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 16(6), 1287–1290 (2007).
- [59] Maher, E. R., Iselius, L., Yates, J. R., Littler, M., Benjamin, C., Harris, R., Sampson, J., Williams, A., Ferguson-Smith, M. A., and Morton, N. Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *Journal of Medical Genetics*. 28(7), 443–447 (1991).
- [60] Young, A. C., Craven, R. A., Cohen, D., Taylor, C., Booth, C., Harnden, P., Cairns, D. A., Astuti, D., Gregory, W., Maher, E. R., Knowles, M. A., Joyce, A., Selby, P. J., and Banks, R. E. Analysis of VHL Gene Alterations and their Relationship to Clinical Parameters in Sporadic Conventional Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 15(24), 7582–7592 (2009).
- [61] Hakimi, A. A., Furberg, H., Zabor, E. C., Jacobsen, A., Schultz, N., Ciriello, G., Mikklineni, N., Fiegoli, B., Kim, P. H., Voss, M. H., Shen, H., Laird, P. W., Sander,

- C., Reuter, V. E., Motzer, R. J., Hsieh, J. J., and Russo, P. An Epidemiologic and Genomic Investigation Into the Obesity Paradox in Renal Cell Carcinoma. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 105(24), 1862–1870 (2013).
- [62] Chen, F., Zhang, Y., Şenbabaoğlu, Y., Ciriello, G., Yang, L., Reznik, E., Shuch, B., Micevic, G., Velasco, G. D., Shinbrot, E., Noble, M. S., Lu, Y., Covington, K. R., Xi, L., Drummond, J. A., Muzny, D., Kang, H., Lee, J., Tamboli, P., Reuter, V., Shelley, C. S., Kaiparettu, B. A., Bottaro, D. P., Godwin, A. K., Gibbs, R. A., Getz, G., Kucherlapati, R., Park, P. J., Sander, C., Henske, E. P., Zhou, J. H., Kwiatkowski, D. J., Ho, T. H., Choueiri, T. K., Hsieh, J. J., Akbani, R., Mills, G. B., Hakimi, A. A., Wheeler, D. A., and Creighton, C. J. Multilevel Genomics-based Taxonomy of Renal Cell Carcinoma. *Cell reports*. 14(10), 2476 (2016).
- [63] Lindgren, D., Sjölund, J., and Axelson, H. Tracing Renal Cell Carcinomas back to the Nephron. *Trends in Cancer*. 4(7), 472–484 (2018).
- [64] Knudson, A. G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 68(4), 820–823 (1971).
- [65] Kumar, V., Abbas, A., and Aster, J. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease - 9th Edition, (2014).
- [66] Gossage, L. and Eisen, T. Alterations in VHL as potential biomarkers in renal-cell carcinoma. *Nature Reviews. Clinical Oncology*. 7(5), 277–288 (2010).
- [67] Chen, K., Chen, S., Huang, C., Cheng, H., and Zhou, R. TCTP increases stability of hypoxia-inducible factor 1 by interaction with and degradation of the tumour suppressor VHL. *Biology of the Cell*. 105(5), 208–218 (2013).

- [68] Chen, F., Kishida, T., Yao, M., Hustad, T., Glavac, D., Dean, M., Gnarr, J. R., Orcutt, M. L., Duh, F. M., and Glenn, G. Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Human Mutation*. 5(1), 66–75 (1995).
- [69] Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., and Kaelin, W. G. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nature Medicine*. 1(8), 822–826 (1995).
- [70] Yao, M., Yoshida, M., Kishida, T., Nakaigawa, N., Baba, M., Kobayashi, K., Miura, T., Moriyama, M., Nagashima, Y., Nakatani, Y., Kubota, Y., and Kondo, K.-I. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 94(20), 1569–1575 (2002).
- [71] Akhtar, M., Al-Bozom, I. A., and Al Hussain, T. Molecular and Metabolic Basis of Clear Cell Carcinoma of the Kidney. *Advances in Anatomic Pathology*. 25(3), 189–196 (2018).
- [72] Brauch, H., Weirich, G., Brieger, J., Glavac, D., Rödl, H., Eichinger, M., Feurer, M., Weidt, E., Puranakanittha, C., Neuhaus, C., Pomer, S., Brenner, W., Schirmacher, P., Störkel, S., Rotter, M., Masera, A., Gugeler, N., and Decker, H. J. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Research*. 60(7), 1942–1948 (2000).
- [73] Hamano, K., Esumi, M., Igarashi, H., Chino, K., Mochida, J., ISHIDA And, H., and Okada, K. Biallelic inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor

- gene in sporadic renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*. 167(2 Pt 1), 713–717 (2002).
- [74] Schraml, P., Struckmann, K., Hatz, F., Sonnet, S., Kully, C., Gasser, T., Sauter, G., Mihatsch, M. J., and Moch, H. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *The Journal of Pathology*. 196(2), 186–193 (2002).
- [75] Linehan, W. M., Srinivasan, R., and Schmidt, L. S. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nature reviews. Urology*. 7(5), 277–285 (2010).
- [76] Mandriota, S. J., Turner, K. J., Davies, D. R., Murray, P. G., Morgan, N. V., Sowter, H. M., Wykoff, C. C., Maher, E. R., Harris, A. L., Ratcliffe, P. J., and Maxwell, P. H. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell*. 1(5), 459–468 (2002).
- [77] Béroud, C., Collod-Béroud, G., Boileau, C., Soussi, T., and Junien, C. UMD (Universal mutation database): a generic software to build and analyze locus-specific databases. *Human Mutation*. 15(1), 86–94 (2000).
- [78] Zack, T. I., Schumacher, S. E., Carter, S. L., Cherniack, A. D., Saksena, G., Tabak, B., Lawrence, M. S., Zhang, C.-Z., Wala, J., Mermel, C. H., Sougnez, C., Gabriel, S. B., Hernandez, B., Shen, H., Laird, P. W., Getz, G., Meyerson, M., and Beroukhim, R. Pan-cancer patterns of somatic copy-number alteration. *Nature genetics*. 45(10), 1134–1140 (2013).
- [79] Beroukhim, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J., Urashima, M., Mc Henry, K. T., Pinchback,

- R. M., Ligon, A. H., Cho, Y.-J., Haery, L., Greulich, H., Reich, M., Winckler, W., Lawrence, M. S., Weir, B. A., Tanaka, K. E., Chiang, D. Y., Bass, A. J., Loo, A., Hoffman, C., Prensner, J., Liefeld, T., Gao, Q., Yecies, D., Signoretti, S., Maher, E., Kaye, F. J., Sasaki, H., Tepper, J. E., Fletcher, J. A., Tabernero, J., Baselga, J., Tsao, M.-S., DeMichelis, F., Rubin, M. A., Janne, P. A., Daly, M. J., Nucera, C., Levine, R. L., Ebert, B. L., Gabriel, S., Rustgi, A. K., Antonescu, C. R., Ladanyi, M., Letai, A., Garraway, L. A., Loda, M., Beer, D. G., True, L. D., Okamoto, A., Pomeroy, S. L., Singer, S., Golub, T. R., Lander, E. S., Getz, G., Sellers, W. R., and Meyerson, M. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 463(7283), 899–905 (2010).
- [80] Heitzer, E., Ulz, P., Geigl, J. B., and Speicher, M. R. Non-invasive detection of genome-wide somatic copy number alterations by liquid biopsies. *Molecular Oncology*. 10(3), 494–502 (2016).
- [81] Tschaharganeh, D. F., Bosbach, B., and Lowe, S. W. Coordinated Tumor Suppression by Chromosome 8p. *Cancer cell*. 29(5), 617–619 (2016).
- [82] Liu, Y., Chen, C., Xu, Z., Scuoppo, C., Rillaan, C. D., Gao, J., Spitzer, B., Bosbach, B., Kasthuber, E. R., Baslan, T., Ackermann, S., Cheng, L., Wang, Q., Niu, T., Schultz, N., Levine, R. L., Mills, A. A., and Lowe, S. W. Deletions linked to TP53 loss drive cancer through p53-independent mechanisms. *Nature*. 531(7595), 471–475 (2016).
- [83] Liang, L., Fang, J.-Y., and Xu, J. Gastric cancer and gene copy number variation: emerging cancer drivers for targeted therapy. *Oncogene*. 35(12), 1475–1482 (2016).
- [84] Wang, H., Liang, L., Fang, J.-Y., and Xu, J. Somatic gene copy number alterations

- in colorectal cancer: new quest for cancer drivers and biomarkers. *Oncogene*. 35(16), 2011–2019 (2016).
- [85] Nibourel, O., Guihard, S., Roumier, C., Pottier, N., Terre, C., Paquet, A., Peyrouze, P., Geffroy, S., Quentin, S., Alberdi, A., Abdelali, R. B., Renneville, A., Demay, C., Celli-Lebras, K., Barbry, P., Quesnel, B., Castaigne, S., Dombret, H., Soulier, J., Preudhomme, C., and Cheok, M. H. Copy-number analysis identified new prognostic marker in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 31(3), 555–564 (2017).
- [86] Hieronymus, H., Murali, R., Tin, A., Yadav, K., Abida, W., Moller, H., Berney, D., Scher, H., Carver, B., Scardino, P., Schultz, N., Taylor, B., Vickers, A., Cuzick, J., and Sawyers, C. L. Tumor copy number alteration burden is a pan-cancer prognostic factor associated with recurrence and death. *eLife*. 7, e37294 (2018).
- [87] Guo, Y., Sheng, Q., Samuels, D. C., Lehmann, B., Bauer, J. A., Pietenpol, J., and Shyr, Y. Comparative Study of Exome Copy Number Variation Estimation Tools Using Array Comparative Genomic Hybridization as Control. *BioMed Research International*. 2013 (2013).
- [88] Pinto, D., Darvishi, K., Shi, X., Rajan, D., Rigler, D., Fitzgerald, T., Lionel, A. C., Thiruvahindrapuram, B., Macdonald, J. R., Mills, R., Prasad, A., Noonan, K., Gribble, S., Prigmore, E., Donahoe, P. K., Smith, R. S., Park, J. H., Hurles, M. E., Carter, N. P., Lee, C., Scherer, S. W., and Feuk, L. Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. *Nature Biotechnology*. 29(6), 512–520 (2011).
- [89] Krumm, N., Sudmant, P. H., Ko, A., O’Roak, B. J., Malig, M., Coe, B. P., NHLBI Exome Sequencing Project, Quinlan, A. R., Nickerson, D. A., and Eichler, E. E.

- Copy number variation detection and genotyping from exome sequence data. *Genome Research*. 22(8), 1525–1532 (2012).
- [90] Fromer, M., Moran, J. L., Chambert, K., Banks, E., Bergen, S. E., Ruderfer, D. M., Handsaker, R. E., McCarroll, S. A., O’Donovan, M. C., Owen, M. J., Kirov, G., Sullivan, P. F., Hultman, C. M., Sklar, P., and Purcell, S. M. Discovery and statistical genotyping of copy-number variation from whole-exome sequencing depth. *American Journal of Human Genetics*. 91(4), 597–607 (2012).
- [91] Fan, J., Wang, L., Wang, H., Ma, M., Wang, S., Liu, Z., Xu, G., Zhang, J., Cram, D. S., and Yao, Y. The clinical utility of next-generation sequencing for identifying chromosome disease syndromes in human embryos. *Reproductive Biomedicine Online*. 31(1), 62–70 (2015).
- [92] Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Döhner, H., Cremer, T., and Lichter, P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 20(4), 399–407 (1997).
- [93] Tonon, G., Wong, K.-K., Maulik, G., Brennan, C., Feng, B., Zhang, Y., Khattry, D. B., Protopopov, A., You, M. J., Aguirre, A. J., Martin, E. S., Yang, Z., Ji, H., Chin, L., and DePinho, R. A. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(27), 9625–9630 (2005).
- [94] Hayes, J. L., Tzika, A., Thygesen, H., Berri, S., Wood, H. M., Hewitt, S., Pendlebury, M., Coates, A., Willoughby, L., Watson, C. M., Rabbitts, P., Roberts, P., and Taylor, G. R. Diagnosis of copy number variation by Illumina next genera-

- tion sequencing is comparable in performance to oligonucleotide array comparative genomic hybridisation. *Genomics*. 102(3), 174–181 (2013).
- [95] Liu, B., Morrison, C. D., Johnson, C. S., Trump, D. L., Qin, M., Conroy, J. C., Wang, J., and Liu, S. Computational methods for detecting copy number variations in cancer genome using next generation sequencing: principles and challenges. *Oncotarget*. 4(11), 1868–1881 (2013).
- [96] Gagan, J. and Van Allen, E. M. Next-generation sequencing to guide cancer therapy. *Genome Medicine*. 7(1), 80 (2015).
- [97] Wang, X., Li, X., Cheng, Y., Sun, X., Sun, X., Self, S., Kooperberg, C., and Dai, J. Y. Copy number alterations detected by whole-exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma. *Human Genomics*. 9, 22 (2015).
- [98] Stark, Z., Schofield, D., Alam, K., Wilson, W., Mupfeki, N., Macciocca, I., Shrestha, R., White, S. M., and Gaff, C. Prospective comparison of the cost-effectiveness of clinical whole-exome sequencing with that of usual care overwhelmingly supports early use and reimbursement. *Genetics in Medicine*. 19(8), 867–874 (2017).
- [99] Riazalhosseini, Y. and Lathrop, M. Precision medicine from the renal cancer genome. *Nature Reviews. Nephrology*. 12(11), 655–666 (2016).
- [100] Rydzanicz, M., Wrzesiński, T., Bluysen, H. A. R., and Wesoły, J. Genomics and epigenomics of clear cell renal cell carcinoma: recent developments and potential applications. *Cancer Letters*. 341(2), 111–126 (2013).
- [101] Klatte, T., Rao, P. N., de Martino, M., LaRochelle, J., Shuch, B., Zomorodian, N., Said, J., Kabbinavar, F. F., Belldegrun, A. S., and Pantuck, A. J. Cytogenetic

- profile predicts prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 27(5), 746–753 (2009).
- [102] Gunawan, B., Huber, W., Holtrup, M., Heydebreck, A. v., Efferth, T., Poustka, A., Ringert, R.-H., Jakse, G., and Füzési, L. Prognostic Impacts of Cytogenetic Findings in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Gain of 5q31–qter Predicts a Distinct Clinical Phenotype with Favorable Prognosis. *Cancer Research*. 61(21), 7731–7738 (2001).
- [103] The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 499(7456), 43–49 (2013).
- [104] Yoshimoto, T., Matsuura, K., Karnan, S., Tagawa, H., Nakada, C., Tanigawa, M., Tsukamoto, Y., Uchida, T., Kashima, K., Akizuki, S., Takeuchi, I., Sato, F., Mimata, H., Seto, M., and Moriyama, M. High-resolution analysis of DNA copy number alterations and gene expression in renal clear cell carcinoma. *The Journal of Pathology*. 213(4), 392–401 (2007).
- [105] Kardas, I., Mrózek, K., Babinska, M., Krajka, K., Hadaczek, P., Lubinski, J., Roszkiewicz, A., Kuziemska, E., and Limon, J. Cytogenetic and molecular findings in 75 clear cell renal cell carcinomas. *Oncology Reports*. 13(5), 949–956 (2005).
- [106] Brunelli, M., Eccher, A., Gobbo, S., Ficarra, V., Novara, G., Cossu-Rocca, P., Bonetti, F., Menestrina, F., Cheng, L., Eble, J. N., and Martignoni, G. Loss of chromosome 9p is an independent prognostic factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 21(1), 1–6 (2008).

- [107] Arai, E., Ushijima, S., Tsuda, H., Fujimoto, H., Hosoda, F., Shibata, T., Kondo, T., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S., and Kanai, Y. Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-comparative genomic hybridization: its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 14(17), 5531–5539 (2008).
- [108] Monzon, F. A., Alvarez, K., Peterson, L., Truong, L., Amato, R. J., Hernandez-McClain, J., Tannir, N., Parwani, A. V., and Jonasch, E. Chromosome 14q loss defines a molecular subtype of clear-cell renal cell carcinoma associated with poor prognosis. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 24(11), 1470–1479 (2011).
- [109] Dalgliesh, G. L., Furge, K., Greenman, C., Chen, L., Bignell, G., Butler, A., Davies, H., Edkins, S., Hardy, C., Latimer, C., Teague, J., Andrews, J., Barthorpe, S., Beare, D., Buck, G., Campbell, P. J., Forbes, S., Jia, M., Jones, D., Knott, H., Kok, C. Y., Lau, K. W., Leroy, C., Lin, M.-L., McBride, D. J., Maddison, M., Maguire, S., McLay, K., Menzies, A., Mironenko, T., Mulderrig, L., Mudie, L., O’Meara, S., Pleasance, E., Rajasingham, A., Shepherd, R., Smith, R., Stebbings, L., Stephens, P., Tang, G., Tarpey, P. S., Turrell, K., Dykema, K. J., Khoo, S. K., Petillo, D., Wonderegem, B., Anema, J., Kahnoski, R. J., Teh, B. T., Stratton, M. R., and Futreal, P. A. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature*. 463(7279), 360–363 (2010).
- [110] Krijgsman, O., Carvalho, B., Meijer, G. A., Steenbergen, R. D. M., and Ylstra, B. Focal chromosomal copy number aberrations in cancer-Needles in a genome haystack. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1843(11), 2698–2704 (2014).

- [111] Fan, Q.-W., Cheng, C. K., Nicolaides, T. P., Hackett, C. S., Knight, Z. A., Shokat, K. M., and Weiss, W. A. A dual phosphoinositide-3-kinase alpha/mTOR inhibitor cooperates with blockade of epidermal growth factor receptor in PTEN-mutant glioma. *Cancer Research*. 67(17), 7960–7965.
- [112] Iorio, F., Knijnenburg, T. A., Vis, D. J., Bignell, G. R., Menden, M. P., Schubert, M., Aben, N., Gonçalves, E., Barthorpe, S., Lightfoot, H., Cokelaer, T., Greninger, P., van Dyk, E., Chang, H., de Silva, H., Heyn, H., Deng, X., Egan, R. K., Liu, Q., Mironenko, T., Mitropoulos, X., Richardson, L., Wang, J., Zhang, T., Moran, S., Sayols, S., Soleimani, M., Tamborero, D., Lopez-Bigas, N., Ross-Macdonald, P., Esteller, M., Gray, N. S., Haber, D. A., Stratton, M. R., Benes, C. H., Wessels, L. F., Saez-Rodriguez, J., McDermott, U., and Garnett, M. J. A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. *Cell*. 166(3), 740–754 (2016).
- [113] Pfister, S., Markkanen, E., Jiang, Y., Sarkar, S., D’Angiolella, V., Dianov, G., and Ryan, A. A novel synthetic lethal interaction between the histone mark H3K36me3 and checkpoint kinases. *European Journal of Cancer*. 50(6), 71 (2014).
- [114] Peña-Llopis, S., Vega-Rubín-de Celis, S., Liao, A., Leng, N., Pavía-Jiménez, A., Wang, S., Yamasaki, T., Zhrebker, L., Sivanand, S., Spence, P., Kinch, L., Hambuch, T., Jain, S., Lotan, Y., Margulis, V., Sagalowsky, A. I., Summerour, P. B., Kabbani, W., Wong, S. W. W., Grishin, N., Laurent, M., Xie, X.-J., Haudenschild, C. D., Ross, M. T., Bentley, D. R., Kapur, P., and Brugarolas, J. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nature genetics*. 44(7), 751–759 (2012).
- [115] Yap, T. A., Walton, M. I., Hunter, L.-J. K., Valenti, M., de Haven Brandon, A., Eve, P. D., Ruddle, R., Heaton, S. P., Henley, A., Pickard, L., Vijayaraghavan,

- G., Caldwell, J. J., Thompson, N. T., Aherne, W., Raynaud, F. I., Eccles, S. A., Workman, P., Collins, I., and Garrett, M. D. Preclinical pharmacology, antitumor activity and development of pharmacodynamic markers for the novel, potent AKT inhibitor CCT128930. *Molecular cancer therapeutics*. 10(2), 360–371 (2011).
- [116] Eghtedar, A., Verstovsek, S., Estrov, Z., Burger, J., Cortes, J., Bivins, C., Faderl, S., Ferrajoli, A., Borthakur, G., George, S., Scherle, P. A., Newton, R. C., Kantarjian, H. M., and Ravandi, F. Phase 2 study of the JAK kinase inhibitor ruxolitinib in patients with refractory leukemias, including postmyeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemia. *Blood*. 119(20), 4614–4618 (2012).
- [117] Chase, A., Bryant, C., Score, J., Haferlach, C., Grossmann, V., Schwaab, J., Hofmann, W.-K., Reiter, A., and Cross, N. C. P. Ruxolitinib as potential targeted therapy for patients with JAK2 rearrangements. *Haematologica*. 98(3), 404–408 (2013).
- [118] Motzer, R. J., Rini, B. I., McDermott, D. F., Redman, B. G., Kuzel, T. M., Harrison, M. R., Vaishampayan, U. N., Drabkin, H. A., George, S., Logan, T. F., Margolin, K. A., Plimack, E. R., Lambert, A. M., Waxman, I. M., and Hammers, H. J. Nivolumab for metastatic renal cell carcinoma: Results of a randomized phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*. 33(13), 1430–1437 (2015).
- [119] Li, S. Q., Cheuk, A. T., Shern, J. F., Song, Y. K., Hurd, L., Liao, H., Wei, J. S., and Khan, J. Targeting wild-type and mutationally activated FGFR4 in rhabdomyosarcoma with the inhibitor ponatinib (AP24534). *PloS One*. 8(10), e76551 (2013).
- [120] Patel, J. P., Gönen, M., Figueroa, M. E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J.,

- Van Vlierberghe, P., Dolgalev, I., Thomas, S., Aminova, O., Huberman, K., Cheng, J., Viale, A., Socci, N. D., Heguy, A., Cherry, A., Vance, G., Higgins, R. R., Ketterling, R. P., Gallagher, R. E., Litzow, M., van den Brink, M. R. M., Lazarus, H. M., Rowe, J. M., Luger, S., Ferrando, A., Paietta, E., Tallman, M. S., Melnick, A., Abdel-Wahab, O., and Levine, R. L. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 366(12), 1079–1089 (2012).
- [121] Treon, S. P., Tripsas, C. K., Meid, K., Warren, D., Varma, G., Green, R., Argyropoulos, K. V., Yang, G., Cao, Y., Xu, L., Patterson, C. J., Rodig, S., Zehnder, J. L., Aster, J. C., Harris, N. L., Kanan, S., Ghobrial, I., Castillo, J. J., Laubach, J. P., Hunter, Z. R., Salman, Z., Li, J., Cheng, M., Clow, F., Graef, T., Palomba, M. L., and Advani, R. H. Ibrutinib in previously treated waldenström’s macroglobulinemia. *The New England Journal of Medicine*. 372(15), 1430–1440 (2015).
- [122] Zhao, S., Adebiyi, M. G., Zhang, Y., Couturier, J. P., Fan, X., Zhang, H., Kellems, R. E., Lewis, D. E., and Xia, Y. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 mediates elevated IL-6 signaling to promote chronic inflammation and multitissue damage in sickle cell disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 32(5), 2855–2865 (2018).
- [123] Shao, N., Wan, F., Abudurexiti, M., Wang, J., Zhu, Y., and Ye, D. Causes of Death and Conditional Survival of Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*. 9, 591 (2019).
- [124] Grossman, R. L., Heath, A. P., Ferretti, V., Varmus, H. E., Lowy, D. R., Kibbe,

- W. A., and Staudt, L. M. Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data. *The New England Journal of Medicine*. 375(12), 1109–1112 (2016).
- [125] Malone, E. R., Oliva, M., Sabatini, P. J. B., Stockley, T. L., and Siu, L. L. Molecular profiling for precision cancer therapies. *Genome Medicine*. 12(1), 8 (2020).
- [126] Maruschke, M., Koczan, D., Ziems, B., and Hakenberg, O. W. Copy Number Alterations with Prognostic Potential in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Urologia Internationalis*. 101(4), 417–424 (2018).
- [127] Lelieveld, S. H., Spielmann, M., Mundlos, S., Veltman, J. A., and Gilissen, C. Comparison of Exome and Genome Sequencing Technologies for the Complete Capture of Protein-Coding Regions. *Human Mutation*. 36(8), 815–822 (2015).
- [128] Eijkelenboom, A., Tops, B. B. J., van den Berg, A., van den Brule, A. J. C., Dinjens, W. N. M., Dubbink, H. J., Ter Elst, A., Geurts-Giele, W. R. R., Groenen, P. J. T. A., Groenendijk, F. H., Heideman, D. A. M., Huibers, M. M. H., Huijsmans, C. J. J., Jeuken, J. W. M., van Kempen, L. C., Korpershoek, E., Kroeze, L. I., de Leng, W. W. J., van Noesel, C. J. M., Speel, E.-J. M., Vogel, M. J., van Wezel, T., Nederlof, P. M., Schuurin, E., and Ligtenberg, M. J. L. Recommendations for the clinical interpretation and reporting of copy number gains using gene panel NGS analysis in routine diagnostics. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*. 474(6), 673–680 (2019).
- [129] Beroukhi, R., Getz, G., Nghiemphu, L., Barretina, J., Hsueh, T., Linhart, D., Vivanco, I., Lee, J. C., Huang, J. H., Alexander, S., Du, J., Kau, T., Thomas, R. K., Shah, K., Soto, H., Perner, S., Prensner, J., Debiassi, R. M., Demichelis, F., Hatton, C., Rubin, M. A., Garraway, L. A., Nelson, S. F., Liao, L., Mischel, P. S.,

- Cloughesy, T. F., Meyerson, M., Golub, T. A., Lander, E. S., Mellinghoff, I. K., and Sellers, W. R. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: Methodology and application to glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(50), 20007–20012 (2007).
- [130] Tomczak, K., Czerwińska, P., and Wiznerowicz, M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary Oncology*. 19(1A), A68–A77 (2015).
- [131] Linehan, W. M. and Ricketts, C. J. The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications. *Nature Reviews. Urology*. 16(9), 539–552 (2019).
- [132] Jolly, C. and Van Loo, P. Timing somatic events in the evolution of cancer. *Genome Biology*. 19 (2018).
- [133] Mitchell, T. J., Turajlic, S., Rowan, A., Nicol, D., Farmery, J. H. R., O’Brien, T., Martincorena, I., Tarpey, P., Angelopoulos, N., Yates, L. R., Butler, A. P., Raine, K., Stewart, G. D., Challacombe, B., Fernando, A., Lopez, J. I., Hazell, S., Chandra, A., Chowdhury, S., Rudman, S., Soultati, A., Stamp, G., Fotiadis, N., Pickering, L., Au, L., Spain, L., Lynch, J., Stares, M., Teague, J., Maura, F., Wedge, D. C., Horswell, S., Chambers, T., Litchfield, K., Xu, H., Stewart, A., Elaidi, R., Oudard, S., McGranahan, N., Csabai, I., Gore, M., Futreal, P. A., Larkin, J., Lynch, A. G., Szallasi, Z., Swanton, C., and Campbell, P. J. Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal. *Cell*. 173(3), 611–623.e17 (2018).
- [134] Turajlic, S., Xu, H., Litchfield, K., Rowan, A., Horswell, S., Chambers, T., O’Brien,

- T., Lopez, J. I., Watkins, T. B., Nicol, D., Stares, M., Challacombe, B., Hazell, S., Chandra, A., Mitchell, T. J., Au, L., Eichler-Jonsson, C., Jabbar, F., Soultati, A., Chowdhury, S., Rudman, S., Lynch, J., Fernando, A., Stamp, G., Nye, E., Stewart, A., Xing, W., Smith, J. C., Escudero, M., Huffman, A., Matthews, N., Elgar, G., Phillimore, B., Costa, M., Begum, S., Ward, S., Salm, M., Boeing, S., Fisher, R., Spain, L., Navas, C., Grönroos, E., Hobor, S., Sharma, S., Aurangzeb, I., Lall, S., Polson, A., Varia, M., Horsfield, C., Fotiadis, N., Pickering, L., Schwarz, R. F., Silva, B., Herrero, J., Luscombe, N. M., Jamal-Hanjani, M., Rosenthal, R., Birkbak, N. J., Wilson, G. A., Pipek, O., Ribli, D., Krzystanek, M., Csabai, I., Szallasi, Z., Gore, M., McGranahan, N., Van Loo, P., Campbell, P., Larkin, J., and Swanton, C. Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell*. 173(3), 595–610.e11 (2018).
- [135] Kroeger, N., Klatte, T., Chamie, K., Rao, P. N., Birkhäuser, F. D., Sonn, G. A., Riss, J., Kabbinavar, F. F., Belldegrun, A. S., and Pantuck, A. J. Deletions of chromosomes 3p and 14q molecularly subclassify clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 119(8), 1547–1554 (2013).
- [136] Patard, J.-J., Fergelot, P., Karakiewicz, P. I., Klatte, T., Trinh, Q.-D., Rioux-Leclercq, N., Said, J. W., Belldegrun, A. S., and Pantuck, A. J. Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer*. 123(2), 395–400 (2008).
- [137] Strefford, J. C., Stasevich, I., Lane, T. M., Lu, Y.-J., Oliver, T., and Young, B. D. A combination of molecular cytogenetic analyses reveals complex genetic alterations

- in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 159(1), 1–9 (2005).
- [138] Gemmill, R. M., Zhou, M., Costa, L., Korch, C., Bukowski, R. M., and Drabkin, H. A. Synergistic growth inhibition by Iressa and Rapamycin is modulated by VHL mutations in renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 92(12), 2266–2277 (2005).
- [139] La Rochelle, J., Klatte, T., Dastane, A., Rao, N., Seligson, D., Said, J., Shuch, B., Zomorodian, N., Kabbinar, F., Beldegrun, A., and Pantuck, A. J. Chromosome 9p deletions identify an aggressive phenotype of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 116(20), 4696–4702 (2010).
- [140] Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H. S., Hodgson, J. G., James, C. D., Sarkaria, J. N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P. T., Wilson, R. K., Speed, T. P., Gray, J. W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C. M., Hayes, D. N., and Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 17(1), 98–110 (2010).
- [141] Mogensen, M. M., Malik, A., Piel, M., Bouckson-Castaing, V., and Bornens, M. Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein. *Journal of Cell Science*. 113(17), 3013–3023 (2000).
- [142] Abal, M., Piel, M., Bouckson-Castaing, V., Mogensen, M., Sibarita, J.-B., and

- Bornens, M. Microtubule release from the centrosome in migrating cells. *The Journal of Cell Biology*. 159(5), 731–737 (2002).
- [143] Dammermann, A. and Merdes, A. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *The Journal of Cell Biology*. 159(2), 255–266 (2002).
- [144] Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y. D., Nigg, E. A., and Fry, A. M. Protein kinases in control of the centrosome cycle. *FEBS letters*. 452(1-2), 92–95 (1999).
- [145] Nigg, E. A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2(1), 21–32 (2001).
- [146] Meraldi, P. and Nigg, E. A. Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *Journal of Cell Science*. 114(Pt 20), 3749–3757 (2001).
- [147] Chen, C.-H., Howng, S.-L., Cheng, T.-S., Chou, M.-H., Huang, C.-Y., and Hong, Y.-R. Molecular characterization of human ninein protein: two distinct subdomains required for centrosomal targeting and regulating signals in cell cycle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 308(4), 975–983 (2003).
- [148] Thompson, S. L., Bakhoun, S. F., and Compton, D. A. Mechanisms of Chromosomal Instability. *Current biology : CB*. 20(6), R285–R295 (2010).
- [149] Arai, E. and Kanai, Y. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 4(1), 58–73 (2011).
- [150] Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C. G., Creatore, C., Dawson, E., Fish, P., Harsha, B., Hathaway,

- C., Jupe, S. C., Kok, C. Y., Noble, K., Ponting, L., Ramshaw, C. C., Rye, C. E., Speedy, H. E., Stefancsik, R., Thompson, S. L., Wang, S., Ward, S., Campbell, P. J., and Forbes, S. A. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*. 47(D1), D941–D947 (2019).
- [151] Ainscough, B. J., Griffith, M., Coffman, A. C., Wagner, A. H., Kunisaki, J., Choudhary, M. N., McMichael, J. F., Fulton, R. S., Wilson, R. K., Griffith, O. L., and Mardis, E. R. DoCM: a database of curated mutations in cancer. *Nature Methods*. 13(10), 806–807 (2016).
- [152] Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Hoover, J., Jang, W., Katz, K., Ovetsky, M., Riley, G., Sethi, A., Tully, R., Villamarin-Salomon, R., Rubinstein, W., and Maglott, D. R. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Research*. 44(D1), D862–868 (2016).
- [153] Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P., and Olivier, M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human Mutation*. 28(6), 622–629 (2007).
- [154] Chakravarty, D., Gao, J., Phillips, S. M., Kundra, R., Zhang, H., Wang, J., Rudolph, J. E., Yaeger, R., Soumerai, T., Nissan, M. H., Chang, M. T., Chandarlapaty, S., Traina, T. A., Paik, P. K., Ho, A. L., Hantash, F. M., Grupe, A., Baxi, S. S., Callahan, M. K., Snyder, A., Chi, P., Danila, D., Gounder, M., Harding, J. J., Hellmann, M. D., Iyer, G., Janjigian, Y., Kaley, T., Levine, D. A., Lowery, M., Omuro, A., Postow, M. A., Rathkopf, D., Shoushtari, A. N., Shukla, N., Voss,

- M., Paraiso, E., Zehir, A., Berger, M. F., Taylor, B. S., Saltz, L. B., Riely, G. J., Ladanyi, M., Hyman, D. M., Baselga, J., Sabbatini, P., Solit, D. B., and Schultz, N. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO precision oncology*. 2017 (2017).
- [155] Sondka, Z., Bamford, S., Cole, C. G., Ward, S. A., Dunham, I., and Forbes, S. A. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 18(11), 696–705 (2018).
- [156] Higgins, J. P. Gene Array Studies in Renal Neoplasia. *The Scientific World Journal*. 6, 502–511 (2006).
- [157] Shen, C., Beroukhi, R., Schumacher, S. E., Zhou, J., Chang, M., Signoretti, S., and Kaelin, W. G. Genetic and Functional Studies Implicate HIF1 as a 14q Kidney Cancer Suppressor Gene. *Cancer discovery*. 1(3), 222–235 (2011).
- [158] Klatte, T., Kroeger, N., Rampersaud, E. N., Birkhäuser, F. D., Logan, J. E., Sonn, G., Riss, J., Rao, P. N., Kabbinavar, F. F., Belldegrun, A. S., and Pantuck, A. J. Gain of chromosome 8q is associated with metastases and poor survival of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 118(23), 5777–5782 (2012).
- [159] Huang, Y.-S., Liu, W.-B., Han, F., Yang, J.-T., Hao, X.-L., Chen, H.-Q., Jiang, X., Yin, L., Ao, L., Cui, Z.-H., Cao, J., and Liu, J.-Y. Copy number variations and expression of MPDZ are prognostic biomarkers for clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 8(45), 78713–78725 (2017).
- [160] Kozłowski, P., Roberts, P., Dabora, S., Franz, D., Bissler, J., Northrup, H., Au, K. S., Lazarus, R., Domanska-Pakiela, D., Kotulska, K., Jozwiak, S., and Kwiatkowski, D. J. Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2

- using MLPA, and genotype-phenotype correlations. *Human Genetics*. 121(3-4), 389–400 (2007).
- [161] Gao, W., Li, W., Xiao, T., Liu, X. S., and Kaelin, W. G. Inactivation of the PBRM1 tumor suppressor gene amplifies the HIF-response in VHL-/- clear cell renal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114(5), 1027–1032 (2017).
- [162] Macher-Goeppinger, S., Keith, M., Endris, V., Penzel, R., Tagscherer, K. E., Paher-nik, S., Hohenfellner, M., Gardner, H., Grüllich, C., Schirmacher, P., and Roth, W. MET expression and copy number status in clear-cell renal cell carcinoma: prognostic value and potential predictive marker. *Oncotarget*. 8(1), 1046–1057 (2017).
- [163] El-Mokadem, I., Kidd, T., Pratt, N., Fleming, S., and Nabi, G. Tumour suppressor gene (CDKNA2) status on chromosome 9p in resected renal tissue improves prognosis of localised kidney cancer. *Oncotarget*. 7(45), 73045–73054 (2016).
- [164] Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C. M., and Canaani, E. ALL-1 Is a Histone Methyltransferase that Assembles a Supercomplex of Proteins Involved in Transcriptional Regulation. *Molecular Cell*. 10(5), 1119–1128 (2002).
- [165] Milne, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D., and Hess, J. L. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Molecular Cell*. 10(5), 1107–1117 (2002).
- [166] Wang, X., Chen, C.-W., and Armstrong, S. A. The role of DOT1L in the maintenance of leukemia gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development*. 36, 68–72 (2016).

- [167] Zhang, Q., Zeng, L., Zhao, C., Ju, Y., Konuma, T., and Zhou, M.-M. Structural Insights into Histone Crotonyl-Lysine Recognition by the AF9 YEATS Domain. *Structure (London, England: 1993)*. 24(9), 1606–1612 (2016).
- [168] Li, Y., Sabari, B. R., Panchenko, T., Wen, H., Zhao, D., Guan, H., Wan, L., Huang, H., Tang, Z., Zhao, Y., Roeder, R. G., Shi, X., Allis, C. D., and Li, H. Molecular Coupling of Histone Crotonylation and Active Transcription by AF9 YEATS Domain. *Molecular Cell*. 62(2), 181–193 (2016).
- [169] Li, Y., Wen, H., Xi, Y., Tanaka, K., Wang, H., Peng, D., Ren, Y., Jin, Q., Dent, S. Y. R., Li, W., Li, H., and Shi, X. AF9 YEATS domain links histone acetylation to DOT1L-mediated H3K79 methylation. *Cell*. 159(3), 558–571 (2014).

ANEXOS

Anexo A - Análise Univariada completa da associação entre o número de eventos divididos em quartis e características clinicopatológicas dos 92 pacientes com ccRCC.

Variáveis	Parâmetros	Quartis				p-valor
		Q1 (n%)	Q2 (n%)	Q3 (n%)	Q4 (n%)	
Sexo	Masculino	34.8%	65.2%	62.5%	54.5%	0.15
	Feminino	65.2%	34.8%	37.5%	45.5%	
Idade	Abaixo de 60	56.5%	56.5%	66.7%	59.1%	0.87
	Acima de 60	43.5%	43.5%	33.3%	40.9%	
Etnia	Branco	78.3%	73.9%	75.0%	50.0%	0.26
	Pardos e Negros	17.4%	17.4%	25.0%	40.9%	
Etnia	Indefinidos	4.3%	8.7%	0.0%	9.1%	0.86
	Sim	19.0%	28.6%	17.4%	23.8%	
Histórico de Alcoolismo	Não	81.0%	71.4%	82.6%	76.2%	0.91
	Não-Fumante	63.6%	63.6%	59.1%	71.4%	
Histórico Tabagismo	Fumante	13.6%	13.6%	18.2%	19.0%	0.75
	Ex-Fumante	22.7%	22.7%	22.7%	9.5%	
Pressão Alta e Diabetes	Presente	17.4%	26.1%	16.7%	13.6%	0.01
	Ausente	82.6%	73.9%	83.3%	86.4%	
Tamanho	<7cm	91.3%	56.5%	54.2%	50%	0.19
	>7cm	8.7%	43.5%	45.8%	50%	
Estadiamento Clínico	I e II	82.6%	65.2%	58.3%	54.5%	0.008
	III e IV	17.4%	34.8%	41.7%	45.5%	
Grau de Fuhrman	I e II	95.7%	82.6%	66.7%	54.5%	0.71
	III e IV	4.3%	17.4%	33.3%	45.5%	
TNM - T	T1 e T2	82.6%	78.3%	75.0%	68.2%	0.30
	T3 e T4	17.4%	21.7%	25.0%	31.8%	
TNM - N	N0	91.3%	82.6%	83.3%	77.3%	0.01
	N1	0.0%	17.4%	8.3%	13.6%	
TNM - M	Nx	8.7%	0.0%	8.3%	9.1%	0.01
	M0	100%	73.9%	83.3%	68.2%	
Sintomas	M1	0%	26.1%	16.7%	31.8%	0.01
	Presentes	59.1%	36.4%	82.6%	52.4%	
	Ausentes	40.9%	63.6%	17.4%	47.6%	

Dor Lombar	Presente	34.8%	13%	58.3%	22.7%	0.007
	Ausente	65.2%	87%	41.7%	77.3%	
Dor abdominal/Cólica Renal	Presente	13.0%	4.3%	12.5%	9.1%	0.82
	Ausente	87.0%	95.7%	87.5%	90.9%	
Hematúria	Presente	8.7%	26.1%	37.5%	36.4%	0.10
	Ausente	91.3%	73.9%	62.5%	63.6%	
Desfecho	Vivo	91.3%	69.6%	70.8%	68.2%	0.05
	Óbito	8.7%	30.4%	29.2%	31.8%	
Recidiva	Sim	13.0%	17.4%	25.0%	36.4%	0.20
	Não	87.0%	82.6%	75.0%	63.6%	

(*) Q1: primeiro quartil; Q2: segundo quartil; Q3: terceiro quartil; Q4: quarto quartil; cm: centímetros;
 TNM: Classificação TNM de Tumores Malignos: T-Tumor, N-Linfonodo, M-Metástase.

Anexo B - Análise Univariada completa da associação entre as alterações cromossômicas de interesse e características clinicopatológicas dos 92 pacientes com ccRCC.

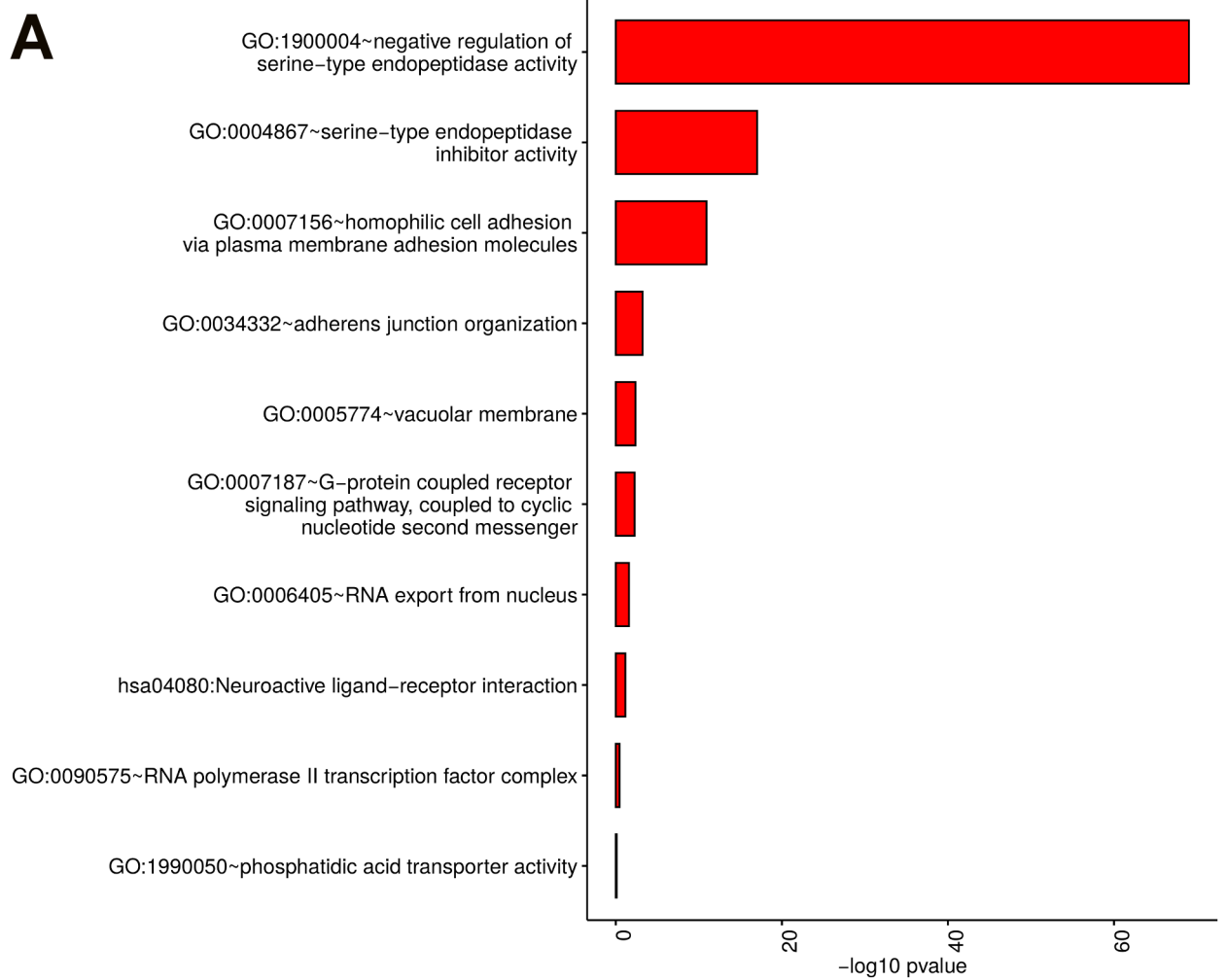
Variável	Regiões Cromossômicas de Interesse													
	3p25.2	3p21.2	3p22.2	3q11.2	5q34	6q23.2	7p21.2	9p21.3	9p24.1	10q23.3	14q22.1	16q21		
Sexo	0.42	0.43	0.27	0.35	0.55	0.09	0.06	0.07	0.87	0.50	0.27	0.13		
Idade	0.48	0.50	0.36	0.73	0.60	0.08	0.10	0.08	0.13	0.08	0.06	0.16		
Etnia	0.31	0.28	0.36	0.64	0.29	0.29	0.01	0.06	0.06	0.09	0.07	0.22		
Histórico de Alcoolismo	0.18	0.21	0.31	0.38	0.81	0.42	0.15	0.20	0.91	0.11	0.21	0.13		
Histórico Tabagismo	0.17	0.07	0.06	0.15	0.15	0.26	0.06	0.30	0.31	0.08	0.21	0.11		
Pressão Alta e Diabetes	0.37	0.15	0.47	0.32	0.25	0.19	0.34	0.32	0.13	0.56	0.08	0.26		
Estadiamento Clínico	0.11	0.15	0.32	0.38	0.06	0.46	0.06	0.01	0.11	0.09	0.05	0.11		
Tamanho	0.08	0.20	0.11	0.40	0.01	0.24	0.34	0.02	0.04	0.13	0.09	0.07		
Grau de Fuhrman	0.01	0.02	0.02	0.77	0.20	0.09	0.01	0.06	0.06	0.20	0.01	0.07		
TNM - T	0.20	0.56	0.20	0.77	0.10	0.30	0.02	0.04	0.05	0.17	0.06	0.38		
TNM - N	0.54	0.33	0.40	0.90	0.56	0.41	0.92	0.32	0.71	0.27	0.07	0.49		
TNM - M	0.81	0.20	0.49	0.50	0.03	0.24	0.92	0.01	0.20	0.20	0.03	0.25		
Sintomas	0.15	0.16	0.23	0.44	0.19	0.91	0.36	0.34	0.12	0.19	0.14	0.08		
Dor Lombar	0.41	0.06	0.49	0.03	0.11	0.13	0.83	0.90	0.42	0.17	0.42	0.11		
Dor abdominal/ Cólica Renal	0.54	0.20	0.58	0.67	0.82	0.85	0.88	0.38	0.71	0.84	0.56	0.82		

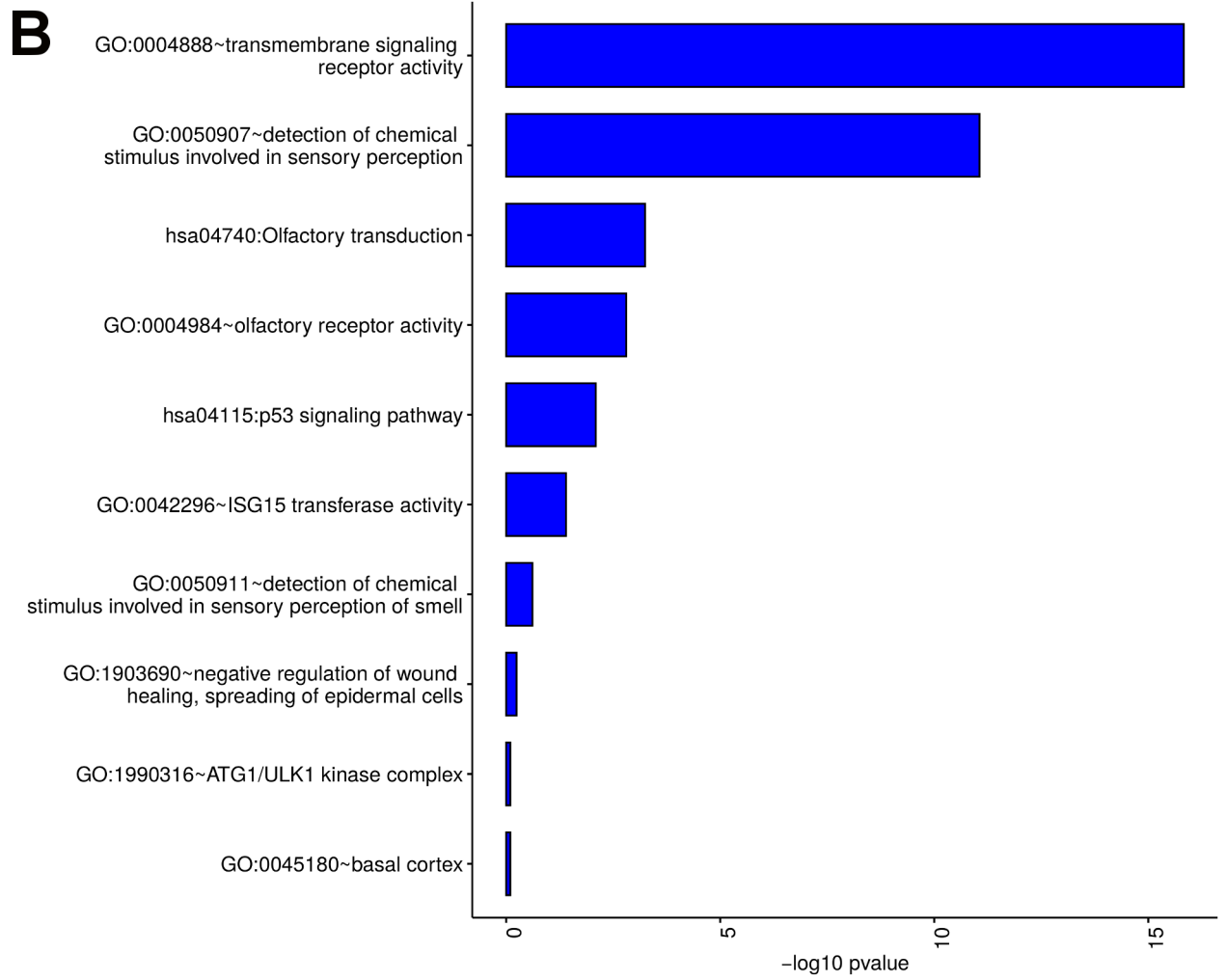
Hematúria	0.15	0.40	0.20	0.62	0.86	0.57	0.34	0.09	0.11	0.24	0.13	0.86
Desfecho	0.20	0.30	0.25	0.27	0.59	0.30	0.39	0.06	0.15	0.44	0.02	0.59
Recidiva	0.58	0.31	0.64	0.77	0.73	0.14	0.89	0.06	0.20	0.11	0.06	0.42

Anexo C - Análise Univariada completa da associação entre genes de interesse e características clinicopatológicas dos 92 pacientes com ccRCC.

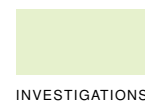
Variável	Genes com Alteração de Expressão Concomitante e p-valor							
	Perda BAP1	Ganho CDH11	Ganho FLT4	Perda MLLT3	Perda MYB	Ganho NSD1	Perda TFG	Perda NIN
Sexo	0.27	0.03	0.43	0.30	0.08	0.39	0.22	0.06
Idade	0.60	0.12	0.20	0.08	0.08	0.24	0.05	0.07
Etnia	0.36	0.12	0.16	0.07	0.29	0.32	0.23	0.09
Histórico de Alcoolismo	0.31	0.10	0.39	0.23	0.42	0.39	0.14	0.21
Histórico Tabagismo	0.06	0.06	0.34	0.23	0.26	0.47	0.02	0.30
Pressão Alta e Diabetes	0.71	0.22	0.10	0.29	0.19	0.16	0.23	0.17
Estadiamento Clínico	0.32	0.06	0.07	0.02	0.50	0.01	0.20	0.04
Tamanho	0.11	0.19	0.007	0.01	0.54	0.007	0.10	0.09
Grau de Fuhrman	0.02	0.22	0.48	0.01	0.02	0.15	0.20	0.006
TNM - T	0.25	0.32	0.08	0.06	0.30	0.08	0.28	0.06
TNM - N	0.40	0.41	0.56	0.57	0.41	0.56	0.49	0.06
TNM - M	0.49	0.58	0.16	0.005	0.49	0.09	0.37	0.03
Sintomas	0.23	0.06	0.27	0.40	0.09	0.15	0.79	0.56
Dor Lombar	0.73	0.24	0.39	0.36	0.13	0.23	0.07	0.74
Dor abdominal Cólica Renal	0.58	0.65	0.43	0.47	0.38	0.80	0.31	0.71
Hematúria	0.20	0.89	0.09	0.09	0.50	0.15	0.37	0.13
Desfecho	0.25	0.34	0.20	0.02	0.50	0.31	0.29	0.02
Recidiva	0.64	0.22	0.63	0.06	0.14	0.52	0.32	0.06

Anexo D - Anotação funcional de todos os genes identificados nas regiões de interesse. Os dados foram gerados por meio do banco de dados DAVID. Em A encontram-se as categorias identificadas em regiões amplificadas e em B as regiões deletadas.





Anexo E - Artigo Científico em Desenvolvimento



Somatic Copy Number Aberrations in Clear Cell Renal Cell Carcinoma of Brazilian Patients

Flávia Gonçalves Fernandes*, Henrique Cesar Santejo Silveira*, João Neif Antonio Júnior*, Rosana Antunes da Silveira*, Leandro Machado Colli†, Luis Eduardo Rosa Zucca*, Cristovam Scapulatempo-Neto*, Sergio Vicente Serrano*, Eric Jonasch‡, Rui Manuel Reis*,§,** and Adriane Feijó Evangelista*,1

*Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Sao Paulo, 14784-400, Brazil, †Department of Imaging Sciences, Hematology and Medical Oncology, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 14040-900, Brazil, ‡Department of Genitourinary Medical Oncology, Division of Cancer Medicine, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, 77030, USA, §Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Health Sciences School, University of Minho, Braga, 4710-057, Portugal, **ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, 4710-057, Portugal.

ABSTRACT Somatic copy number aberrations (SCNAs) are often associated with the clear cell renal carcinoma (ccRCC) pathogenesis and have been a source for new potentially useful diagnostic, therapeutic and prognostic applications. Recurrent SCNAs include loss of chromosomes 3p, 14q, 9p and gains of 5q and 8q. Some of them are suspected to interfere on gene expression and can influence clinical outcomes. Despite multiple studies on RCC CNAs, there is currently no description of chromosomal alterations in a Brazilian ccRCC cohort. The aim of the present study was to evaluate the chromosomal profile of Brazilian ccRCC patients and explore clinical associations. Therefore, a total of 92 ccRCC Brazilian patients that underwent nephrectomy at Barretos Cancer Hospital were analyzed for SCNAs by array comparative genomic hybridization. The cohort was mainly consistent of patients with early stages and localized disease. Most significant alterations identified by STAC included loss of 3p (87,3%), 14q (35,8%), 9p (28,6%) and 10q (25%), and gains of 5q (59,7%), 7p (29,3%), 6q (29,3%) and 16q (20,6%). Gene annotation and enrichment analysis were performed. *In silico* analysis revealed 19 genes mapped to CNA significant regions, including genes known to be oncogenic (*SETD2*, *BAP1*, *FLT4* e *PTEN*) and predicted drivers (*FGFR4* e *NSD1*). In addition, a fraction of the CNA genes correlated with gene expression and worse survival. Overall, this study provides the CNA profile of 92 ccRCC Brazilian patients and highlights regions potentially worthy of further investigation.

KEYWORDS

Copy number aberrations;
Clear cell renal carcinoma;
Brazilian population.

INTRODUCTION

Renal cell carcinoma (RCC) is a complex set of diseases made up of different genetic drivers, clinical courses, and therapeutic responses (Linehan *et al.* 2010; Linehan 2012; Jonasch *et al.* 2014; Ricketts *et al.* 2018). Worldwide, Renal Cancer represents 2-3% of all cancers, affecting over 403,000 new individuals and accounting for around 175,000 cancer-related deaths in 2018 (Bray *et al.* 2018). Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common histological subtype (70% -85%) and accounts for the most

RCC-specific deaths (Srigley *et al.* 2013). The 5-year survival rate for localized kidney cancer is up to 90%, but it drops dramatically for patients with distant metastasis (11.9%), which accounts for 30% of the advanced disease diagnosed at presentation (Bray *et al.* 2018; Middleton 1967). In Brazil, the estimated number for 2018 was 10,688 new cases and 4,084 deaths (Bray *et al.* 2018). In our institution, urologic tumors accounted for 11.3% of all cancer cases admitted in 2017, and over 150 new cases of kidney cancer were diagnosed in the same year. More than half of the patients were diagnosed at stages II and IV, with 5-year survival rate of 56% and 10%, respectively (https://infogram.com/rhc_hcb).

The ccRCC is often associated with recurrent chromosomal abnormalities that have been a source for new potentially useful diagnostic, therapeutic and prognostic applications (Klatte *et al.* 2009;

Manuscript compiled: Thursday 27th February, 2020

¹Correspondence should be addressed to Adriane F. Evangelista: adriane.evangelista@hccancerbarretos.com.br.

1 Gunawan *et al.* 2001). Most of the ccRCC copy number alterations
 2 consist of large events that can host multiple genes and interfere
 3 with gene expression (Higgins 2006; The Cancer Genome Atlas
 4 Research Network 2013; Shen *et al.* 2011; Klatte *et al.* 2012; Huang
 5 *et al.* 2017). Some CNA genes have already been shown to inter-
 6 fere with gene functionalities Klatte *et al.* (2012); Shen *et al.* (2011);
 7 Huang *et al.* (2017), but the association with tumor biology and
 8 disease is still lacking. The cytogenetic ccRCC hallmark is loss of
 9 chromosome 3p, which is specific of this RCC subtype (Kovacs and
 10 Frisch 1989; Wei and Hsieh 2015). The inactivation of the von Hip-
 11 pel–Lindau (VHL) tumor-suppressor gene at 3p25.3 is considered
 12 a crucial step in ccRCC carcinogenesis, however, other alterations
 13 are required for ccRCC development (The Cancer Genome Atlas
 14 Research Network 2013; Ricketts *et al.* 2018). Loss of chromosomes
 15 14q, 9p and deletion of 6q and 8p arms are also reported as char-
 16 acteristic of ccRCC, and are suggested to correlate with advanced
 17 tumors and worse survival (Moch *et al.* 1996; Gunawan *et al.* 2001;
 18 Brunelli *et al.* 2008; Elfving *et al.* 1997). Gain of chromosome 5q
 19 is the only alteration known to improve survival (Gunawan *et al.*
 20 2001). Understanding each alteration, including the CNA burden,
 21 is essential to characterize ccRCC genome, elucidate tumor biology
 22 and help clinical setting in the future.

23 Despite multiples studies on RCC CNAs, there is currently
 24 no description of chromosomal alterations in a Brazilian ccRCC
 25 cohort and data regarding the epidemiology and molecular aspects
 26 of RCC in Brazil are scarce. Therefore, the aim of the present
 27 study was to evaluate the chromosomal profile of Brazilian ccRCC
 28 patients and explore clinical associations, describing potentially
 29 molecular features with clinical impact and targets that could be
 30 worthy of further investigation.

31 MATERIALS AND METHODS

32 Sample Collection

33 A retrospective cohort of patients diagnosed with clear cell renal
 34 cell carcinoma that underwent nephrectomy and did not receive
 35 any preoperative therapy between 2008 and 2014 at Barretos Can-
 36 cer Hospital was included in the study. All clinical data were
 37 obtained from medical records and managed through RedCap Re-
 38 search Electronic Data Capture (Vanderbilt University, Tennessee,
 39 and UA) (<https://hcbredcap.com.br>). The study protocol was ap-
 40 proved by the local ethics committee, under the number 8042014.
 41 Tumor tissues were dissected from surgical specimens, snap-frozen
 42 in liquid nitrogen and stored at -80°C until DNA preparation.
 43 Histopathological diagnosis was performed independently by two
 44 pathologists according to the WHO classification system (Eble *et al.*
 45 2006). Nuclear grade was scored according to the Fuhrman classi-
 46 fication system (Fuhrman *et al.* 1982). Patients without histologically
 47 confirmed ccRCC or suspicious histology other than ccRCC were
 48 excluded.

49 DNA extraction

50 DNA was isolated from frozen tissue following a percentage crite-
 51 rion of minimum 60% tumor cellularity and maximum 20% necro-
 52 sis. DNA isolation was performed using QIAasympyony DNA mini
 53 Kit following the manufacturer's instructions. DNA quality and
 54 integrity was assessed by NanoDrop and quantified by Qubit@
 55 Fluorometric Quantitation (Life Technologies). Samples with insuf-
 56 ficient material for research or poor quality DNA extraction were
 57 also removed from the analysis.

DNA Labeling and Hybridization

58 CGH-array was performed according to the standard protocol from
 59 Agilent SurePrint G3 CGH+SNP 4x180K (Agilent Technologies,
 60 Santa Clara, CA) using a diploid DNA reference as control (Agilent
 61 Technologies). Normal DNA (reference) was labeled with Cyanine-
 62 3 and tumor DNA (test) with Cyanine-5 (Agilent Technologies). La-
 63 beled DNAs were purified and the quality of labeling was assessed
 64 by NanoDrop (Thermo Scientific). Equal quantities of DNA (test
 65 and reference) from each patient were hybridized into the slides
 66 for 24 hours and cleaned with washed and stabilization buffers,
 67 plus acetonitrile. The slides were scanned (SureScan Microarray
 68 Scanner-Agilent Technologies) following the manufacturer's rec-
 69 ommendations and as previously reported by our group (Bidinotto
 70 *et al.* 2016). The recommended cutoff Derivative of the Log Ratio
 71 Spread (DLRS) considered for the aCGH experiments was 0.30.
 72 Samples with DLRS ≥ 0.30 were excluded.

Bioinformatic Analysis

74 SCNAs analysis was performed using Nexus Copy
 75 Number software (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA)
 76 (<http://www.biodiscovery.com/nexus-copy-number/>).
 77 The Significance Testing for Aberrant Copy number (STAC)
 78 (<http://cbil.upenn.edu/STAC>) was applied to identify regions
 79 of interest that meet both the p-value cut-off ($p \leq 0.05$) as well as
 80 the aggregate cut-off ($>20\%$). Significant regions were queried
 81 for oncogenic alterations through Cancer Genome Interpreter
 82 platform (CGI) (<http://www.cancergenomeinterpreter.org>).
 83 Affected genes were also interrogated for functional annotation
 84 using the DAVID bioinformatics tool (The Database for Annotation,
 85 Visualization, and Integrated Discovery) under the Benjamini
 86 Hochberg adjusted p-value ≤ 0.05 (Huang *et al.* 2017). Only the
 87 top 10 associations were selected. The OncoPrint™ transcriptomic
 88 cancer profiling platform (Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI)
 89 (<https://www.oncoPrint.org/>) was used to explore changes in
 90 gene expression. Genes were investigated for gains and losses of
 91 expression in TCGA dataset (totaling 579 ccRCC clinical samples
 92 with DNA copy number data) (The Cancer Genome Atlas Research
 93 Network 2013; Beroukchim *et al.* 2009).

Enrichment Analysis and CNA Burden

95 To further investigate associations, enrichment analysis was per-
 96 formed in order to identify clinical features overrepresented within
 97 a particular CNA group. The analysis was based on one-sided
 98 Fisher's exact test with the significance was set at $p \leq 0.05$. Pa-
 99 tients were analyzed according to CNA burden: number of total
 100 CNAs and number of CNA gains and losses separately. The cutoff
 101 number of events was set at 50 CNA events. The IBM SPSS Statis-
 102 tics software version 23 ([https://www.ibm.com/analytics/spss-
 103 statistics-software](https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software)) was used to associate CNA burden and clinical
 104 data.

Statistical Analysis

106 The R Package for statistical analysis ([https://www.R-
 107 project.org](https://www.R-project.org)) was locally implemented in Galaxy platform
 108 (<https://usegalaxy.org/>) for the associations. Correlation between
 109 frequencies of molecular alterations and clinical, histological and
 110 pathological features were performed using chi-square or Fisher's
 111 exact test. Overall survival (OS) was defined as the time from
 112 nephrectomy until the last contact or death. OS was assessed using
 113 the Kaplan-Meier method and log-rank comparisons, considering
 114 $p \leq 0.05$ as significance value.

1 Data Availability

2 Microarray data are available at ArrayExpress with the accession
3 number: XXX.

4 RESULTS AND DISCUSSION

5 Clinical Data - Study Population

6 Slightly more patients were male, with a mean age of 58 years old
7 (ranging from 20 to 81 years). More than half of the patients were
8 white and presented localized disease (stages I and II). Around
9 20% of the patients were metastatic at diagnosis and received
10 adjuvant treatment. The mean follow-up time was 4 years and
11 by the end of the study, almost 70% of the patients were alive
12 without disease. Disease progression and cancer specific death
13 was seen in 19.5% of the cases (Table 1). The major risk factors
14 seen in the cohort was hypertension (54.3%), smoking (33.6%)
15 and Diabetes (22.8%). The 5-year overall survival rate for kidney
16 cancer patients was 77.3%, with an estimated average survival
17 time of 53.5 months. Kaplan Meier plots showed that OS was
18 significantly lower for patients in advanced stages ($p=0.01$) and
19 histological grade ($p=0.000$), presence of metastasis ($p=0.002$) and
20 tumors bigger than 7 centimeters ($p=0.003$).

21 Analysis of Somatic Copy Number Aberrations

22 Somatic DNA copy number aberrations (SCNAs) landscape are
23 represented in Figure 1. A total of 10,525 CNAs were identified
24 along the entire genome, with a median of 67.5 alterations per patient.
25 An average of 10-12% of each patient's genome was found to be
26 altered. STAC analysis identified 158 significant regions, which
27 encompassed 1,248 genes. Most significant regions included loss
28 of 3p (87,3%), 14q (35,8%), 9p (28,6%) and 10q (25%), and gains
29 of 5q (59,7%), 7p (29,3%), 6q (29,3%) and 16q (20,6%) (Figura 1).
30 In silico analysis revealed 19 genes mapped to CNA significant
31 regions (Table 2). Compared to TCGA data, there was a slightly
32 difference in overall CNA frequencies. According to CGI analysis,
33 alterations in *SETD2*, *BAP1*, *FLT4* and *PTEN* genes were interpreted
34 as oncogenic, and events in *FGFR4* and *NSD1* genes as predicted drivers.
35 Deletions of *PTEN*, *SETD2* and *BAP1* genes, are described as biomarkers
36 for RCC and are responsive to drugs of preclinical and clinical trials
37 (*Fan et al. 2007*; *Iorio et al. 2016*; *Pfister et al. 2014*; *Peña-Llopis et al. 2012*; *Yap et al. 2011*). Also, deletions of
38 *JAK2*, *CD274* and *MYD88* genes, and amplification of *FGFR4* and
39 *NPM1* genes, are also involved in clinical trials for other tumor
40 types *Eghtedar et al. (2012)*; *Chase et al. (2013)*; *Motzer et al. (2015)*;
41 *Li et al. (2013)*. Interestingly, alterations in *JAK2*, *MYD88* and *NPM1*
42 genes, already have drugs FDA approved for other cancers (*Patel et al. 2012*;
43 *Treon et al. 2015*; *Zhao et al. 2018*).

45 CNAs Clinical Impact and Survival Analysis

46 Significant regions were investigated for clinical associations (Table
47 3). Deletions of chromosomes 9p and 14q, and the gain of 7p
48 were significantly associated with advanced disease (bigger tumors,
49 metastasis, higher histological grade and staging) (Table 3).
50 In addition, loss of chromosome 14q, which encompasses the NIN
51 gene, was associated with worse survival ($p=0.03$) (Figure 3). Interestingly,
52 5q gain was also associated with poor outcomes (Table 3).
53 In addition, gain of 7p, which was associated with advanced tumors,
54 was also significantly present in black and brown patients ($p=0.01$).
55 On the other hand, losses of chromosome 3p were shown to be related
56 to localized disease, specially with Fuhrman histological
57 grade 1 ($p=0.01$) (Table 3).

Enrichment Analysis

58 We further investigated for associations between CNA burden (Total
59 number of CNAs, CNA Gains and CNA Losses) and clinical features.
60 Patients with less than 50 CNAs in total ($n=28$) were significantly
61 associated with small tumors and early stages ($p=0.0003$) and grades
62 ($p=0.0008$). While patients with more than 50 CNAs per genome
63 ($n=16$) were correlated with Fuhrman grade 3 ($p=0.006$).
64 Patients with less than 50 CN gains ($n=61$) and losses ($n=69$) mostly
65 presented localized disease, with lower tumor stage ($p=0.003$) and
66 grade ($p=0.008$), and better outcomes ($p=0.001$). Although there
67 was no significance in the group with more than 50 CN loss, patients
68 with more than 50 CN gains specifically were associated with bigger
69 tumors ($p=0.001$) and higher histological grades ($p=0.001$).
70 Interestingly, the group with more than 50 CNA events, especially
71 CNA gains, were enriched with younger patients ($p=0.01$) and
72 brown ethnicity ($p=0.02$).
73

Integration of CN data with transcriptomic profile

74 To search for correlations between SCNAs and expression profile,
75 we identified 19 cancer genes mapped to STAC regions (Table 2).
76 All genes were investigated for gain or loss of expression in TCGA
77 data through the OncoPrint platform (504 ccRCC samples) (*The
78 Cancer Genome Atlas Research Network 2013*). Loss of *BAP1*,
79 *MYB*, *MLLT3* and *TFG* genes showed concomitant loss of gene
80 expression. Likewise, gain of *CDH11* and *FLT4* genes showed gain
81 of expression in TCGA data (Figura 4). The other genes (*SETD2*,
82 *PPARG*, *MYD88*, *RANBP17*, *NPM1*, *ETV1*, *JAK2*, *CD274*, *PTEN*,
83 *CBLB* and *FGFR4*) showed a negative correlation pattern: CN gain
84 with loss of expression and vice-versa.
85

Functional Annotation

86 Functional annotation analysis did not identify significant associations
87 for the amplified genes. On the other hand, for deleted genes,
88 groups of annotation related to important biological processes
89 were demonstrated, mainly linked to the immune system
90 (chemotaxis, cytokine and chemokine activity and Interferon I ligands)
91 ($p < 0.05$) and possibly associated with oncogenic processes
92 (cell differentiation and via PI3K-Akt) ($p < 0.005$) (Figure 2).
93

LITERATURE CITED

- 94
95 Beroukhim, R., J.-P. Brunet, A. Di Napoli, K. D. Mertz, A. Seeley,
96 *et al.*, 2009 Patterns of gene expression and copy-number
97 alterations in VHL disease-associated and sporadic clear cell
98 carcinoma of the kidney. *Cancer research* **69**: 4674-4681.
99 Bidinotto, L., R. Torrieri, G. Almeida, M. Viana-Pereira,
100 A. Cruvinel-Carlioni, *et al.*, 2016 Copy Number Profiling of Brazilian
101 Astrocytomas. - PubMed - NCBI. Copy Number Profiling of
102 Brazilian Astrocytomas. **vol.6**.
103 Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, *et al.*,
104 2018 Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of
105 incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries:
106 Global Cancer Statistics 2018. CA: A Cancer Journal for
107 Clinicians .
108 Brunelli, M., A. Eccher, S. Gobbo, V. Ficarra, G. Novara, *et al.*, 2008
109 Loss of chromosome 9p is an independent prognostic factor in
110 patients with clear cell renal cell carcinoma. *Modern Pathology: An
111 Official Journal of the United States and Canadian Academy of
112 Pathology, Inc* **21**: 1-6.
113 Chase, A., C. Bryant, and J. Score, 2013 Ruxolitinib as potential targeted
114 therapy for patients with JAK2 rearrangements. - PubMed
115 - NCBI .

■ Table 1 Patient clinicopathological features.

Clinical Data	Category	Patients (Frequency)
Gender	Male	50 (54.3%)
	Female	42 (45.7%)
Status follow-up	Alive	69 (75.0%)
	Deceased	23 (25.0%)
Age	Average (min-max)	58 (20-81)
Clinical stage	I/II	60 (65.2%)
	III/IV	32 (44.8%)
T	T1a-b	47 (51.1%)
	T2a-b	23 (25.0%)
	T3a-c	17 (18.5%)
	T4	5 (5.4%)
N	N0	77 (83.7%)
	N1	9 (9.8%)
	Nx	6 (6.5%)
M	M0	75 (81.5%)
	M1	17 (18.5%)
Tumor size	< 7cm	58 (63.0%)
	> 7cm	34 (37.0%)
Furhman Grade	1	20 (21.7%)
	2	49 (53.3%)
	3	16 (17.4%)
	4	7 (7.6%)
Ethnicity	White	64 (69.6%)
	Black	3 (3.3%)
	Yellow	1 (1.0%)
	Brown*	20 (21.7%)
	Other	4 (4.4%)
Systemic Therapy	Sunitinib	12 (13.0%)
	Interferon	4 (4.3%)
	Pazopanib	1 (1.1%)
	None	74 (80.4%)
	Other	1 (1.1%)
Disease status (last follow-up)	Alive without disease	64 (69.6%)
	Alive with disease progression	2 (2.1%)
	Progression and death from the disease	18 (19.6%)
	Died without disease recurrence	8 (8.7%)

*Brown = Brazilian mixed.

■ **Table 2 Frequency of significant regions according to STAC with frequency $\geq 20\%$ in the present casuistic and in TCGA.**

Chromosome	Cytoband	Event	Patients Frequency (%)	TCGA Frequency (%)	Cancer genes
Chr3	p21.2-p21.3	DEL	83.7	72.2	<i>BAP1, SETD2</i>
Chr3	p22.2	DEL	83.7	72.2	<i>MYD88</i>
Chr3	p25.2	DEL	83.7	72.2	<i>PPARG</i>
Chr3	q11.2-q13.11	DEL	20.6	25.7	<i>TFG, CBLB</i>
Chr5	q34-q35.3	AMP	59.7	47.6	<i>RANBP17, NPM1, FGFR4, NSD1, FLT4</i>
Chr6	q23.2-q23.3	DEL	29.3	19.0	<i>MYB</i>
Chr7	p21.1	AMP	29.3	22.9	<i>ETV1</i>
Chr9	p21.3	DEL	28.2	17.9	<i>MLLT3</i>
Chr9	p24.1	DEL	27.1	20.7	<i>JAK2, CD274</i>
Chr10	q23.31	DEL	25.0	13.6	<i>PTEN</i>
Chr14	q22.1	DEL	35.9	29.0	<i>NIN</i>
Chr16	q21	AMP	20.6	11.9	<i>CDH11</i>

■ **Table 3 Association of clinical features with significant regions identified by STAC.**

Chromosome	Cytoband	Event	Clinical Features	Pvalue
Chr3	p21.2	DEL	Fuhrman Grade (1-2)	0.02
Chr3	p25.2	DEL	Fuhrman Grade (1-2)	0.01
Chr5	q34-q35.1	AMP	Metastasis	0.03
			Tumor size (≥ 10 cm)	0.01
Chr7	p21.2	AMP	Ethnicity (Black/Brown)*	0.01
			Fuhrman Grade (3-4)	0.01
			Tumors T3/T4	0.02
Chr9	p21.3	DEL	Metastasis	0.01
			Tumor size (≥ 10 cm)	0.02
			Tumors T3-T4	0.04
			Clinical stage (3-4)	0.01
Chr9	p24.1	DEL	Tumor size (≥ 10 cm)	0.04
			Tumors T3-T4	0.05
Chr14	q22.1	DEL	Clinical stage (3-4)	0.05
			Outcome (Death)	0.02
			Metastasis	0.03
			Fuhrman Grade (3-4)	0.01

* Brown = Brazilian mixed.

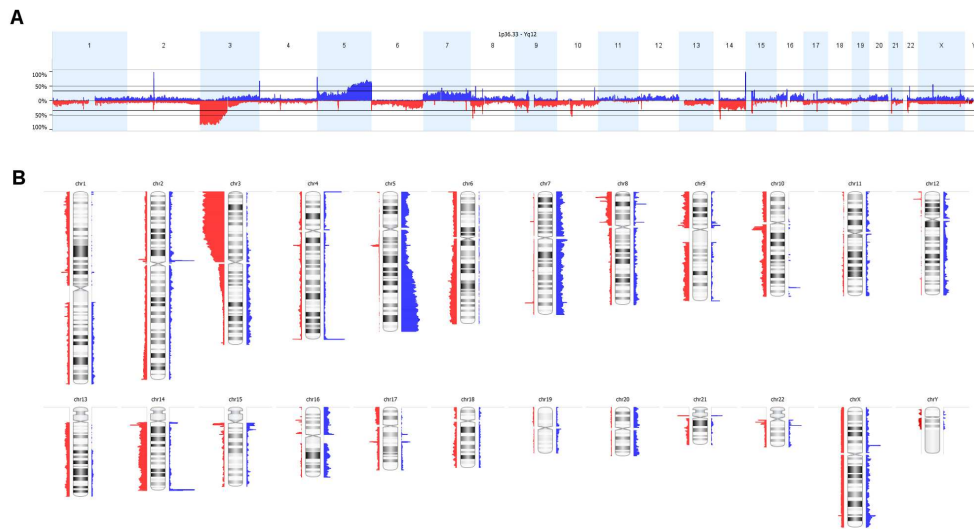


Figure 1 Somatic DNA copy number aberrations (SCNAs) of 92 patients of ccRCC. In (A) The linear distribution of DNA gains and losses and in (B) Chromosomal representation of all the aberrations.

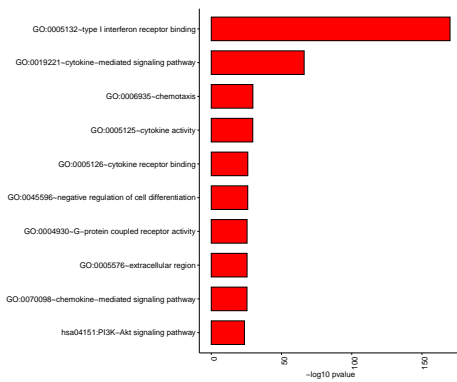


Figure 2 Top 10 categories from functional enrichment of the genes in CN loss regions.

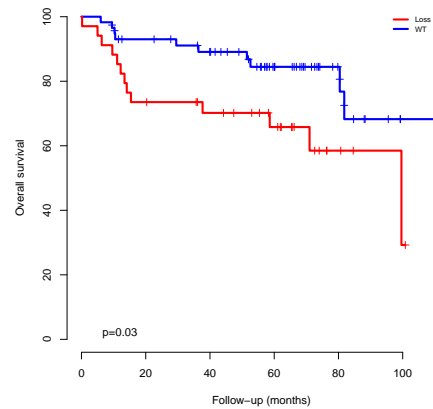


Figure 3 Overall survival of chromosome 14 q 22.1 which encompasses the *NIN* gene.

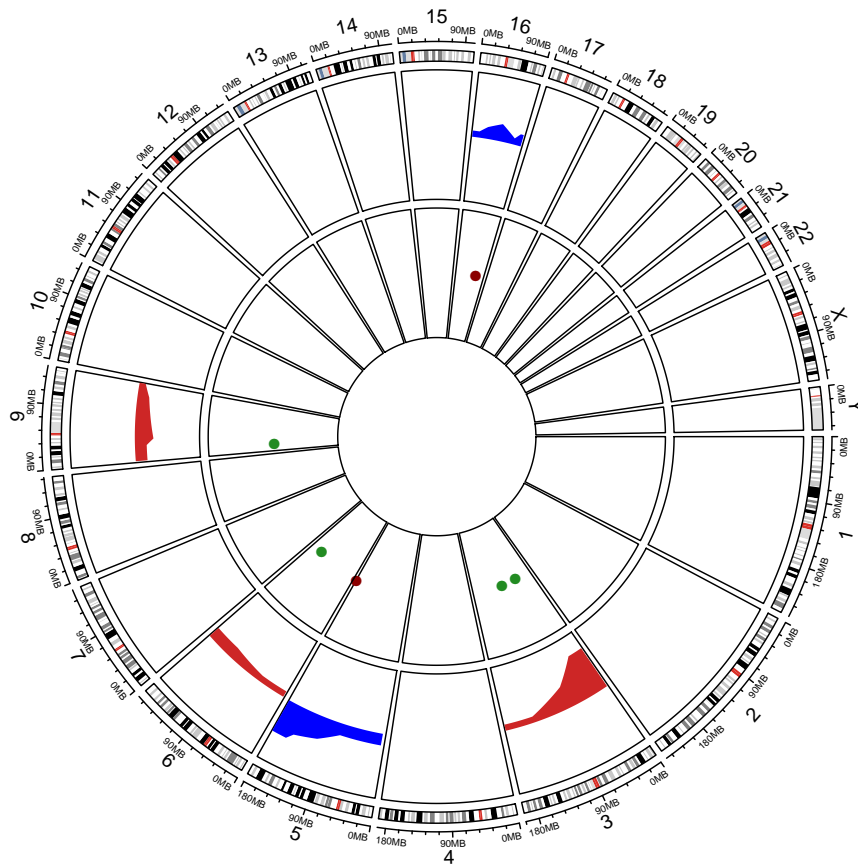


Figure 4 Circos Plot showing the correlation of SCNAs and gene expression from Oncomine data. The periphery circle represents regions of Copy Number Aberrations along the genome per chromosome. Blue represents copy number gains and red copy number losses. The inner circle contains genes with concomitant alteration in gene expression. Green dots represents downregulated genes and red upregulated genes. The data was generated using R.

- 1 Eble, J. N., Weltgesundheitsorganisation, and I. A. for Research on
2 Cancer, editors, 2006 *Pathology and genetics of tumours of the uri-*
3 *nary system and male genital organs: ... editorial and consensus con-*
4 *ference in Lyon, France, December 14 - 18, 2002*. Number 6 in World
5 Health Organization classification of tumours, IARC Press, Lyon,
6 reprint edition, OCLC: 255713056.
- 7 Eghtedar, A., S. Verstovsek, Z. Estrov, and G. Burger, 2012 Phase 2
8 study of the JAK kinase inhibitor ruxolitinib in patients with re-
9 fractory leukemias, including postmyeloproliferative neoplasm
10 acute myeloi... - PubMed - NCBI .
- 11 Elfvig, P., N. Mandahl, R. Lundgren, J. Limon, E. Bak-Jensen, *et al.*,
12 1997 Prognostic implications of cytogenetic findings in kidney
13 cancer. *British Journal of Urology* **80**: 698–706.
- 14 Fan, Q., C. Chen, and T. Nicolaidis, 2007 A dual phosphoinositide-
15 3-kinase alpha/mTOR inhibitor cooperates with blockade of
16 epidermal growth factor receptor in PTEN-mutant glioma.
17 - PubMed - NCBI. A dual phosphoinositide-3-kinase al-
18 pha/mTOR inhibitor cooperates with blockade of epidermal
19 growth factor receptor in PTEN-mutant glioma. .
- 20 Fuhrman, S. A., L. C. Lasky, and C. Limas, 1982 Prognostic signifi-
21 cance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *The*
22 *American Journal of Surgical Pathology* **6**: 655–663.
- 23 Gunawan, B., W. Huber, M. Holtrup, A. v. Heydebreck, T. Efferth,
24 *et al.*, 2001 Prognostic Impacts of Cytogenetic Findings in Clear
25 Cell Renal Cell Carcinoma: Gain of 5q31–qter Predicts a Distinct
26 Clinical Phenotype with Favorable Prognosis. *Cancer Research*
27 **61**: 7731–7738.
- 28 Higgins, J. P., 2006 Gene Array Studies in Renal Neoplasia. *The*
29 *Scientific World Journal* **6**: 502–511.
- 30 Huang, Y.-S., W.-B. Liu, F. Han, J.-T. Yang, X.-L. Hao, *et al.*, 2017
31 Copy number variations and expression of MPDZ are prognos-
32 tic biomarkers for clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* **8**:
33 78713–78725.
- 34 Iorio, F., T. A. Knijnenburg, D. J. Vis, G. R. Bignell, M. P. Menden,
35 *et al.*, 2016 A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in
36 Cancer. *Cell* **166**: 740–754.
- 37 Jonasch, E., J. Gao, and W. K. Rathmell, 2014 State of the Art
38 Review: Renal cell carcinoma. *Renal cell carcinoma* .
- 39 Klatte, T., N. Kroeger, E. N. Rampersaud, F. D. Birkhäuser, J. E.
40 Logan, *et al.*, 2012 Gain of chromosome 8q is associated with
41 metastases and poor survival of patients with clear cell renal cell
42 carcinoma. *Cancer* **118**: 5777–5782.
- 43 Klatte, T., P. N. Rao, M. de Martino, J. LaRochele, B. Shuch, *et al.*,
44 2009 Cytogenetic profile predicts prognosis of patients with clear
45 cell renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official*
46 *Journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 746–
47 753.
- 48 Kovacs, G. and S. Frisch, 1989 Clonal chromosome abnormalities
49 in tumor cells from patients with sporadic renal cell carcinomas.
50 *Cancer Research* **49**: 651–659.
- 51 Li, S., A. Cheuk, and J. Shern, 2013 Targeting wild-type and mu-
52 tationally activated FGFR4 in rhabdomyosarcoma with the in-
53 hibitor ponatinib (AP24534). - PubMed - NCBI .
- 54 Linehan, W. M., 2012 Genetic basis of kidney cancer: Role of
55 genomics for the development of disease-based therapeutics.
56 *Genome Research* **22**: 2089–2100.
- 57 Linehan, W. M., R. Srinivasan, and L. S. Schmidt, 2010 The genetic
58 basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nature reviews.*
59 *Urology* **7**: 277–285.
- 60 Middleton, R. G., 1967 Surgery for metastatic renal cell carcinoma.
61 *The Journal of Urology* **97**: 973–977.
- 62 Moch, H., J. C. Presti, G. Sauter, N. Buchholz, P. Jordan, *et al.*, 1996
63 Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridiza-
64 tion are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma.
65 *Cancer Research* **56**: 27–30.
- 66 Motzer, R. J., B. I. Rini, D. F. McDermott, and B. G. Redman, 2015
67 Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a
68 Randomized Phase II Trial .
- 69 Patel, J., M. Gonen, M. Figueroa, H. Fernandez, and Z. Sun, 2012
70 Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute
71 myeloid leukemia. - PubMed - NCBI. Prognostic relevance of
72 integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. .
- 73 Peña-Llopis, S., S. Vega-Rubín-de Celis, A. Liao, N. Leng, A. Pavía-
74 Jiménez, *et al.*, 2012 BAP1 loss defines a new class of renal cell
75 carcinoma. *Nature genetics* **44**: 751–759.
- 76 Pfister, S., E. Markkanen, Y. Jiang, S. Sarkar, V. D'Angiolella, *et al.*,
77 2014 A novel synthetic lethal interaction between the histone
78 mark H3K36me3 and checkpoint kinases. A novel synthetic
79 lethal interaction between the histone mark H3K36me3 and
80 checkpoint kinases .
- 81 Ricketts, C. J., A. A. D. Cubas, H. Fan, C. C. Smith, M. Lang,
82 *et al.*, 2018 The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular
83 Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports* **23**: 3698.
- 84 Shen, C., R. Beroukhi, S. E. Schumacher, J. Zhou, M. Chang, *et al.*,
85 2011 Genetic and Functional Studies Implicate HIF1 as a 14q
86 Kidney Cancer Suppressor Gene. *Cancer discovery* **1**: 222–235.
- 87 Srigley, J. R., B. Delahunt, J. N. Eble, L. Egevad, J. I. Epstein, *et al.*,
88 2013 The International Society of Urological Pathology (ISUP)
89 Vancouver Classification of Renal Neoplasia: The American
90 Journal of Surgical Pathology **37**: 1469–1489.
- 91 The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013 Comprehen-
92 sive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma.
93 *Nature* **499**: 43–49.
- 94 Treon, S., C. Tripsas, and K. Meid, 2015 Ibrutinib in previously
95 treated Waldenström's macroglobulinemia. - PubMed - NCBI.
96 Ibrutinib in previously treated Waldenström's macroglobuline-
97 mia. .
- 98 Wei, E. Y. and J. J. Hsieh, 2015 A river model to map convergent
99 cancer evolution and guide therapy in RCC. *Nature Reviews.*
100 *Urology* **12**: 706–712.
- 101 Yap, T., M. Walton, and L. Hunter, 2011 Preclinical pharmacology,
102 antitumor activity, and development of pharmacodynamic mark-
103 ers for the novel, potent AKT inhibitor CCT128930. - PubMed
104 - NCBI. Preclinical pharmacology, antitumor activity, and de-
105 velopment of pharmacodynamic markers for the novel, potent
106 AKT inhibitor CCT128930. .
- 107 Zhao, S., M. G Adebisi, and Y. Zhang, 2018 Sphingosine-1-
108 phosphate Receptor 1 Mediates Elevated IL-6 Signaling to Pro-
109 mote Chronic Inflammation and Multitissue Damage in Sickle
110 Cell Disease - PubMed. Sphingosine-1-phosphate Receptor 1 Me-
111 diates Elevated IL-6 Signaling to Promote Chronic Inflammation
112 and Multitissue Damage in Sickle Cell Disease .

Anexo F - Ficha de Coleta Modelo ICGC

IDENTIFICATION				
id_mendelics	1	ID mendelics	1	
v_002_initials	2	Initials	2	
v_003_medical_register	3	Medical register	3	
v_004_ap	4	AP Descrever	4	
v_005_blood_specimen_id	5	Blood Specimen ID	5	
v_006_tumor_specimen_id	6	Tumor Specimen ID	6	
v_007_dt_preench_clin	7	Data de preenchimento dos dados clínicos DD/MM/AAAA	7	___/___/_____
v_07a_dt_preench_molec	7a	Data de preenchimento dos dados moleculares DD/MM/AAAA	7a	___/___/_____
v_008_resp_preench_clin	8	Responsável pelo preenchimento dos dados clínicos Descrever	8	
v_08a_resp_preench_molec	8a	Responsável pelo preenchimento dos dados moleculares Descrever	8a	
DONOR				
donor_id	9	Donor ID (Unique identifier for the donor; assigned by data provider. It must be coded, and correspond to a donor ID listed in the donor data file) TEXT	9	
donor_sex	10	Donor Sex (Donor biological sex) 1- male; 2- female; -777- Unknown; -888- Not applicable	10	
donor_region_of_residence	11	Donor Region of Residence (Country, and optionally state or province code, but not city) – Controlled TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	11	
donor_vital_status	12	Donor Vital Status (Donor's last known vital status) 1- alive; 2- deceased; -777- Unknown; -888- Not applicable	12	
disease_status_last_followup	13	Disease Status Last Followup (Donor's last known disease status) 1- complete remission; 2- partial remission; 3- progression; 4- relapse; 5- stable; -777- Unknown; -888- Not applicable	13	
donor_relapse_type	14	Donor Relapse Type (Type of relapse or progression (for liquid tumours), if applicable) 1- local recurrence; 2- distant recurrence/metastasis; 3- progression (liquid tumours); -777- Unknown; -888- Not applicable	14	
donor_age_at_diagnosis	15	Donor Age at Diagnosis (Age at primary diagnosis) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	15	Calc = 97-96
donor_age_at_enrollment	16	Donor Age at Enrollment (Age at which first specimen was collected) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	16	Calc = 98-96
donor_age_at_last_followup	17	Donor Age at Last Followup (Age at last followup) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	17	Calc = var.4FU-96
donor_relapse_interval	18	Donor Relapse Interval (If donor was clinically disease free following primary therapy and relapse or progression (for liquid tumours) occurred, length of disease free interval, in days) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	18	Calc=146-101
donor_diagnoses_icd10	19	Donor Diagnosis ICD-10 (ICD-10 diagnostic code) TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	19	C64
donor_tumour_staging_system_at_diagnosis	20	Donor Tumour Staging System at Diagnosis (Clinical staging system used at time of diagnosis, if determined. Note that this is supplementary to specimen's pathological staging) TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	20	AJCC7
donor_tumour_stage_at_diagnosis	21	Donor Tumour Stage at Diagnosis (Stage at diagnosis using indicated staging system. Note that this is supplementary to specimen's pathological staging) TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	21	

donor_tumour_stage_at_diagnosis_supplemental	22	Donor Tumour Stage at Diagnosis Supplemental (Optional additional staging provided as a comma-delimited list of 'staging system:stage') TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	22	OPTIONAL
donor_survival_time	23	Donor Survival Time (How long has donor survived since primary diagnosis, in days. If source data was collected in months, use a multiplier value of '30.44' to convert value to days when preparing submission) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	23	Calc=147-97
donor_interval_of_last_followup	24	Donor Interval of Last Followup (Interval from primary diagnosis to last followup date. ICGC requests that patients be followed up every 6 months while alive) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	24	Calc=dt_ult_FU-97
donor_notes	25	Donor Notes (Free text notes concerning donor) - Optional - Controlled TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	25	OPTIONAL
prior_malignancy	26	Prior Malignancy 1- Yes; 2- No; 3- Unknown Required; -777- Unknown; -888- Not applicable	26	
cancer_type_prior_malignancy	27	Cancer Type Prior Malignancy (ICD-10 diagnostic code for type of cancer in a prior malignancy) TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	27	
cancer_history_first_degree_relative	28	Cancer History First Degree Relative (Does patient have a first degree relative that has a history of cancer? If yes, please provide clinical information about relative's cancer history in Donor Family file) 1- Yes; 2- No; 3- Unknown Required; -777- Unknown	28	
donor_primary_treatment_interval	145	Interval between primary diagnosis and primary treatment, in days	145	Calc=97-146
SPECIMEM TUMOUR				
specimen_id	29	Specimen ID (Unique identifier for a collected specimen assigned by data provider) TEXT	29	
specimen_type	30	Specimen Type 102- Normal - blood derived; 108- Normal – other; 109- Primary tumour - solid tissue; 112- Primary tumour - additional new primary; 113- Primary tumour - other; 114- Recurrent tumour - solid tissue; 117- Recurrent tumour - other; 119- Metastatic tumour - lymph node; 120- Metastatic tumour - metastasis local to lymph node; 121- Metastatic tumour - metastasis to distant location; 122- Metastatic tumour - additional metastatic	30	
specimen_type_other	31	Specimen Type Other (Free text description of site of specimen if 'normal control (other)' or 'tumour (other)' was specified in specimen_type field) TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	31	
specimen_interval	32	Specimen Interval (Interval between primary diagnosis and specimen acquisition, in days) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	32	Calc=98-97
specimen_donor_treatment_type	33	Specimen Donor Treatment Type (Type of treatment the donor received prior to specimen acquisition) 1- no treatment; 2- chemotherapy; 3- radiation therapy; 4- combined chemo + radiation therapy; 5- immunotherapy; 6- combined hemo+immunotherapy; 7- surgery; 8- other therapy; -777- Unknown; -888- Not applicable	33	
specimen_donor_treatment_type_other	34	Specimen Donor Treatment Type Other (If 'other' therapy indicated in previous column, describe it here. eg: molecular) TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	34	
specimen_processing	35	Specimen Processing (Description of technique used to process specimen) - Required 1 - Cryopreservation in liquid nitrogen (dead tissue); 2-Cryopreservation in dry ice (dead tissue); 3- Cryopreservation of live cells in liquid nitrogen; 4- Cryopreservation, other; 5- Formalin fixed, unbuffered; 6- Formalin fixed, buffered; 7- Formalin fixed & paraffin embedded; 8- Fresh; 9- Other technique; -777- Unknown; -888- Not applicable	35	2
specimen_processing_other	36	Specimen Processing Other (If 'other' specified for specimen_processing, may indicate technique here) - Required TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	36	-888

specimen_storage	37	Specimen Storage (Description of how specimen was stored. For specimens that were extracted freshly or immediately cultured, answer (1) 'NA'.) - Required 1- Frozen, liquid nitrogen; 2- Frozen, -70 freezer; 3- Frozen, vapor phase; 4- RNA later frozen; 5- Paraffin block; 6- Cut slide; 7- Other; -777- Unknown; -888- Not applicable	37	2
specimen_storage_other	38	Specimen Storage Other (If 'other' specified for specimen_storage, may indicate technique here.) - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	38	-888
tumour_confirmed	39	Tumour Confirmed (Whether tumour was confirmed in the specimen by histological examination.) - Required 1- Yes; 2- No; -777- Unknown; -888- Not applicable	39	1
specimen_biobank	40	Specimen Biobank (If the specimen was obtained from a biobank, provide the biobank name here) - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	40	Biobank at Barretos Cancer Hospital
specimen_biobank_id	41	Specimen Biobank ID (If the specimen was obtained from a biobank, provide the biobank accession number here) - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	41	
specimen_available	42	Specimen Available (Whether additional tissue is available for followup studies) - Required 1- Yes; 2- No; -777- Unknown; -888- Not applicable	42	
tumour_histological_type	43	Tumour Histological Type (WHO International Histological Classification of Tumours' code. See IARC's website for details) - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	43	8312/3 - Renal Cell Carcinoma
tumour_grading_system	44	Tumour Grading System (Name of tumour grading system) - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	44	Fuhrman
tumour_grade	45	Tumour Grade (Tumour grade using indicated grading system) - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	45	
tumour_grade_supplemental	46	Tumour Grade Supplemental (Optional additional grading provided as a comma-delimited list of 'grading system:grade') - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	46	OPTIONAL
tumour_stage_system	47	Tumour Stage System (Name of tumour staging system used) - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	47	AJCC7
tumour_stage	48	Tumour Stage (Pathological tumour stage value using indicated staging system) - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	48	
tumour_stage_supplemental	49	Tumour Stage Supplemental (Optional additional staging provided as a comma-delimited list of 'staging system:stage') - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	49	OPTIONAL
digital_image_of_stained_section	50	Digital Image of Stained Section (Linkout(s) to digital image of a stained section, demonstrating a representative section of tumour) - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	50	-777
percentage_cellularity_specimen	51	Percentage Cellularity (The ratio of tumour nuclei to total number of nuclei in a given specimen expressed as a percentage. Can populate information in either this field or level_of_cellularity) - Required INTEGER ; -777- Unknown; -888- Not applicable Required	51	
level_of_cellularity	52	Level of Cellularity (The proportion of tumour nuclei to total number of nuclei in a given specimen. If exact percentage cellularity cannot be determined submitter has option to use this field to specify a level that defines a range of percentage) - Required 1 - 1-20%; 2- 21-40%; 3- 41-60%; 4- 61-80%; 5- >81%; -777- Unknown; -888- Not applicable	52	4
specimen_notes	53	Specimen Notes (Free text notes allowed) - Optional – Controlled TEXT	53	OPTIONAL
SPECIMEN BLOOD				
b_specimen_id	29	Specimen ID (Unique identifier for a collected specimen assigned by data provider) TEXT	29	
b_specimen_type	30	Specimen Type 102- Normal - blood derived; 108- Normal - other; 109- Primary tumour - solid tissue; 112- Primary tumour - additional new primary; 113- Primary tumour - other; 114- Recurrent tumour - solid tissue; 117- Recurrent tumour - other; 119- Metastatic tumour - lymph node; 120- Metastatic tumour - metastasis local to lymph node; 121- Metastatic tumour - metastasis to distant location; 122- Metastatic tumour - additional metastatic	30	102

b_specimen_type_other	31	Specimen Type Other (Free text description of site of specimen if 'normal control (other)' or 'tumour (other)' was specified in specimen_type field) TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	31	-888
b_specimen_interval	32	Specimen Interval (Interval between primary diagnosis and specimen acquisition, in days) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	32	Calc=99-97
b_specimen_donor_treatment_type	33	Specimen Donor Treatment Type (Type of treatment the donor received prior to specimen acquisition) 1- no treatment; 2- chemotherapy; 3- radiation therapy; 4- combined chemo + radiation therapy; 5- immunotherapy; 6- combined hemo+immunotherapy; 7- surgery; 8- other therapy; -777- Unknown; -888- Not applicable	33	
b_specimen_donor_treatment_type_other	34	Specimen Donor Treatment Type Other (If 'other' therapy indicated in previous column, describe it here. eg: molecular) TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	34	
b_specimen_processing	35	Specimen Processing (Description of technique used to process specimen) – Required 1 - Cryopreservation in liquid nitrogen (dead tissue); 2- Cryopreservation in dry ice (dead tissue); 3- Cryopreservation of live cells in liquid nitrogen; 4- Cryopreservation, other; 5- Formalin fixed, unbuffered; 6- Formalin fixed, buffered; 7- Formalin fixed & paraffin embedded; 8- Fresh; 9- Other technique; -777- Unknown; -888- Not applicable	35	2
b_specimen_processing_other	36	Specimen Processing Other (If 'other' specified for specimen_processing, may indicate technique here) - Required TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	36	-888
b_specimen_storage	37	Specimen Storage (Description of how specimen was stored. For specimens that were extracted freshly or immediately cultured, answer (1) 'NA'.) - Required 1- Frozen, liquid nitrogen; 2- Frozen, -70 freezer; 3- Frozen, vapor phase; 4- RNA later frozen; 5- Paraffin block; 6- Cut slide; 7- Other; -777- Unknown; -888- Not applicable	37	2
b_specimen_storage_other	38	Specimen Storage Other (If 'other' specified for specimen_storage, may indicate technique here.) - Required TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	38	-888
b_tumour_confirmed	39	Tumour Confirmed (Whether tumour was confirmed in the specimen by histological examination.) - Required 1- Yes; 2- No; -777- Unknown; -888- Not applicable	39	-888
b_specimen_biobank	40	Specimen Biobank (If the specimen was obtained from a biobank, provide the biobank name here) - Required TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	40	Biobank at Barretos Cancer Hospital
b_specimen_biobank_id	41	Specimen Biobank ID (If the specimen was obtained from a biobank, provide the biobank accession number here) - Required TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	41	
b_specimen_available	42	Specimen Available (Whether additional tissue is available for followup studies) - Required 1- Yes; 2- No; -777- Unknown; -888- Not applicable	42	
b_tumour_histological_type	43	Tumour Histological Type ('WHO International Histological Classification of Tumours' code. See http://w2.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb2/BB2.pdf) - Required TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	43	-888
b_tumour_grading_system	44	Tumour Grading System (Name of tumour grading system) - Required TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	44	-888
b_tumour_grade	45	Tumour Grade (Tumour grade using indicated grading system) - Required TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	45	-888
b_tumour_grade_supplemental	46	Tumour Grade Supplemental (Optional additional grading provided as a comma-delimited list of 'grading system:grade') – Required TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	46	-888
b_tumour_staging_system	47	Tumour Stage System (Name of tumour staging system used) - Required TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	47	-888
b_tumour_stage	48	Tumour Stage (Pathological tumour stage value using indicated staging system) – Required; TEXT -777- Unknown; -888- Not applicable	48	-888
b_tumour_stage_supplemental	49	Tumour Stage Supplemental (Optional additional staging provided as a comma-delimited list of 'staging system:stage') – Required; TEXT -777- Unknown; -888- Not applicable	49	-888

b_digital_image_of_stained_section	50	Digital Image of Stained Section (Linkout(s) to digital image of a stained section, demonstrating a representative section of tumour) – Required; TEXT -777- Unknown; -888- Not applicable	50	-888
b_percentage_cellularity_specimen	51	Percentage Cellularity (The ratio of tumour nuclei to total number of nuclei in a given specimen expressed as a percentage. Can populate information in either this field or level_of_cellularity) – Required; INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	51	-888
b_level_of_cellularity	52	Level of Cellularity (The proportion of tumour nuclei to total number of nuclei in a given specimen. If exact percentage cellularity cannot be determined submitter has option to use this field to specify a level that defines a range of percentage) - Required 1- 1-20%; 2- 21-40%; 3- 41-60%; 4- 61-80%; 5- >81%; -777- Unknown; -888- Not applicable Required	52	-888
b_specimen_notes	53	Specimen Notes (Free text notes allowed) - Optional-Controlled- TEXT	53	OPTIONAL
SAMPLE TUMOUR				
analyzed_sample_id	54	Analyzed Sample ID (A unique identifier representing the particular sample that was analyzed; analyzed sample identifiers must be used consistently to relate those described in the sample file and in the related analysis files) TEXT	54	
specimen_id	55	Specimen ID (Unique identifier for a collected specimen assigned by data provider) – Required-TEXT; -777- Unknown	55	
analyzed_sample_interval	56	Analyzed Sample Interval (Interval from specimen acquisition to sample use in an analytic procedure (e.g. DNA extraction), in days) – Optional – INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	56	CALC
percentage_cellularity	57	Percentage Cellularity (The cellularity (ratio of tumour nuclei to total number of nuclei in a given sample) of the analyzed sample assessed by methods other than the pathologist's report (ie. cellularity derived from sequencing data). Can populate information in either this field or level_of_cellularity) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	57	
level_of_cellularity	58	Level of Cellularity (The cellularity (proportion of tumour nuclei to total number of nuclei in a given sample) of the analyzed sample assessed by methods other than the pathologist's report (ie. cellularity derived from sequencing data). If exact percentage cellularity cannot be determined, submitter has option to use this field to specify a level that defines a range of percentages) 1- 1-20%; 2- 21-41%; 3- 41-60%; 4- 61-80%; 5->81%; -777- Unknown; -888- Not applicable	58	
analyzed_sample_notes	59	Analyzed Sample Notes (Free text notes about sample allowed) – Optional – Controlled TEXT -777- Unknown; -888- Not applicable	59	OPTIONAL
study	60	Study (Indicate if sample is part of a study) – Optional 1- PanCancer Study; -777- Unknown; -888- Not applicable	60	OPTIONAL
SAMPLE BLOOD				
b_analyzed_sample_id	54	Analyzed Sample ID (A unique identifier representing the particular sample that was analyzed; analyzed sample identifiers must be used consistently to relate those described in the sample file and in the related analysis files) TEXT	54	
b_specimen_id	55	Specimen ID (Unique identifier for a collected specimen assigned by data provider) – Required-TEXT; -777- Unknown	55	
b_analyzed_sample_interval	56	Analyzed Sample Interval (Interval from specimen acquisition to sample use in an analytic procedure (e.g. DNA extraction), in days) – Optional – INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	56	CALC
b_percentage_cellularity	57	Percentage Cellularity (The cellularity (ratio of tumour nuclei to total number of nuclei in a given sample) of the analyzed sample assessed by methods other than the pathologist's report (ie. cellularity derived from sequencing data). Can populate information in either this field or level_of_cellularity) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	57	-888
b_level_of_cellularity	58	Level of Cellularity (The cellularity (proportion of tumour nuclei to total number of nuclei in a given sample) of the analyzed sample assessed by methods other than the pathologist's report (ie. cellularity derived from sequencing data). If exact percentage cellularity cannot be determined, submitter has option to use this field to specify a level that defines a range of percentages) 1- 1-20%; 2- 21-41%; 3- 41-60%; 4- 61-80%; 5->81%; -777- Unknown; -888- Not applicable	58	-888
b_analyzed_sample_notes	59	Analyzed Sample Notes (Freetext notes about sample allowed) – Optional – Controlled- TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	59	OPTIONAL
b_study	60	Study (Indicate if sample is part of a study) – Optional 1- PanCancer Study; -777- Unknown; -888- Not applicable	60	OPTIONAL

FAMILY				
donor_has_relative_with_cancer_history	64	Donor Has Relative with Cancer History (Does patient have any relatives with a history of cancer?) - Required 1- Yes; 2- No; 3- Unknown; -777- Unknown	64	
relationship_type	65	Relationship Type (Relationship to the donor) 1- sibling; 2- parent; 3- grandparent; 4- uncle/aunt; 5- cousin; 6- other	65	
relationship_type_other	66	Relationship Type Other (If 'other' answered in previous column, specify the relationship type here) TEXT -777- Unknown; -888- Not applicable	66	
relationship_sex	67	Relationship Sex (Biological sex of related individual) 1- male; 2- female; -777- Unknown; -888- Not applicable	67	
relationship_age	68	Relationship Age (Age of relative at primary diagnosis (years)) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	68	
relationship_disease_icd10	69	Relationship Disease ICD-10 (ICD-10 code for the relative's disease) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	69	
relationship_disease	70	Relationship Disease (Disease name) - INTEGER -777- Unknown; -888- Not applicable	70	
EXPOSURE				
exposure_type	71	Exposure Type (Type of exposure. This is a controlled vocabulary term to be developed by the submitting group) TEXT	71	-888
exposure_intensity	72	Exposure Intensity 0- No exposition; 1- Chronic; 2- Non-chronic; 3- Others	72	0
exposure_notes	73	Exposure Notes (Free text notes) - Controlled TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	73	-888
tobacco_smoking_history_indicator	74	Tobacco Smoking History Indicator (Donor's smoking history) - Required 1- Lifelong non-smoker (<100 cigarettes smoked in lifetime); 2- Current smoker (includes daily smokers non-daily/occasional smokers); 3- Current reformed smoker for > 15 years; 4- Current reformed smoker for <= 15 years; 5- Current reformed smoker, duration not specified; 6- Smoking history not documented; -777- Unknown	74	
tobacco_smoking_intensity	75	Tobacco Smoking Intensity (Smoking intensity in Pack Years: Number of pack years defined as the number of cigarettes smoked per day times (x) the number of years smoked divided (/) by 20. If patient has no tobacco smoking history (ie. tobacco_smoking_history_indicator is either '1' (non-smoker) or '6' (not documented), enter '-888' (not applicable) in this field.) This field is required if the tobacco_smoking_history_indicator field is 2-5 (smoker) - INTEGER - Required -777- Unknown; -888- Not applicable	75	
alcohol_history	76	Alcohol History (A response to a question that asks whether the patient has consumed at least 12 drinks of any alcoholic beverage in their lifetime.) - Required 1- Yes; 2- No; 3- Don't know/Not sure; -777- Unknown	76	
alcohol_history_intensity	77	Alcohol History Intensity (Alcohol exposure intensity. If patient does not have alcohol history (ie. alcohol_history field is either '2'(no) or '3'(do not know), enter '-888' (not applicable) in this field.) - Required 1- None; 2- Social Drinker (> once a month, < once a week); 3- Weekly Drinker (>=1x a week); 4- Daily Drinker; 5- Occasional Drinker (< once a month); 6- Not Documented; -777- Unknown	77	
SURGERY				
procedure_interval	78	Procedure Interval (Interval between primary diagnosis and procedure, in days) - INTEGER ; -777- Unknown; -888- Not applicable	78	Calc=100-97
procedure_type	79	Procedure Type (Controlled vocabulary description of the procedure type. Vocabulary can be extended by disease-specific projects. Prefix extensions with 3-digit center code, e.g. 008.1 Beijing Cancer Hospital, fine needle aspiration of primary) 1- surgical resection of primary; 2- surgical resection of local recurrence; 3- surgical resection of distant recurrence (metastasis); 4- lymph node dissection performed at time of resection of primary; 5- biopsy of primary; 6- biopsy of local recurrence; 7- biopsy of distant recurrence; 8- other	79	

procedure_site	80	Procedure Site (Anatomical site of the procedure. This must use a standard controlled vocabulary which should be reported in advance to the DCC) TEXT	80	KIDNEY
resection_statuses	81	Resection Status (For resection procedures, an indication of the extent of residual disease) 1- R0 - no apparent residual disease; 2- R1 - microscopic residual disease; 3- R2 - gross residual disease; -777- Unknown; -888- Not applicable	81	
specimen_id_specimen	82	Specimen ID (ID of ICGC specimen resulting from procedure. If present, must match specimen_id in specimen data file) – INTEGER - TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	82	
THERAPY				
first_therapy_start_interval	83	First Therapy Start Interval (Interval between primary diagnosis and initiation of the first postresection therapy, in days) INTEGER - Required -777- Unknown; -888- Not applicable	83	Calc=103-97
first_therapy_duration	84	First Therapy Duration (Duration of first postresection therapy, in days) INTEGER - Required -777- Unknown; -888- Not applicable	84	Calc=104-103
first_therapy_type	85	First Therapy Type (Type of first postresection therapy) Required 1- No treatment; 2- Chemotherapy; 3- Radiation therapy; 4- Combined chemo+radiation therapy; 5- Immunotherapy; 6- Combined chemo+immunotherapy; 7- Surgery; 8- Other therapy; 9- Bone marrow transplant; 10- Stem cell transplant; 11- Monoclonal antibodies (for liquid tumours); -777- Unknown	85	
first_therapy_response	86	First Therapy Response (What was the clinical effect of the first postresection therapy?) - Use this field to describe the clinical effect of the type of therapy described in 'first_therapy_type' - Required 1- Complete response; 2- Partial response; 3- Disease progression; 4- Stable disease; 5- unknown; -777- Unknown; -888- Not applicable	86	
first_therapy_therapeutic_intent	87	First Therapy Therapeutic Intent (The therapeutic intent of the first post resection therapy) Use this field to describe the therapeutic intent of the type of therapy described in 'first_therapy_type' - Required 1- Not applicable; 2- adjuvant; 3- curative; 4- palliative; -777- Unknown	87	
second_therapy_start_interval	88	Second Therapy Start Interval (Interval between primary diagnosis and initiation of the second postresection therapy, in days) INTEGER - Required -777- Unknown; -888- Not applicable	88	CALC=105-97
second_therapy_duration	89	Second Therapy Duration (Duration of second postresection therapy, in days) INTEGER - Required -777- Unknown; -888- Not applicable	89	CALC=106-105
second_therapy_type	90	Second Therapy Type (Type of second postresection therapy) - Required 1-No treatment; 2- Chemotherapy; 3- Radiation therapy; 4- Combined chemo + radiation therapy; 5- Immunotherapy; 6- Combined chemo + immunotherapy; 7- Surgery; 8- Other therapy; 9- Bone marrow transplant; 10- Stem cell transplant; 11- Monoclonal antibodies (for liquid tumours); -777Unknown	90	
second_therapy_response	91	Second Therapy Response (What was the clinical effect of the second postresection therapy?) Use this field to describe the clinical effect of the type of therapy described in 'second_therapy_type' - Required 1- Complete response; 2- Partial response; 3- Disease progression; 4- Stable disease; 5- unknown; -777- Unknown; -888- Not applicable	91	
second_therapy_therapeutic_intent	92	Second Therapy Therapeutic Intent (The therapeutic intent of the second postresection therapy) - Use this field to describe the therapeutic intent of the type of therapy described in 'second_therapy_type'- Required 1- Not applicable; 2- Adjuvant; 3- Curative; 4- Palliative; -777- Unknown	92	
other_therapy	93	Other Therapy (Other postresection therapy) Use this field to describe other therapies if either 'first_therapy_type' or 'second_therapy_type' are specified as 'other therapy' - Required - TEXT; -777- Unknown; -888- Not applicable	93	

other_therapy_response	94	Other Therapy Response (What is the clinical effect of the postresection therapy) Use this field to describe the response to the other therapy described in 'other_therapy' - Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	94	
therapy_notes	95	Therapy Notes (Further description of therapy, such as dosing schedule) Required TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	95	
DADOS ADICIONAIS NECESSÁRIOS PARA CALCULAR INTERVALOS/VARIÁVEIS DO CONSÓRCIO				
v_096_dt_nasc	96	Data de nascimento DD/MM/AAAA	96	___/___/___
v_097_dt_diag	97	Data do diagnóstico DD/MM/AAAA	97	___/___/___
v_098_dt_inclus_tu	98	Data de inclusão do paciente (data de coleta do TUMOR-1ª coleta) DD/MM/AAAA	98a	___/___/___
v_099_dt_inclus_sg	99	Data de inclusão do paciente (data de coleta do SANGUE-1ª coleta) DD/MM/AAAA	98b	___/___/___
v_100_dt_cirurgia	100	Data do procedimento (cirurgia ou biópsia) DD/MM/AAAA	99	___/___/___
	101	Data da progressão ou recidiva (considerar as fichas de follow up e colocar aqui sempre a última data) DD/MM/AAAA	100	___/___/___
v_103_dt_inicio_1_terapia	103	Início da 1ª terapia DD/MM/AAAA	103	___/___/___
v_104_dt_termino_1_terapia	104	Termino da 1ª terapia DD/MM/AAAA	104	___/___/___
v_105_dt_inicio_2_terapia	105	Início da 2ª terapia DD/MM/AAAA	105	___/___/___
v_106_dt_termino_2_terapia	106	Termino da 2ª terapia DD/MM/AAAA	106	___/___/___
v_107_dt_inicio_outra_terapia	107	Início da outra terapia (se houver) DD/MM/AAAA	107	___/___/___
v_108_dt_termino_outra_terapia	108	Termino da outra terapia (se houver) DD/MM/AAAA	108	___/___/___
v_146_dt_prim_trat	146	Data do primeiro tratamento DD/MM/AAAA	146	___/___/___
v_147_dt_obito	147	Data do óbito DD/MM/AAAA	147	___/___/___
ADDITIONAL CLINIC				
v_109_donor_race	109	Donor Race 1- White; 2- Afro descendant; 3- Yellow; 4- Mixed	109	
v_111_method_cancer	111	Method of Cancer Sample Procurement 1- Surgical Resection; 2- Incisional Biopsy; 3- Excisional Biopsy; 4- Other Method (especificar)	111	
v_112_histological_type	112	Tumor Histological Type 1- Células claras; 2- Papilífero; 3- Cromóforo 4- outros (especificar)	112	
v_113_histological_type_other	113	Tumor Histological Type Other TEXT ; -777- Unknown; -888- Not applicable	113	
v_118_t	118	T 0- 0; 1- 1; 2- 2; 3- 3; 4- 4; 5- 5; 6- X; 7-is; -777- Unknown	118	
v_119_n	119	N 0- 0; 1- 1; 2- 2; 3- 3; 4-X; -777- Unknown	119	
v_120_m	120	M 0- 0; 1- 1; -777- Unknown	120	
v_123_dt_normal_sample	123	Date of Normal Sample Procurement (DATA COLETA SANGUE) DD/MM/AAAA	123	___/___/___
v_124_type_normal_control	124	Type(s) of Normal Control 1- Whole Blood; 2- Buffy Coat; 3- Lymphocytes; 4 - Extracted DNA from Blood; 5- Non-Neoplastic Control Tissue	124	

INFORMAÇÕES DA EXTRAÇÃO DNA/RNA – AMOSTRA TUMORAL					
v_125_dt_coleta_tumor	125	Data de coleta do tumor (relacionada à variável 30)	DD/MM/AAAA	125a	___/___/___
v_126_tecido_tumoral	126	Tecido tumoral	%; -888- Não se aplica	126	
v_127_necrose	127	Necrose	%; -888- Não se aplica	127	
v_128_descricao_ma_dna_tum	128	Descrição (DNA/RNA)	1- DNA; 2- RNA; -777- Unknown; -888- Not applicable	128	1
v_129_dt_extracao_tum	129	Data da extração	DD/MM/AAAA	129	___/___/___
v_130_concentracao_tum	130	Concentração	Em ng/uL	130	
v_131_vol_eluicao_tum	131	Vol.eluição	Em ul	131	50
v_132_metodo_extracao_tum	132	Método de Extração	1- Manual; 2- Automatizado; -777- Ignorado	132	1
v_133_qual_kit_tum	133	Kit utilizado	1- DNeasy Blood and tissue; 2- RNeasy kit; -777- Ignorado	133	1
v_134_absorbancia_a260_280_tum	134	Absorbância A260/280	Número	134	
v_135_absorbancia_a260_230_tum	135	Absorbância A260/230	Número	135	
INFORMAÇÕES DA EXTRAÇÃO DNA/RNA - AMOSTRA SANGÜÍNEA					
v_136_dt_coleta_sangue	136	Data da coleta do sangue	DD/MM/AAAA	136	___/___/___
v_137_descricao_ma_dna_sang	137	Descrição (DNA/RNA)	1- DNA; 2- RNA; -888- Não se aplica	137	1
v_138_dt_extracao_sang	138	Data da extração	DD/MM/AAAA	138	___/___/___
v_139_concentracao_sang	139	Concentração	Em ng/uL	139	
v_140_vol_eluicao_sang	140	Vol.eluição	Em ul	140	50
v_141_metodo_extracao_sang	141	Método de Extração	1- Manual; 2- Automatizado; -777- Ignorado	141	
v_142_qual_kit_sang	142	Kit utilizado	1- DNeasy Blood and tissue; 2- RNeasy kit; -777- Ignorado	142	
v_143_absorbancia_a260_280_sang	143	Absorbância A260/280	Número	143	
v_144_absorbancia_a260_230_sang	144	Absorbância A260/230	Número	144	

FOLLOW UP - ICGC		
Follow-up atualizado (preencher a informação mais atualizada nesse bloco. Coletar os dados de cada atualização nos campos abaixo, mas manter as variáveis sublinhadas do primeiro bloco sempre atualizados)		
1	<u>Data do ultimo follow-up</u>	___/___/___
2	Donor Age at Last Followup (Age at last followup)	Campo calculado
3	Donor Interval of Last Followup (Interval from primary diagnosis to last followup date)	Campo calculado
4	<u>Donor Vital Status (Donor's last known vital status)</u> 1- alive; 2- deceased; -777- Unknown; -888 - Not applicable	
5	<u>Disease Status Last Followup (Donor's last known disease status)</u> 1- complete remission; 2 - partial remission; 3 - progression; 4 - relapse; 5 - stable; -777 - Unknown; -888 - Not applicable	

Primeiro follow-up		
Deixar sempre atualizado o primeiro bloco de follow up (base para envio de dados para o consórcio)		
6	Numero da release	
7	Data desse follow up DD/MM/AAAA	___/___/_____
8	Contato 1 - Consulta; 2 - Ligação telefônica com paciente; 3 - Ligação telefônica familiar; -777 - Data verified to be unknown; -888 - Not applicable	
9	Se contato com familiar, qual o familiar?	
10	Donor Vital Status (Donor's last known vital status) 1- alive; 2- deceased; -777- Unknown; -888 - Not applicable	
11	Disease Status Last Followup 1 - complete remission; 2 - partial remission; 3 - progression; 4 - relapse; 5 - stable; -777 - Data verified to be unknown; -888 - Not applicable	
Segundo follow-up		
Deixar sempre atualizado o primeiro bloco de follow up (base para envio de dados para o consórcio)		
12	Numero da release	
13	Data desse follow up DD/MM/AAAA	___/___/_____
14	Contato 1 - Consulta; 2 - Ligação telefônica com paciente; 3 - Ligação telefônica familiar; -777 - Data verified to be unknown; -888 - Not applicable	
15	Se contato com familiar, qual o familiar?	
16	Donor Vital Status (Donor's last known vital status) 1- alive; 2- deceased; -777- Unknown; -888 - Not applicable	
17	Disease Status Last Followup 1 - complete remission; 2 - partial remission; 3 - progression; 4 - relapse; 5 - stable; -777 - Unknown; -888 - Not applicable	
Terceiro follow-up		
Deixar sempre atualizado o primeiro bloco de follow up (base para envio de dados para o consórcio)		
18	Numero da release	
19	Data desse follow up DD/MM/AAAA	___/___/_____
20	Contato 1 - Consulta; 2 - Ligação telefônica com paciente; 3 - Ligação telefônica familiar; -777 - Data verified to be unknown; -888 - Not applicable	
21	Se contato com familiar, qual o familiar?	
22	Donor Vital Status (Donor's last known vital status) 1- alive; 2- deceased; -777- Unknown; -888 - Not applicable	
23	Disease Status Last Followup 1 - complete remission; 2 - partial remission; 3 - progression; 4 - relapse; 5 - stable; -777 - Data verified to be unknown; -888 - Not applicable	

Quarto follow-up		
Deixar sempre atualizado o primeiro bloco de follow up (base para envio de dados para o consórcio)		
24	Numero da release	
25	Data desse follow up	DD/MM/AAAA ___/___/_____
26	Contato 1 - Consulta; 2 - Ligação telefônica com paciente; 3 - Ligação telefônica familiar; -777 - Unknown; -888 - Not applicable	
27	Se contato com familiar, qual o familiar?	
28	Donor Vital Status (Donor's last known vital status) 1- alive; 2- deceased; -777- Unknown; -888 - Not applicable	
29	Disease Status Last Followup 1 - complete remission; 2 - partial remission; 3 - progression; 4 - relapse; 5 - stable; -777 - Unknown; -888 - Not applicable	
Quinto follow-up		
Deixar sempre atualizado o primeiro bloco de follow up (base para envio de dados para o consórcio)		
30	Numero da release	
31	Data desse follow up	DD/MM/AAAA ___/___/_____
32	Contato 1 - Consulta; 2 - Ligação telefônica com paciente; 3 - Ligação telefônica familiar; -777 - Unknown; -888 - Not applicable	
33	Se contato com familiar, qual o familiar?	
34	Donor Vital Status (Donor's last known vital status) 1- alive; 2- deceased; -777- Unknown; -888 - Not applicable	
35	Disease Status Last Followup 1 - complete remission; 2 - partial remission; 3 - progression; 4 - relapse; 5 - stable; -777 - Unknown; -888 - Not applicable	
Sexto follow-up		
Deixar sempre atualizado o primeiro bloco de follow up (base para envio de dados para o consórcio)		
37	Numero da release	
38	Data desse follow up	DD/MM/AAAA ___/___/_____
39	Contato 1 - Consulta; 2 - Ligação telefônica com paciente; 3 - Ligação telefônica familiar; -777 - Unknown; -888 - Not applicable	
40	Se contato com familiar, qual o familiar?	
41	Donor Vital Status (Donor's last known vital status) 1- alive; 2- deceased; -777- Unknown; -888 - Not applicable	
42	Disease Status Last Followup 1 - complete remission; 2 - partial remission; 3 - progression; 4 - relapse; 5 - stable; -777 - Unknown; -888 - Not applicable	

Informações adicionais - Projeto Mestrado			
1	Tamanho do tumor na maior dimensao (em cm)	1	
1a	Tamanho do tumor - Observações adicionais	1a	
2	Neutrófilos 2.400–7.300 /mm ³	2	
3	Linfócitos 120–700 /mm ³	3	
4	Tempo Diagnóstico-Tratamento (cirurgia) Data Diagnóstico: Data 1º Tratamento:	4	 _ / _ / _ _ / _ / _
5	Peso: Altura:	5	
6	Hipertensão (sim ou não)	6	
7	Intenção da Nefrectomia 1- Curativa 2- Paliativa 3- Adjuvante -888 Not aplicable	7	
8	Data Recidiva/Progressão:	8	
9	Fez tratamento sistêmico? Qual?	9	
10	Data inicio terapia sistêmica	10	_ / _ / _
11	Data fim terapia sistêmica	11	_ / _ / _
12	Outros: doença renal crônica, hemodiálise, transplante, diagnóstico prévio de RCC e diabetes mellitus. Descrever.	12	

Declaração de Conclusão

Declaro a pedido da interessada e para os devidos fins que Flávia Gonçalves Fernandes concluiu a Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – área de Oncologia, da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, sob a orientação da Profa. Dra. Adriane Feijó Evangelista.

A aluna defendeu publicamente a Dissertação intitulada: “Análise de alterações somáticas do número de cópias de DNA do carcinoma renal de células claras”, perante a Comissão Julgadora constituída pelos professores: Dra Ana Cristina Victorino Krepisch, Dr. Stenio de Cassio Zequi, no dia 16 de junho de 2020.

Após julgamento, a candidata foi considerada aprovada e a ata da Banca Julgadora será homologada pelo Conselho de Pós-Graduação.

Informo que o programa de Mestrado desta Instituição teve seu reconhecimento homologado pelo CNE (PORT. MEC 1364, DE 29/09/2011, DOU 30/09/2011, seç.1, p.40) e o programa de doutorado foi homologado pelo CNE (Port. MEC 1331, de 08/11/2012, DOU 09/11/2012, sec 1, p. 8).

Declaro ainda que o diploma da interessada encontra-se em expedição e registro na secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos.

Barretos, 16 de junho de 2020.



Carolina Sgorlon Jorgetto
Supervisora Administrativo
Pós-Graduação em Oncologia