



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

TÁSSIA OLIVEIRA BIAZON

AVALIAÇÃO DE CANDIDATOS A BIOMARCADORES
MOLECULARES PARA PACIENTES COM TUMOR DE
WILMS NO BRASIL

CAMPINAS

2023

TÁSSIA OLIVEIRA BIAZON

**AVALIAÇÃO DE CANDIDATOS A BIOMARCADORES
MOLECULARES PARA PACIENTES COM TUMOR DE WILMS NO
BRASIL**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Genética e Biologia Molecular,
na Área de Genética Animal*

Orientadora: DRA. MARIANA CAMARGO MASCHIETTO

Coorientador: DR. JOSÉ ANDRÉS YUNES

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA TÁSSIA OLIVEIRA
BIAZON, E ORIENTADA PELA DRA. MARIANA
CAMARGO MASCHIETTO

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B47a Biazon, Tássia Oliveira, 1990-
Avaliação de candidatos a biomarcadores moleculares para pacientes com tumor de Wilms no Brasil / Tássia Oliveira Biazon. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Mariana Camargo Maschietto.
Coorientador: José Andrés Yunes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Nefroblastoma. 2. Tumores embrionários. 3. Biomarcadores tumorais. 4. Amplificação multiplex de sondas dependente de ligação. I. Maschietto, Mariana, 1980-. II. Yunes, José Andrés, 1967-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Evaluation of molecular biomarker candidates for patients with Wilms tumor in Brazil

Palavras-chave em inglês:

Nephroblastoma

Embryonal tumors

Biomarkers, Tumor

Multiplex ligation-dependent probe amplification

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Mariana Camargo Maschietto [Orientador]

Maraysa de Oliveira Melo

Maria Cristina Rodrigues Rangel

Data de defesa: 15-12-2023

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5577-8061>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9712136258915399>

Campinas, 15 de dezembro de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Mariana Camargo Maschietto

Profa. Dra. Maraysa de Oliveira Melo

Profa. Dra. Maria Cristina Rodrigues Rangel

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp

DEDICATÓRIA

Ao meu amor, William, meu companheiro de vida, de sonhos e de desafios, que com muito carinho e paciência, me permite ser melhor a cada dia.

À minha mãe, Daveniza, e ao meu pai, Gilmar, pelo amor e dedicação em todas as fases da minha vida.

Aos pacientes com tumor de Wilms do passado, do presente e do futuro, e em especial àqueles que participaram deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor, Deus do Universo:

Por todas as bênçãos já recebidas e por todos os desafios já superados. Por conduzir-me pelos melhores caminhos. Agradeço a Deus por me permitir sentir, pensar e agir.

Ao meu amor, William:

Por ser a minha maior fonte de motivação, com quem divido todos os meus sonhos e as minhas conquistas. Por me proporcionar tantos sorrisos e por enxugar as minhas lágrimas. Pelo seu amor, parceria e paciência. Por sua presença em minha vida, tornando-a mais brilhante. Pelo nosso (re)encontro nesse vasto mundo, que eu ganhei com você.

Aos meus pais, Daveniza e Gilmar:

Por serem os maiores incentivadores da minha jornada profissional, que desde a infância me instruíram sobre a importância do estudo e da dedicação. Por me permitirem sonhar e por sonharem comigo. Pelo amor de cada dia e por tudo que não é possível materializar-se em palavras. Registro aqui a minha felicidade e a minha gratidão por serem vocês os meus primeiros mestres.

Ao meu irmão e cunhada, Gilmar Júnior e Christiane:

Pela cumplicidade e parceria, que desde sempre temos um com o outro e a certeza de que sempre poderemos olhar ao lado e saber que estaremos juntos para o que der e vier. Pelos momentos de críticas e de amadurecimento, mas também pelos de diversão e leveza.

Aos meus filhos de quatro patas, Soe Maria e Frederico:

Pelo amor incondicional de cada dia. Pela felicidade mais genuína. Por me fazerem sorrir mesmo quando o dia está cinza ou os experimentos foram um fracasso. Por olharem para mim como se eu fosse feita do material mais valioso deste Universo e por me presentearem diariamente com o pulsar de suas vidas.

Aos meus amigos, próximos e distantes:

Ao meu primeiro orientador, Prof. Claudio Oliveira, por ser o primeiro cientista a me inspirar na área das ciências biológicas. Aos meus amigos das universidades onde eu obtive muito conhecimento (Unesp, Unicamp, USP e Universidade de Coimbra), com quem formei uma família e vivi grandes experiências e aprendizados. Aos meus amigos de diferentes fases, de diferentes lugares e que de alguma forma me transformaram positivamente.

À minha orientadora, Mariana Maschietto:

Por aceitar orientar-me de uma maneira particularmente desafiante, com uma pandemia inesperada e um trabalho paralelo à pesquisa. Por abrir as portas do laboratório

e dar-me a liberdade para conduzir os experimentos. Por ter-me confortado durante os meus momentos de angústia. Pelo seu olhar crítico e construtivo que foram determinantes para eu finalizar essa etapa. Agradeço pelos momentos inspiradores, mostrando novos caminhos e novas perspectivas.

Ao Centro de Pesquisa Boldrini:

Ao Prof. Dr. José Andrés Yunes, por aceitar a coorientação deste trabalho e à Dra. Silvia Regina Brandalise, por ser o pilar de uma instituição que salva vidas. Às pessoas que proporcionaram momentos de aprendizado e ajuda, como Mônica, Carolina, Patrícia, Natália e Juliana. Ao Hospital do Centro Infantil Boldrini, em especial ao SAME (Fábio e Valdirene), à patologia (Dra. Izilda, Irineu e Aparecido) e ao corpo clínico (Dra. Iva e Dra. Camila), muito obrigada por cada pequena prestatividade, que foram fundamentais para a obtenção de documentos oficiais deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas, Unicamp:

Ao Instituto de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial ao Prof. Dr. Renato Vicentini dos Santos, que atendeu ao meu pedido, e ao Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas, que me ouviu diversas vezes sobre o dilema de atuar na área da ciência.

Aos professores das bancas:

Por gentilmente aceitarem integrar a comissão de julgamento das minhas bancas de qualificação, Prof. Dr. Fábio Papes, Profa. Dra. Ana Cristina Victorino Krepischi e Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo e de defesa, Dra. Maria Cristina Rodrigues Rangel e Dra. Maraysa de Oliveira Melo. Obrigada a cada um de vocês pelos questionamentos e pelas intervenções valiosas que me fizeram refletir e aperfeiçoar este trabalho.

Aos pacientes e seus familiares:

Por aceitarem participar deste estudo. Para que a ciência possa avançar dependemos de muitos fatores, entre eles a disposição de pessoas em ceder seus dados pessoais e biológicos. Não seria possível obter resultados profícuos neste estudo se não fossem pela doação dessas pessoas.

Aos apoios financeiros:

Da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do processo nº 2014/10250-7, bem como da Bolsa Jovem Pesquisador nº 2015/06281-7 concedida à Dra. Mariana Maschietto. Do Ministério Público do Trabalho–PAJ, por meio do processo (001585.2018.15.000/1). Da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), por meio do Código de Financiamento 001.

Por fim, gostaria de registrar que este trabalho é o resultado de um longo caminho, com altos e baixos, tristezas e alegrias, e, sobretudo, aprendizado. Aprendizado empírico e aprendizado pessoal: aprender a superar-se, a cumprir objetivos, a organizar-se, a confiar (e desconfiar), aprender a aprender.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente permitiram que este trabalho se tornasse uma realidade.

EPÍGRAFE

Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science: désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles.

Humanity certainly needs practical men, who get the most out of their work and without forgetting the general good, safeguard their own interests. But humanity also needs dreamers, for whom disinterested development of an enterprise is so captivating that it becomes impossible for them to devote their care to their own material profit. Without the slightest doubt, these dreamers do not deserve wealth, because they do not desire it. Even so, a well-organized society should assure such workers the efficient means of accomplishing their task in a life freed from material care and freely consecrated to research.

Marie Skłodowska-Curie (1867 - 1934)

RESUMO

O tumor de Wilms, ou nefroblastoma, é o câncer renal mais comum na infância, afetando uma em 10.000 crianças, com idade média entre 2 e 3 anos. Atualmente, devido à atuação de equipes multidisciplinares, 90% dos pacientes diagnosticados com tumor de Wilms são curados, entretanto, cerca de 25% dos pacientes recaem da doença, levando a uma diminuição da sobrevida para cerca de 50%. A histologia dos tumores de Wilms é utilizada como um dos principais fatores prognósticos, como a anaplasia difusa, que está associada a um prognóstico menos favorável. Outros fatores prognósticos incluem idade, estadiamento do tumor e perda de heterozigotidade nos cromossomos 1p e 16q para tumores tratados com cirurgia pré-quimioterapia. A implementação de biomarcadores moleculares em tumor de Wilms visa melhorar a estratificação de risco dos pacientes, e por isso, diversos candidatos vêm sendo testados por estudos clínicos internacionais. O objetivo deste estudo foi validar o uso de potenciais biomarcadores – alterações de número de cópias de *AMER1* (Xq), 1p, 1q, *MYCN* (2p), *WT1* (11p), 16q e *TP53* (17p) – para auxiliar na classificação de risco de pacientes com tumores de Wilms no Brasil. Para isso, foram coletadas informações clínicas e patológicas de todos os pacientes diagnosticados no Centro Infantil Boldrini no período de 2005 a 2020, totalizando 186 pacientes. Destes, 40 pacientes com amostras de tumor preservadas em RNA later armazenadas no biobanco da instituição, foram avaliadas pela técnica de Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA, do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) para quantificar o número de cópias dos biomarcadores candidatos. Para os experimentos que obtiveram um resultado ambíguo ou duvidoso, uma técnica ortogonal – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR, do inglês *quantitative real-time PCR*) – foi aplicada para confirmação. Dos 40 tumores avaliados, 20 apresentaram alterações cromossômicas. A alteração mais frequente foi o ganho de 1q (9/40-22,5%), seguido de perda de 16q (8/40-20%) e perda de 1p (6/40-15%). Um tumor de Wilms apresentou a perda de 1p e 16q concomitantes, referente a paciente que desenvolveu metástase durante o tratamento e foi a óbito. No grupo de tumores analisados, observou-se que houve um predomínio de alterações moleculares em pacientes com metástase ao diagnóstico, metástase durante o tratamento, progressão, recaída e óbito. Apenas um paciente que foi a óbito não apresentou alterações moleculares, os demais apresentaram alguma alteração genética, sendo o ganho de 1q a alteração mais frequente nesses pacientes. Além disso, a perda de 16q também foi mais frequente em pacientes com desfechos mais problemáticos. Contudo, alguns biomarcadores, como *WT1* e *MYCN*, não apresentaram associação significativa com a recaída e o óbito. Desse modo, as características dos pacientes atendidos no Centro Infantil Boldrini se assemelham com as características de outras coortes internacionais, mostrando que a perda em 1p e 16q e o ganho de 1q são potenciais biomarcadores para o prognóstico de sobrevida inferior em determinados pacientes com TW.

Palavras-chave: tumor de Wilms, tumor embrionário, biomarcadores, 1q

ABSTRACT

Wilms tumor, or nephroblastoma, is the most common kidney cancer in childhood, affecting one in 10,000 children, with an average age between 2 and 3 years. Currently, due to the work of multidisciplinary teams, 90% of patients diagnosed with Wilms tumor are cured, however, around 25% of patients recover from the disease, leading to a reduction in survival to around 50%. The histology of Wilms tumors is used as one of the main prognostic factors, such as diffuse anaplasia, which is associated with a less favorable prognosis. Other prognostic factors include age, tumor status, and loss of heterozygosity on chromosomes 1p and 16q for tumors treated with prechemotherapy surgery. The implementation of molecular biomarkers in Wilms tumor aims to improve patients' risk stratification, and therefore, several candidates have been tested in international clinical studies. The objective of this study was to validate the use of potential biomarkers – copy number alterations of *AMER1* (Xq), 1p, 1q, *MYCN* (2p), *WT1* (11p), 16q and *TP53* (17p) – to assist in risk classification of patients with Wilms tumors in Brazil. For this, clinical and pathological information was collected from all patients investigated at the Boldrini Children's Center from 2005 to 2020, totaling 186 patients. Of these, 40 patients with tumor samples preserved in RNA later stored in the institution's biobank were evaluated using the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique to quantify the number of copies of candidate biomarkers. For experiments that obtained an ambiguous or doubtful result, an orthogonal technique – real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) – was applied for confirmation. Of the 40 tumors evaluated, 20 showed chromosomal changes. The most frequent change was the gain of 1q (9/40-22.5%), followed by loss of 16q (8/40-20%) and loss of 1p (6/40-15%). A Wilms tumor presented the loss of concomitant 1p and 16q, referring to a patient who developed metastasis during treatment and died. In the group of tumors analyzed, it was observed that there was a predominance of molecular changes in patients with metastasis at diagnosis, metastasis during treatment, progression, relapse and death. Only one patient who died did not present molecular alterations, the others presented some genetic alteration, with the gain of 1q being the most frequent alteration in these patients. Furthermore, 16q loss was also more frequent in patients with more problematic outcomes. However, some biomarkers, such as *WT1* and *MYCN*, did not show a significant association with relapse and death. Thus, the characteristics of patients treated at the Boldrini Children's Center are similar to the characteristics of other international cohorts, showing that the loss of 1p and 16q and the gain of 1q are potential biomarkers for the prognosis of inferior survival in certain patients with WT.

Keywords: Wilms tumor, embryonal tumor, biomarkers, 1q

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição mundial de cânceres por faixa etária no período de 2001-10 (retirada de STELIAROVA-FOUCHER *et al.*, 2017).

Figura 2 - Diferentes padrões histológicos do TW (retirada de SPREAFICO *et al.*, 2021).

Figura 3 - Fluxograma da casuística produzido no Lucidchart.

Figura 4 - Gel de agarose 0,8% de 12 amostras de DNA.

Figura 5 - Representação gráfica extraída do Coffalyzer.NET (MRC Holland da amostra 517/18).

Figura 6 - Representação gráfica extraída do Coffalyzer.NET (MRC Holland da amostra 013/05).

Figura 7 - Representação extraída do programa CopyCaller® v2.1.

Figura 8 - Comparação entre o óbito ou não óbito, os biomarcadores e o ganho ou a perda do número de cópias.

Figura 9 - Comparação entre as respostas ao tratamento, os biomarcadores e o ganho ou a perda do número de cópias.

Figura 10 - Comparação entre os estadiamentos patológicos, os biomarcadores e o ganho ou a perda do número de cópias.

Figura 11 - Comparação entre os tipos histológicos, os biomarcadores e o ganho ou a perda do número de cópias.

Figura 12 - Gel de agarose (2%) de 20 amostras de DNA extraídas de tumores em blocos de parafina.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estadiamento clínico de pacientes com TW de acordo com o protocolo de tratamento do COG (do inglês, *Children's Oncology Group*), que preconiza cirurgia pré-quimioterapia.

Quadro 2 - Protocolos do COG e da SIOP para pacientes diagnosticados com tumores renais.

Quadro 3 - Classificação de risco para TW unilateral.

Quadro 4 - Síndromes e condições associadas com TW.

Quadro 5 - Variáveis do estudo.

Quadro 6 - Painéis de MLPA de todos os pacientes analisados.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Candidatos a biomarcadores de TW.

Tabela 2 - Programa de termociclador para técnica de MLPA.

Tabela 3 - Reação e ciclo de PCR multiplex.

Tabela 4 - Características qualitativas dos casos com TW de histologia favorável.

Tabela 5 - Associação das características qualitativas dos casos com histologia favorável tratados com COG.

Tabela 6 - Associação das características qualitativas dos casos com histologia favorável tratados com SIOP.

Tabela 7 - Características qualitativas dos casos bilaterais.

Tabela 8 - Características qualitativas dos casos com histologia desfavorável (anaplasia).

Tabela 9 - Quantificação de DNA das amostras tumorais congeladas.

Tabela 10 - Amostras de referência utilizadas na técnica de MLPA.

Tabela 11 - Alterações de número de cópias dos potenciais biomarcadores selecionados para TWs avaliados por MLPA em amostras selecionadas.

Tabela 12 - Alterações de número de cópias dos potenciais biomarcadores selecionados para TWs avaliados por MLPA e qPCR em amostras selecionadas.

Tabela 13 - Características clínicas e patológicas dos 40 pacientes.

Tabela 14 - Número de alterações encontradas nos 40 tumores avaliados.

Tabela 15 - Teste de Normalidade das variáveis contínuas dos 40 pacientes.

Tabela 16 - Comparação de características moleculares com a variável “resposta”.

Tabela 17 - Comparação de características moleculares com a variável “óbito”.

Tabela 18 - Casos selecionados para o estudo.

Tabela 19 - Sequências dos *Primers*.

Tabela 20 - Reação e ciclo de PCR multiplex.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCGH: Hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (aCGH, do inglês *array Comparative Genome Hybridization*)

CAAE: Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CESH: Hibridização de sequência expressa comparativa (CESH, do inglês *Comparative Expressed Sequence Hybridization*)

CGH: Hibridização genômica comparativa (CGH, do inglês *Comparative Genomic Hybridization*)

COG: Grupo de Oncologia Infantil (COG, do inglês *Children Oncology Group*)

°C: Graus Celsius

EFS: Sobrevida livre de eventos (EFS, do inglês *Event-Free Survival*)

FISH: Hibridação In Situ por Fluorescência (FISH, do inglês *Fluorescence In Situ Hybridization*)

GAPDH: Gliceraldeído-3 Fosfato Desidrogenase (GAPDH, do inglês *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*)

HE: hematoxilina-eosina

IMC: Índice de Massa Corporal

L: Ladder

LOI: Perda de imprinting (LOI, do inglês *Loss of imprinting*)

LOH: Perda de heterozigosidade (LOH, do inglês *Loss of heterozygosity*)

M: Molar

MT: Metástase durante o tratamento

MD: Metástase ao diagnóstico

mL: Mililitros

mUPD: Dissomia uniparental materna

µL: Microlitro

ng: Nanograma

pb: Pares de bases

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PR: Progressão

pUPD: Dissomia uniparental paterna

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR, do inglês *Quantitative PCR*)

R: Recaída

RN: Restos Nefrogênicos

RNIL: RN intralobar

RNPL: RN perilobar

rpm: Rotações por minuto

O: Óbito

OS: Sobrevida global (OS, do inglês *Overall Survival*)

SAME: Serviço de Arquivo Médico e Estatística

SIOP: Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (SIOP, do francês *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*)

SNP: Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*)

TW: Tumor de Wilms

TWAD: TW com anaplasia difusa

UPD: Dissomia uniparental

WAGR: Tumor de Wilms, aniridia, anomalia genito-urinária e retardo mental

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO TUMOR DE WILMS	19
1.1 <i>Epidemiologia</i>	19
1.2 <i>Diagnóstico</i>	20
1.3 <i>Morfologia</i>	21
1.4 <i>Tratamento</i>	23
2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO TW	27
3 O PANORAMA DE ALTERAÇÕES EM TWS	30
3.1 <i>Ganho de 1q</i>	30
3.2 <i>Perda de 1p e 16q</i>	32
3.3 <i>Alterações em TP53</i>	34
3.4 <i>Amplificação e mutações em MYCN</i>	35
3.5 <i>Mutações em AMER1</i>	36
3.6 <i>Alterações em WT1 e CTNNB1</i>	38
3.7 <i>11p15</i>	38
3.8 <i>Candidatos a biomarcadores para serem implementados em TWS</i>	39
4 JUSTIFICATIVA	39
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 METODOLOGIA	42
3.1 COMITÊ DE ÉTICA	42
3.2 CASUÍSTICA	42
3.3 VARIÁVEIS	43
3.4 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	44
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA	44
3.6 AVALIAÇÃO DO DNA	45
3.6.1 <i>Quantificação - Qubit</i>	46
3.6.2 <i>Pureza - Biodrop</i>	46

3.6.3 <i>Integridade - Gel de Agarose</i>	46
3.7 MLPA	47
3.8 VALIDAÇÃO DE AMOSTRAS UTILIZANDO ENSAIOS TAQMAN®	51
3.9 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE GENES NOS TWS	52
3.10 CORRELAÇÃO DOS ACHADOS COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS	52
3.11 AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS ARMAZENADAS EM PARAFINA	53
3.11.1 <i>Seleção de amostras tumorais parafinadas</i>	53
3.11.2 <i>Extração de DNA</i>	54
3.11.3 <i>Quantificação do DNA</i>	55
3.11.4 <i>Avaliação da integridade do DNA</i>	55
3.11.5 <i>Gel de agarose</i>	56
3.11.6 <i>Ensaio TaqMan® Gene Expression</i>	57
4 RESULTADOS	58
4.1 SELEÇÃO DE CASOS	58
4.2 ANÁLISE DESCRITIVA	58
4.2.1 <i>Pacientes diagnosticados com tumores de histologia favorável</i>	58
4.1.2 <i>Pacientes diagnosticados com doença bilateral</i>	73
4.1.3 <i>Pacientes diagnosticados com tumores de histologia desfavorável</i>	77
4.3 EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DO DNA	80
4.4 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DOS POTENCIAIS BIOMARCADORES	82
4.5 COMPARAÇÃO ENTRE INFORMAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES	88
4.6 AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS ARMAZENADAS EM PARAFINA	103
5 DISCUSSÃO	107
7 CONCLUSÃO	112
REFERÊNCIAS	113
ANEXOS	124

1 INTRODUÇÃO

O câncer infantojuvenil, diagnosticado em crianças e adolescentes entre 0 e 19 anos, é uma doença rara, representando 2 a 3% do total de cânceres. No entanto, mundialmente, representa a primeira causa de morte por doença entre crianças e adolescentes. Cerca de 400 mil crianças e adolescentes são diagnosticados com câncer com variações relacionadas à faixa etária (STELIAROVA-FOUCHER *et al.*, 2017), conforme apresentado na **Figura 1**. No Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, foram cerca de 4.310 casos novos de câncer infantojuvenil para o sexo masculino e de 4.150 para o sexo feminino (INCA, 2019).

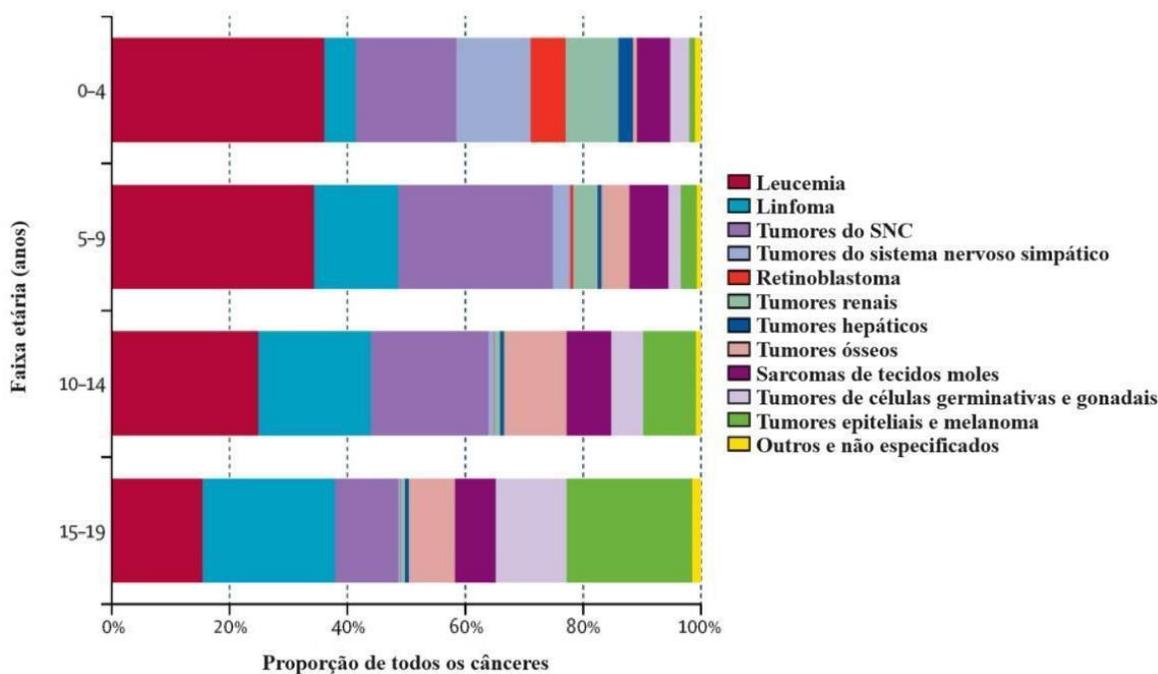


Figura 1 - Distribuição mundial de cânceres por faixa etária no período de 2001-10 (retirada de STELIAROVA-FOUCHER *et al.*, 2017).

Os tumores renais correspondem a aproximadamente 5% dos tumores pediátricos, sendo os mais comuns: tumor de Wilms (TW, que corresponde a 95% dos casos), tumor

teratoide rabdoide, sarcoma de células claras renal e carcinoma renal (STILLER, ALLEN, EATOCK, 1995; RIVERA, HABER, 2005; SPREAFICO, BELLANI, 2006; DAVIDOFF, 2009; CHU *et al.*, 2010; STELIAROVA-FOUCHER *et al.*, 2017; NAKATA *et al.*, 2020; BALIS *et al.*, 2021).

1 Características gerais do tumor de Wilms

1.1 Epidemiologia

O tumor de Wilms (TW), nome que remete ao médico alemão Carl Max Wilhelm Wilms (1867-1918), que descreveu a doença pela primeira vez em 1899, é a neoplasia renal mais comum na infância, com prevalência de uma em 10.000 crianças menores de 15 anos de idade (BRESLOW *et al.*, 1993; SZYCHOT, APPS, PRITCHARD-JONES, 2014; SPREAFICO *et al.*, 2021). Tipicamente, a doença apresenta um pico de incidência entre o 2º e o 3º ano de vida, sendo que a maioria das crianças (75%) desenvolve o TW entre 1 e 5 anos de idade (BRESLOW *et al.*, 1993; BALIS *et al.*, 2021).

A taxa de incidência mundial varia, sendo mais alta entre crianças afro-americanas, seguida por crianças caucasianas e por último em crianças asiáticas (BRESLOW *et al.*, 1994; HADLEY, ROUMA, SAAD-ELDIN, 2012; STELIAROVA-FOUCHER *et al.*, 2017; APPLE, LOVVORN, 2020). Incluindo outros tumores renais, as maiores taxas por milhão de pessoas-ano de 0 a 14 anos são da África Subsaariana (6,7 a 10,9), América do Norte e Europa (9,1 a 9,8); a menor taxa é da Ásia (4,1 a 5,4); sendo no Brasil de 8,4 e a taxa global de 8,3 (LIBES *et al.*, 2022).

Normalmente, o TW surge em um único rim (unilateral), mas aproximadamente 5% a 8% dos pacientes apresentam tumores em ambos os rins (bilateral) (CHARLTON *et al.*, 2017), situação que tende a se manifestar em idade mais precoce (KUMAR *et al.*, 2004; RIVERA, HABER, 2005; BUCKLEY, 2011).

1.2 Diagnóstico

O diagnóstico do TW é realizado por meio de avaliações laboratoriais, radiológicas, ultrassonográficas e tomográficas. Por meio dessas avaliações, e, se necessário outras, o médico infere o estadiamento da doença, ou seja, avalia a sua magnitude por meio da observação de diferentes variáveis estabelecidas internacionalmente.

Há dois tipos de estadiamento: o clínico, que é estabelecido por meio de exames preliminares do paciente; e o patológico, que é estabelecido pelos achados cirúrgicos e na peça tumoral. Ambos estadiamentos, clínico ou patológico, podem ou não ser coincidentes, sendo o estadiamento patológico mais preciso (INCA, 2022).

O estadiamento clínico do paciente com TW está representado no **Quadro 1** (PQD, 2002, BALIS *et al.*, 2021).

Quadro 1 - Estadiamento clínico de pacientes com TW de acordo com o protocolo de tratamento do COG (do inglês *Children's Oncology Group*), que preconiza cirurgia pré-quimioterapia.

Estadio	Características
I	Tumor restrito ao rim e completamente ressecado
II	Tumor além do rim, mas restrito à loja renal e completamente ressecado
III	Tumor além do rim, ressecção incompleta, implantes peritoneais restritos ao abdome
IV	Qualquer um dos estadios anteriores com disseminação hematogênica/metástases à distância
V	Tumor bilateral

Fonte: Children's Oncology Group

O estadiamento patológico de TW, conforme preconiza a Sociedade Brasileira de Patologia, segue as seguintes classificações: I - tumor limitado ao rim e completamente ressecado (margens livres); II - tumor estende-se além do rim, mas completamente ressecado (margens livres) e linfonodos negativos; III - tumor residual não hematogênico confinado ao abdome (pode se estender aos tecidos moles perirrenais, veia renal e veia cava); IV - metástases hematogênicas (pulmão, fígado, osso, cérebro e outros locais, como os linfonodos

regionais). Se o estadiamento clínico é V, cada rim deve ser estadiado em um dos quatro estadios iniciais.

1.3 Morfologia

O TW tem uma morfologia heterogênea, apresentando três componentes histológicos: blastematoso, epitelial e estromal (BECKWITH *et al.*, 1990), que podem variar em proporção, apresentando inclusive TWs bifásicos ou monofásicos. O perfil de expressão gênica de cada componente se assemelha a fases distintas do desenvolvimento renal, sendo que o componente blastematoso apresenta um perfil de expressão mais semelhante às fases iniciais (MASCHIETTO *et al.*, 2008).

O componente epitelial é caracterizado por apresentar células diferenciadas, com estruturas epiteliais primitivas semelhantes a rosetas, que se assemelham aos túbulos renais ou glomérulos. O componente estromal é composto por células mesenquimais indiferenciadas que podem se diferenciar em células de músculo esquelético, tecido adiposo, cartilagem ou osso devido à diferenciação heteróloga do estroma neoplásico, principalmente em TWs submetidos à quimioterapia pré-operatória. O componente blastematoso representa o tipo celular menos diferenciado e o mais maligno, caracterizado por pequenas células azuis redondas e rápida atividade mitótica (POPOV, SEBIRE, VUJANIC, 2016).

Os tipos histológicos do TW estão representados na **Figura 2** (SPREAFICO *et al.*, 2021).

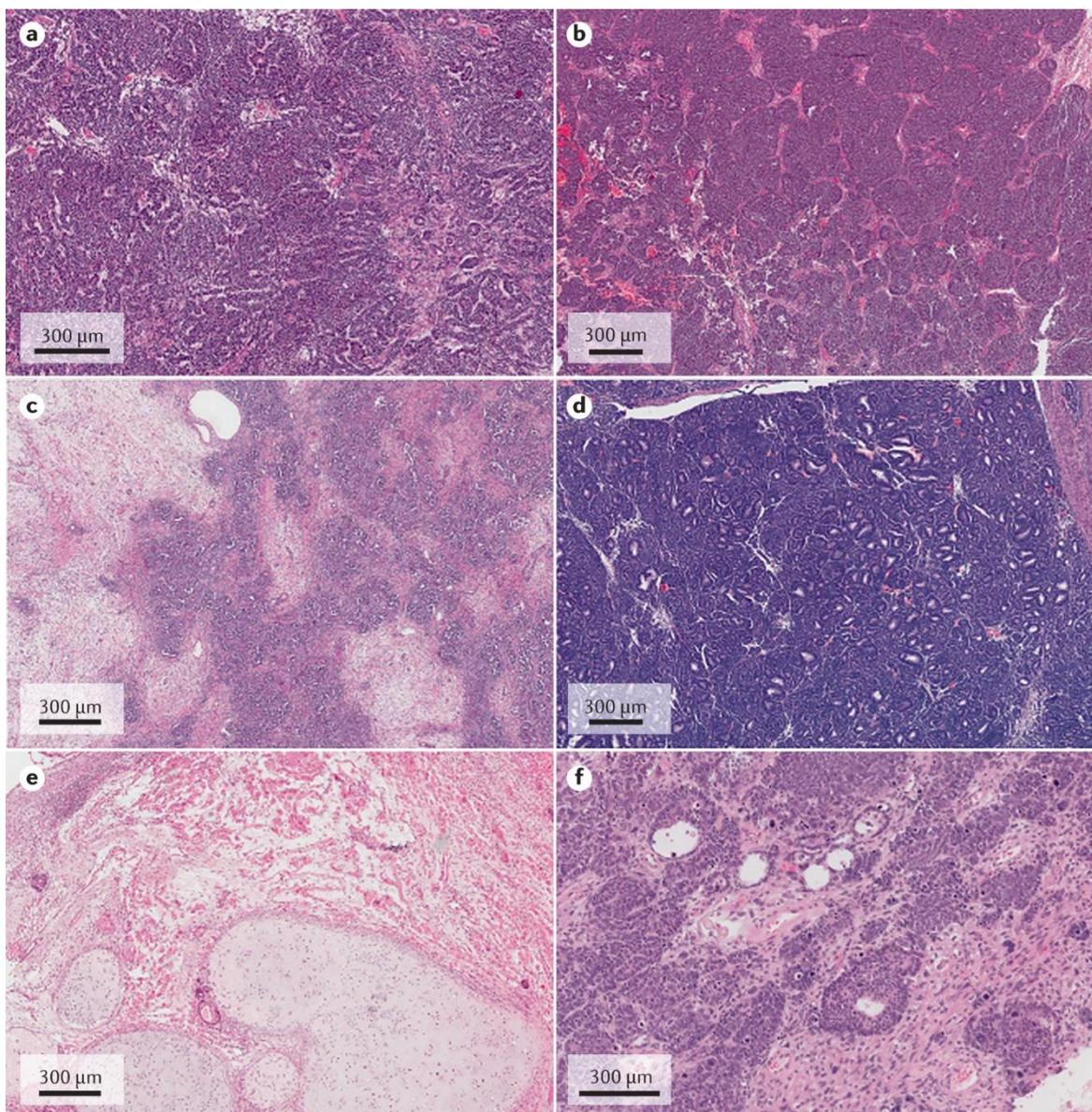


Figura 2 - Diferentes padrões histológicos do TW (retirada de SPREAFICO *et al.*, 2021). **a)** Tipo misto, com componente blastematoso e epitelial. **b)** Tipo blastematoso. **c)** Tipo misto consistindo em componentes epiteliais e estromais maduros. **d)** Tipo epitelial composto por túbulos moderadamente diferenciados. **e)** Tipo estromal com elementos heterólogos incluindo cartilagem e músculo esquelético. **f)** Anaplasia em TW com mitoses atípicas, aumento nuclear e hiper cromasia.

De acordo com o protocolo de tratamento COG, mais especificado no próximo tópico, o TW pode ser separado em dois grupos prognósticos: histologia favorável e histologia desfavorável. Quanto à histologia favorável, o TW imita o desenvolvimento trifásico de um rim normal, com células blastematosas, epiteliais e estromais, embora nem todos os tumores

sejam trifásicos (LI *et al.*, 2002). Em condições ideais de tratamento, a sobrevida em cinco anos é superior a 90% para crianças diagnosticadas com tumores de histologia favorável em qualquer estadio (DOME, PERLMAN, GRAF, 2014; DOME *et al.*, 2015; GRATIAS *et al.*, 2016; IRTAN, EHRLICH, PRITCHARD-JONES, 2016).

A histologia desfavorável está relacionada à presença de anaplasia, definida como células com grandes núcleos hipercromáticos e de figuras mitóticas poliploides multipolares anormais, e pode estar presente em qualquer dos três componentes histológicos (BECKWITH, PALMER, 1978). Essas células podem apresentar-se de maneira focal ou difusa, ou seja, podem estar limitadas a certas partes do tumor ou espalhadas por ele (FARIA *et al.*, 1996). A anaplasia é observada em 5% a 10% dos TWs, com incidência maior em pacientes mais velhos (ZUPPAN, BECKWITH, LUCKEY, 1988), e é associada à resistência à quimioterapia e ao pior prognóstico (DOME, PERLMAN, GRAF, 2014).

Quanto à morfologia, também é possível encontrar restos nefrogênicos (RN), que são lesões indiferenciadas com células precursoras renais embrionárias anormalmente retidas e dispostas em grupos em cerca de 1% dos casos (BECKWITH, 1993, 1997). Os RNs são classificados baseados na localização no rim: RN perilobar (RNPL) são encontrados próximos à periferia do lóbulo renal e associados com TW com predomínio dos componentes blastematoso ou epitelial (VUONONVIRTA *et al.*, 2008); e RN intralobar (RNIL) são encontrados na medula, como consequência de algum erro precoce durante a nefrogênese. Os RNs são tipicamente associados com TW com predomínio de componente estromal com diferenciação para elementos mesenquimais e mutação/deleção de *WT1* (SCHUMACHER *et al.*, 2003).

1.4 Tratamento

O tratamento de cada paciente com TW varia de acordo com o estadiamento, a histologia e a resposta à quimioterapia (PRITCHARD-JONES *et al.*, 2014; CHARLTON, PAVASOVIC, PRITCHARD-JONES, 2015). O tratamento do TW é sempre multidisciplinar, com cirurgia e quimioterapia, além de radioterapia em casos específicos.

Atualmente, os fatores prognósticos considerados mais relevantes para a decisão terapêutica são o estadiamento e a histologia da peça tumoral (DOME, PERLMAN, GRAF, 2014).

Há duas abordagens principais de tratamento para o TW (LOPES, LORENZO, 2017): o protocolo do Grupo de Oncologia Infantil (COG, do inglês *Children's Oncology Group*) e o protocolo da Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (SIOP, do francês *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*).

Ambos os grupos, COG e SIOP, de forma geral, utilizam a quimioterapia pós-operatória, exceto em alguns casos. Além disso, ambos tratam crianças menores de 6 meses de vida com nefrectomia primária (VAN DEN HEUVEL-EIBRINK *et al.*, 2017).

O protocolo do COG recomenda a nefrectomia inicial, seguida de quimioterapia pós-operatória, e, em alguns pacientes, radioterapia (D'ANGIO *et al.*, 1989; JEREB *et al.*, 1994; GREEN, 2004). Essa abordagem permite, por exemplo, o diagnóstico histológico precoce e a coleta de materiais biológicos inalterados.

Por outro lado, o protocolo SIOP preconiza a quimioterapia pré-operatória, visando a diminuição do volume do tumor e, portanto, o risco de ruptura tumoral durante a cirurgia, e menor estadiamento pós-operatório (GRAF, TOURNADE, DE KRAKER, 2000). Nessa abordagem, a quimioterapia pré-operatória pode alterar a histologia do tumor, como diminuir a quantidade de células blastomatosas, uma vez que essas células são melhores respondedoras ao tratamento quimioterápico. Desta forma, também permite a avaliação da resposta tumoral ao tratamento quimioterápico inicial (POPOV, SEBIRE, VUJANIC, 2016).

O **Quadro 2** compara os dois grupos de tratamento. É importante ressaltar que ambos os protocolos apresentam semelhantes e excelentes sobrevida livre de eventos (EFS, do inglês *Event-Free Survival*) quanto sobrevida global (OS, do inglês *Overall Survival*) (IRTAN, EHRLICH, PRITCHARD-JONES, 2016).

Quadro 2 - Protocolos do COG e da SIOP para pacientes diagnosticados com tumores renais.

	COG	SIOP
Cirurgia	Primeira abordagem	Cirurgia após quimioterapia
Quimioterapia pré-operatória	Em alguns casos é necessário fazer, como quando o tumor está inoperável	Para todos os pacientes com mais de 6 meses
Regimes	<p>Regimen EE-4A: vincristina, dactinomicina × 18 semanas pós-nefrectomia</p> <p>Regimen DD-4A: vincristina, dactinomicina, doxorubicina × 24 semanas; nefrectomia ou biópsia basal com nefrectomia subsequente</p> <p>Regimen I: vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida, etoposídeo × 24 semanas após a nefrectomia</p> <p>Regimen M: vincristina, dactinomicina, doxorubicina, ciclofosfamida e etoposídeo com subsequente radioterapia</p> <p>Regimen UH1: vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida, carboplatina e etoposídeo × 30 semanas + radioterapia</p> <p>Regimen UH2: vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida, carboplatina, etoposídeo, vincristina e irinotecano × 36 semanas + radioterapia</p>	<p>Para pacientes com tumor localizado unilateral, o pré-tratamento de 4 semanas com vincristina (semanal) e dactinomicina (quinzenal);</p> <p>Para pacientes com tumores bilaterais, recomenda-se vincristina-dactinomicina por não mais de 9-12 semanas (a doxorubicina é adicionada para reforço em alguns pacientes);</p> <p>Para pacientes com metástase, um regime incluindo 6 semanas de vincristina-dactinomicina e doxorubicina nas semanas 1 e 5</p>
Quimioterapia pós-operatória	Em todos os pacientes, exceto aqueles com risco muito baixo	
Estádio V	Ambos recomendam quimioterapia pré-operatória e ressecção para TW bilateral	
Recorrência	A abordagem difere de TW recidivado de risco baixo, risco intermediário e risco alto	Classifica os pacientes com TW recidivado em grupos AA, BB e CC

Fonte: Adaptada de PQD, 2002; WANG *et al.*, 2019.

Considerando os dois protocolos principais de tratamento (COG e SIOP) e a histologia do tumor, o paciente pode ser classificado como risco baixo, risco intermediário e risco alto, conforme o **Quadro 3**.

Quadro 3 - Classificação de risco para TW unilateral baseado em histologia.

Protocolo	Risco Baixo	Risco Intermediário	Risco Alto
SIOP	TW completamente necrótico Nefroblastoma cístico parcialmente diferenciado	TW com predomínio do componente epitelial, estromal, misto ou regressivo TW com anaplasia focal	TW com predomínio do componente blastematoso TW com anaplasia difusa
COG	TW de histologia favorável Sem evidência de anaplasia	Anaplasia confinada a um ou mais locais discretos dentro do tumor primário, sem envolvimento extrarrenal Nenhum distúrbio nuclear fora dos focos anaplásicos	TW com predomínio do componente blastematoso Anaplasia não localizada Anaplasia em locais invasivos ou depósitos extrarrenais Anaplasia localizada com vários distúrbios nucleares Anaplasia em uma amostra de biópsia aleatória Anaplasia envolvendo a borda de uma ou mais seções

Fonte: Adaptada de Dome, Perlman & Graf, 2014.

Como mencionado acima, embora existam algumas diferenças na abordagem terapêutica e nos critérios para estadiamento e classificação de risco, esses grupos conduziram diferentes estudos clínicos e moleculares que forneceram conhecimento baseado em evidências para estabelecer os melhores tratamentos para pacientes com TW.

Com os avanços terapêuticos, as taxas de OS de pacientes com TW chegam a aproximadamente 90% (SZYCHOT, APPS, PRITCHARD-JONES, 2014). No entanto, a OS de subgrupos específicos de pacientes, como histologia desfavorável, doença bilateral e recidiva da doença, permanece em torno de 50%. Juntos, estes grupos de maior risco representam cerca de 25% dos pacientes com TW (DOME *et al.*, 2015; PRITCHARD-JONES *et al.*, 2015).

2 Aspectos Biológicos do TW

Diferentes eventos moleculares são responsáveis pelo início e pela progressão do câncer. Os tumores sólidos pediátricos provavelmente se originam durante a diferenciação celular (CHEN, PAPPO, DYER, 2015).

Semelhante a outros tumores embrionários, os TWs apresentam relativamente poucas alterações genéticas, que podem estar associadas à predisposição ao desenvolvimento do TW em 10% a 20% dos casos (DOME, HUFF, 2003; KALISH *et al.*, 2017). A caracterização molecular de diversas síndromes de predisposição ao desenvolvimento de TW levou à identificação de genes/*loci* que também são encontrados nos tumores esporádicos.

Anomalias congênitas, como aniridia, anomalias geniturinárias, gigantismo, hemi-hiperplasia, macroglossia ou crescimento excessivo sugerem a presença de certas síndromes de predisposição genética, como Síndrome de Denys-Drash (genitália ambígua/pseudohermafroditismo masculino, esclerose mesangial difusa, TW e gonadoblastoma), Síndrome de WAGR (tumor de Wilms, aniridia, anomalia genito-urinária e retardo mental), Síndrome de Frazier (hermafroditismo masculino, amenorréia primária, insuficiência renal crônica e outras anormalidades) e Síndrome de Beckwith-Wiedemann (desordem de crescimento e associada com risco aumentado para desenvolver hepatoblastoma e TW) (DOME, HUFF, 2003; HILLEN *et al.*, 2016).

Há outras síndromes associadas ao TW, como Perlman (*DIS3L2*), Simpson-Golabi-Behmel (*GPC3 e GPC4*), CLOVES (*PIK3CA*), Sotos (*NSD1*), microdeleção 9q22.3 (*PTCH1*), Bloom (*BLM*), Li-Fraumeni (*TP53 e CHEK2*), Alagille (*JAG1*) e Bohring-Opitz (*ASXL1*).

O **Quadro 4** apresenta síndromes e condições relacionadas ao aumento de risco para desenvolvimento de TW (TREGGER *et al.*, 2019).

Quadro 4 - Características clínicas associadas com aumento de risco para desenvolvimento de TW.

Síndrome / Condição	Gene / alteração
Alto Risco de TW (>20%)	
Síndrome WAGR	Deleção <i>WT1</i>
Síndrome Denys-Drash	Mutação missense <i>WT1</i>
Síndrome Perlman	Mutação <i>DIS3L2</i>
Anemia de Fanconi	Mutação bialélica <i>BRCA</i> ou <i>PALB2</i>
Separação cromátide prematura / aneuploidia variegada em mosaico	Mutação bialélica <i>BUB1B</i> ou <i>TRIP13</i>
Moderado Risco de TW (5-20%)	
Síndrome Frasier	Mutação splicing no intron 9 de <i>WT1</i>
Síndrome Beckwith-Wiedemann	Dissomia uniparental ou epimutação em <i>IGF2/H19</i> (11p15)
Síndrome Simpson-Golabi-Behmel	Mutação <i>GPC3</i>
Baixo Risco de TW (<5%)	
Síndrome Bloom	Mutação bialélica <i>BLM</i>
Síndrome <i>DICER1</i>	Mutação <i>DICER1</i>
Síndrome Li-Fraumeni	<i>TP53</i> , <i>CHEK2</i>
Hemihiperplasia isolada	Variável
Síndrome de hiperparatireoidismo – Tumor de Mandíbula	Mutação <i>CDC73</i> (<i>HRPT2</i>)
Síndrome de nanismo MULIBREY (anormalidades distintas dos músculos, fígado, cérebro e olhos)	Mutação <i>TRIM37</i>
Supercrescimento segmentar relacionado a <i>PIK3CA</i> incluindo Síndrome de CLOVES (supercrescimento lipomatoso congênito, malformações vasculares, nevos epidérmicos e anormalidades esqueléticas/espinhais)	Mutação <i>PIK3CA</i>
Síndrome de microdeleção 9q22.3	9q22.3
Síndrome Sotos	<i>NSD1</i>
Tumor de Wilms familiar	<i>FWT1</i> e <i>FWT2</i>
Anomalias geniturinárias	<i>WT1</i>
Aniridia esporádica	<i>WT1</i>
Trissomia 18	-

Fonte: Adaptado de Treger *et al.*, 2019 e PQD, 2002

Uma característica marcante dos TWs, assim como em outros tumores embrionários, é a frequência relativamente baixa de mutações somáticas, detectadas em até 30% dos casos, envolvendo cerca de 30 genes. Dentre estes, os mais frequentemente alterados são: *WT1*, *CTNNB1*, *AMER1* (*WTX*), *DROSHA*, *DGCR8*, *XPO5*, *DICER1*, *SIX1*, *SIX2*, *MLLT1*, *MYCN* e *TP53* (SCOTT *et al.*, 2012; GADD *et al.*, 2017; MAHAMDALLIE *et al.*, 2019). Embora alguns genes já tivessem sido citados em outros estudos, como *WT1*, *CTNNB1*, *FAM123B*, *DROSHA*, *DGCR8*, *XPO5*, *DICER1*, *SIX1*, *SIX2*, *MLLT1*, *MYCN* e *TP53*; com estudos de sequenciamento de exoma e genoma completo, novas mutações foram identificadas em genes anteriormente não reconhecidos como envolvidos em TWs, como *BCOR*, *BCORL1*, *NONO*, *MAX*, *COL6A3*, *ASXL1*, *MAP3K4* e *ARID1A* (GADD *et al.*, 2017).

Além de alterações em genes específicos implicados no desenvolvimento do TW, a patogênese da doença também pode estar associada a outros eventos, como ganhos dos cromossomos 1q, 2, 7q, 8, 12 e 13, e perdas dos cromossomos 1p, 7p, 16q e 22q (HÖGLUND *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2011).

Também são identificadas alterações relacionadas aos processos de desenvolvimento renal em pacientes com TW, sendo a via de sinalização Wnt a mais comumente alterada. Essa via apresenta dois ramos que controlam o desenvolvimento embrionário e a homeostase das células adultas: o canônico (ou dependente de β -catenina - codificada pelo gene *CTNNB1*) e o não-canônico (ou independente de β -catenina). A via canônica Wnt é ativada por proteínas WNT, que impede a degradação da β -catenina, resultando no seu acúmulo citoplasmático, e atuando na expressão de genes envolvidos em importantes processos celulares; contudo, mutações em *CTNNB1* interferem nessa via de sinalização (CARRARO, RAMALHO, MASCHIETTO, 2016; DUHME *et al.*, 2021).

3 O panorama de alterações em TWs

Uma das maneiras de identificar um tumor é por meio de um biomarcador, que pode ser definido como uma alteração qualitativa ou quantitativa de uma molécula, substância ou processo que pode ser detectado por algum tipo de ensaio, e essas alterações podem auxiliar na detecção, prognóstico e monitoramento do câncer (VIRJI, MERCER, HERBERMAN, 1988; HAYES *et al.*, 1996; DUFFY, 2001).

A história dos biomarcadores não é recente, já que em 1846 o médico inglês Henry Bence-Jones (1813-1873) identificou proteínas na urina como biomarcadores para mieloma múltiplo (VIRJI, MERCER, HERBERMAN, 1988). No que tange ao TW, diferentes biomarcadores têm sido propostos, como alterações em *TP53* ou em *WT1*, a fim de permitir um diagnóstico precoce ou identificar pacientes de alto risco, conseqüentemente poupando os indesejados efeitos da terapia em pacientes com a doença menos agressiva (LAHOTI *et al.*, 1996; WEN *et al.*, 1997; GHAGEM *et al.*, 2005).

Os biomarcadores que refletem alterações nas regiões cromossômicas, são o foco deste estudo, que visa validar ganhos e perdas cromossômicas que têm sido testados como candidatos a biomarcadores associados ao prognóstico de pacientes com TW pelos grupos cooperativos internacionais. Dentre as alterações mais recorrentes em TWs, as seguintes estão sendo avaliadas prospectivamente pelos estudos clínicos atuais: mutações em *AMER1* (Xq), perda de 1p, ganho de 1q, amplificação e mutações em *MYCN* (2p), mutações e perda de *WT1* (11p), perda de 16q, alterações em *TP53* (17p).

3.1 Ganho de 1q

O ganho do cromossomo 1q foi avaliado pela primeira vez em 67 casos de pacientes com TW de histologia favorável (46 com recidiva e 21 sem recidiva), pelo método de hibridização genômica comparativa (CGH, do inglês *Comparative Genomic Hybridization*), que identificou o ganho de 1q como sendo mais frequente no grupo de recaída 27/46 (59,0%) vs. 5/21 (24,0%) (HING *et al.*, 2001). No ano seguinte, por meio da hibridização de sequência expressa comparativa (CESH, do inglês *Comparative Expressed Sequence Hybridization*),

em 18 amostras tumorais de pacientes com TW de histologia favorável (10 com recidiva e 8 sem recidiva), o ganho de 1q foi encontrado nas 10 amostras com recidiva, sugerindo uma associação desse marcador com a recidiva dos pacientes (LU *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por Williams e colaboradores em 2004, em que 27 amostras de TW de histologia favorável de nefrectomias primárias (13 com recidiva) foram analisadas pela técnica de microarranjo e a incidência de ganho de 1q foi maior nos casos recidivados (7 de 13) do que não recidivados (1 de 14) (WILLIAMS *et al.*, 2004). Outra técnica utilizada para a avaliação do ganho de 1q foi a hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (aCGH, do inglês *array Comparative Genome Hybridization*), em que 33 de 76 amostras de TW apresentaram ganho do cromossomo 1q, e os pacientes com maior ganho de 1q tiveram pior prognóstico (NATRAJAN *et al.*, 2006a), demonstrando posteriormente associação entre a microamplificação no cromossomo 1q25.3 e a recidiva em pacientes com TW de histologia favorável (NATRAJAN *et al.*, 2006b).

Por meio da técnica de microarranjo de DNA, alterações de número de cópias foram avaliados em 77 TWs com e sem recidiva identificando que ganhos em 1q21.1-q31.3 poderiam estar associados à recidiva (PEROTTI *et al.*, 2012).

Um outro estudo mostrou que 19% de pacientes com TWs (64/331) tiveram ganho de 1q e que esse ganho foi associado à perda de 16q e de 1p (SEGERS *et al.*, 2013). Corroborando esses achados, foram avaliadas amostras de TWs de histologia favorável e o ganho de 1q e a perda de 1p e de 16q foram determinados usando a técnica de Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA, do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), identificando que 27% (58/212) dos pacientes apresentaram ganho de 1q, além de mostrar uma forte relação entre o ganho de 1q e a perda de 1p/16q para pacientes tratados no protocolo do COG. A EFS e a OS foram maiores para os casos que não apresentaram ganho de 1q em relação aos que tiveram ganho. O estudo mostrou também que o ganho de 1q foi associado à recidiva da doença (GRATIAS *et al.*, 2013).

Um estudo com uma coorte de 1.114 pacientes com TW tratados no protocolo da SIOP pela técnica de MLPA, em que 317 de 1114 (28%) apresentaram ganho de 1q, tanto a EFS quanto a OS foi maior para os casos que não apresentaram ganho de 1q em relação aos

que tiveram ganho. Dentro de cada estadio da doença, o ganho de 1q foi associado a EFS inferior (GRATIAS *et al.*, 2016). Um outro estudo que também utilizou a técnica de MLPA, publicado por Chagtai e colaboradores (2016), demonstrou a viabilidade da utilização do ganho de 1q como biomarcador prognóstico, em que 167 de 586 (28%) dos pacientes apresentaram ganho de 1q, em associação com EFS e OS, que foram maiores para os pacientes sem ganho de 1q, ou seja, o ganho de 1q pode ser um biomarcador prognóstico potencialmente valioso no TW associado à resposta histológica à quimioterapia pré-operatória e ao estadiamento do tumor (CHAGTAI *et al.*, 2016).

3.2. Perda de 1p e 16q

A perda de heterozigosidade (LOH, do inglês *Loss of Heterozygosity*) do cromossomo 16q foi identificada concomitante com LOH no cromossomo 1p em TW (MAW *et al.*, 1992). Na maior parte do genoma humano, as células têm duas cópias, uma de cada progenitor. Contudo, eventos como deleção, mutação, recombinação mitótica ou perda de um cromossomo inteiro, podem resultar na perda de uma das cópias, tornando uma célula somática heterozigota em homozigota, denominada como perda de heterozigose (CAVENEY *et al.*, 1983; BROWN, 1997).

A perda de 1p e 16q mostrou associação com aumento de risco de recidiva ou morte, como demonstrado em um estudo que utilizou a técnica de *Southern blot* com 232 pacientes com TW (206 com histologia favorável, 17 com histologia desfavorável (anaplasia focal ou difusa) e 9 com histologia desconhecida), do total, a perda de 16q foi identificada em 35 casos (17%) enquanto a perda de 1p em 21 casos (12%), e 6 casos com ambas as perdas (4%). Pacientes com perda de 16q tiveram taxas de recidiva 3,3 vezes maiores e de mortalidade 12 vezes maiores do que pacientes sem perda 16q. Os pacientes com perda de 1p tiveram taxas de recidiva e mortalidade três vezes maiores do que os pacientes sem perda de 1p. Apesar desses resultados não terem sido estatisticamente significativos, foram avaliados em um número pequeno de casos, e por isso, ainda levantaram a hipótese de que esta associação deveria ser mais bem avaliada em um grupo maior e independente de tumores (GRUNDY *et al.*, 1994).

Posteriormente, foi reportado que a perda simultânea de 1p e 16q está associada aos resultados adversos em pacientes com TW de histologia favorável tratados com nefrectomia primária. De 1.727 casos de TWs com histologia favorável, 301 (17,4%) tiveram perda de 16q e 195 (11,3%) apresentaram perda de 1p; e de 182 pacientes com histologia desfavorável (com anaplasia), 59 (32,4%) tiveram perda de 16q e 29 (15,9%) apresentaram perda de 1p (GRUNDY *et al.*, 2005).

Um estudo desenvolvido por Spreafico e colaboradores (2013) com 125 pacientes com TW com histologia favorável tratados primeiro com cirurgia, pela técnica de microssatélites como marcadores de detecção de LOH encontrou uma associação entre prognóstico pior e deleção de 1p, mas não nos casos com deleção de 16q (SPREAFICO *et al.*, 2013).

Já o estudo de Gratiias *et al.* (2013), por meio da técnica de MLPA, mostrou uma forte relação entre ganho de 1q e perda de 1p/16q, os tumores com ganho de 1q – que foram 58/212 (27%) – foram mais propensos a ter perda de 16q (42,6%) ou perda de 1p (32,5%) do que tumores sem ganho de 1q (GRATIAS *et al.*, 2013).

Por outro lado, outro estudo com 426 pacientes com TW de histologia favorável tratados com nefrectomia imediata (63%) ou quimioterapia pré-operatória (37%), a perda de 1p foi encontrada em 44 pacientes (10,3%) e a perda de 16q foi encontrada em 62 pacientes (14,6%) e a perda em ambos foi encontrada em 11 pacientes (2,6%); independentemente da abordagem inicial da terapia, a perda de 16q foi associada a um risco aumentado de recaída e morte e a perda de 1p não apresentou associações significativas (MESSAHEL *et al.*, 2009). Entretanto, um estudo mostrou que a EFS de pacientes com TW foi inferior na presença de LOH 1p ou 16q, mas não houve impacto significativo na OS (FERNANDEZ *et al.*, 2018).

Assim, em TW sem quimioterapia prévia, a LOH de 16q e 1p perde significância como marcadores prognósticos independentes na presença de ganho de 1q. No entanto, na ausência de ganho 1q, a LOH de 16q e 1p retém seu impacto prognóstico adverso e a LOH de 1p e 16q combinada é associada à pior prognóstico (GRATIAS *et al.*, 2016).

3.3 Alterações em TP53

Outra alteração cromossômica recorrente em TW ocorre em 17p, afetando o gene *TP53* (17p13). Este gene codifica um fator de transcrição que regula a expressão de genes envolvidos no ciclo celular, senescência e apoptose. Alterações em *TP53* estão associadas à histologia anaplásica, sendo que um dos primeiros estudos que demonstrou que essa associação identificou mutações na proteína P53, presente em oito dos onze casos de TWs anaplásicos avaliados (BARDEESY *et al.*, 1994).

Mutações na região codificadora de *TP53* foram encontradas em 2 de 21 (9,5%) casos de TWs avaliados de pacientes com doença em estadiamento avançado (18 com histologia favorável e 3 com histologia desfavorável - 2 com anaplasia focal e 1 com anaplasia difusa), indicando que embora as mutações nesse gene ocorram com pouca frequência em TWs, elas podem estar associadas à doença avançada (MALKIN *et al.*, 1994). Outro estudo com sete TWs de histologia desfavorável (4 com anaplasia focal e 3 com anaplasia difusa), encontrou mutações em *TP53* em seis dos casos avaliados, dos quais em cinco essas alterações foram restritas às regiões anaplásicas (BARDEESY, BECKWITH, PELLETIER, 1995).

Em um outro estudo, três TWs anaplásicos foram comparados com 10 TWs de histologia favorável para expressão de P53 por técnicas de imunohistoquímica e de *Northern blot*, em que todos os TWs de histologia favorável continham um gene *TP53* de tipo selvagem e expressavam níveis marginais de proteína como esperado para o *TP53* normal, enquanto todos os tumores anaplásicos demonstraram evidências de alterações da P53, sugerindo um envolvimento do *TP53* na anaplasia do TW (EL BAHTIMI *et al.*, 1996).

Mutações em *TP53* são encontradas em 4% a 20% dos TWs de histologia favorável (D'ANGIO *et al.*, 2003). Posteriormente, analisando cinco *loci* (*WT1*, *CTNNB1*, *WTX*, *TP53* e *H19/IGF2*) foram identificadas mutações em *TP53* em 3 de 65 (5%) dos TWs esporádicos (SCOTT *et al.*, 2012). Os pacientes com TW com anaplasia difusa (TWAD) são classificados como de alto risco em ambos os protocolos COG e SIOP, e podem ser divididos em dois grupos distintos quanto ao prognóstico. Pacientes com TWAD e alterações em *TP53* (sequência alterada e/ou perda de pelo menos um alelo) tem um risco aumentado de recaída e morte, comparado ao primeiro grupo, o que demonstra que pacientes com TWAD com ou

sem mutação de *TP53* devem ser classificados em diferentes grupos de risco e, portanto, serem tratados de forma diferente (MASCHIETTO *et al.*, 2014b).

Um estudo de pacientes tratados conforme o protocolo COG, demonstrou que 57 de 118 pacientes (48%) com TW de histologia desfavorável apresentaram mutações *TP53* pela técnica de MLPA (OOMS *et al.*, 2016).

Uma porcentagem similar para pacientes tratados conforme o protocolo SIOP foi identificada utilizando técnicas de MLPA e hibridação *in situ* por fluorescência (FISH, do inglês *Fluorescence In Situ Hybridization*), em que foram avaliados 86 TWs (47 de alto risco (30 anaplasia difusa e 17 blastêmicos) e 39 de risco baixo/intermediário), sendo que 45/86 TWs apresentaram alterações *TP53*, predominantemente com anaplasia difusa de alto risco (29/30) e TWs blastêmicos (7/17) (WEGERT *et al.*, 2017).

3.4 Amplificação e mutações em *MYCN*

MYCN é um oncogene localizado em 2p, que regula diversas funções celulares, como proliferação celular, controle do ciclo celular, diferenciação e apoptose (RICKMAN, SCHULTE, EILERS, 2018). O aumento da expressão de *MYCN* foi reportado primeiro por Nisen *et al.* (1986), em 12 dos 13 casos independentes de TW. Posteriormente, outro estudo reportou um caso de TW com três cópias de *MYCN* (NORRIS, 1988).

Um estudo desenvolvido por McQuaid & O'Meara (1990) com 29 pacientes pediátricos (14 neuroblastoma, 9 TWs e 6 diversos) investigou a amplificação de *MYCN* em amostra do tumor primário usando pNb-1, um plasmídeo recombinante contendo um fragmento de 1 Kb homólogo à extremidade 5' de *MYCN*. Apenas um TW de histologia desfavorável, estadió III, e resistente ao tratamento apresentou *MYCN* amplificado, sendo que nos demais TWs o *MYCN* estava presente com cópia única.

Por meio da técnica de aCGH, 13 amostras (12 com histologia favorável e 1 com histologia desfavorável) de TW foram avaliadas para alterações de número de cópias, revelando amplificação em dois TWs (um deles anaplásico) (SCHAUB *et al.*, 2007).

Ainda utilizando a técnica de aCGH foi identificado o ganho de *MYCN* em 6/61 amostras anaplásicas (WILLIAMS *et al.*, 2011). Perotti *et al.* (2012) também identificaram alterações em 5 das 77 amostras de TWs envolvendo a região do *MYCN*.

Em posterior estudo, o ganho do número de cópias em *MYCN* foi observado mais frequente em casos anaplásicos difusos (7 de 23 casos, 30,4%) do que em casos não-anaplásicos (37 de 292, 12,7%) (WILLIAMS *et al.*, 2015).

O sequenciamento de 810 TWs de histologia favorável tratados conforme o protocolo SIOP, revelou que 24 de 810 (3%) dos casos de TWs apresentaram mutações em *MYCN*, resultando na variante somática *MYCN* P44L, detectada na maioria dos subtipos histológicos, com maior frequência no subtipo blastematoso, sendo que 10,9% dos tumores com mutação em *MYCN* P44L apresentaram recidiva local, em comparação com 2,4% dos casos não sem a mutação (JIMENEZ *et al.*, 2021).

3.5 Mutações em *AMER1*

AMER1, anteriormente denominado de *WTX*, codifica a proteína *AMER1* que atua na regulação da via de sinalização Wnt, envolvida com a divisão, a adesão e a migração celular. *AMER1* está localizado em Xq11.1 e é identificado mutado em aproximadamente 10% a 20% dos casos esporádicos de TWs (WEGERT *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2012; GADD *et al.*, 2017).

Por meio da técnica de aCGH, foram identificadas deleções somáticas em um gene anteriormente não caracterizado no cromossomo X, o *AMER1*, de 51 TWs analisados 11 (21,6%) tiveram deleções de *AMER1* e 4 (7,8%) tiveram mutações pontuais em *AMER1* (RIVERA *et al.*, 2007).

Um estudo avaliou a frequência de mutações de *AMER1* em 125 TWs por meio da técnica de sequenciamento sanger, em que 23 de 125 (18,4%) TWs carregavam um total de 24 mutações em *AMER1*, uma frequência mais baixa do que a observada por Rivera *et al.*, 2007. Além disso, por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR, do inglês

quantitative real-time PCR), o estudo também avaliou um grupo adicional de 52 TWs quanto à deleção de *AMER1*, que foi identificada em cinco casos (9,6%) (RUTESHOUSER, ROBINSON, HUFF, 2008).

Posteriormente, *AMER1* foi estudado em 102 TWs por meio de análises de qPCR, que detectaram deleções em 5 de 45 (11%) TWs do sexo masculino e em 9 de 50 (19%) TWs do sexo feminino, sendo que a deleção afetou o cromossomo X ativo apenas em dois casos (4%) (PEROTTI *et al.*, 2008).

Wegert *et al.* (2009) determinaram o *status* de mutação de *WTX*, *CTNNB1* e *WT1* em uma coorte de 429 TWs, em que alterações genômicas (deleções ou perda de alelos) de *WTX* foram identificadas em 17% dos TWs. Ao avaliar a expressão pela técnica de qPCR, 63 de 243 (26%) dos casos avaliados com TWs de histologia favorável tratados pelo protocolo SIOP mostraram expressão muito baixa ou ausente de mRNA de *WTX*. Curiosamente, as alterações em *WTX* (mutação ou ausência de expressão) não foram associadas com os parâmetros clínicos avaliados, sugerindo que as mutações de *WTX* têm pouco impacto direto no comportamento dos TWs (WEGERT *et al.*, 2009).

Scott *et al.* (2012) identificaram que dentre cinco loci analisados (*WT1*, *CTNNB1*, *WTX*, *TP53* e a região 11p15) em 120 TWs, 69% dos tumores apresentaram anormalidades epigenéticas em 11p15, das quais 37% foram epimutações em H19 – a epimutação é uma alteração hereditária com origem em modificações aleatórias da cromatina em uma determinada posição ou região (HU, BARRETT, 2017) – e 32% dissomia uniparental paterna (pUPD) – a UPD é uma herança de um par de cromossomos de apenas um genitor (pai ou mãe), quando o par de cromossomos descendem do gameta feminino é dissomia uniparental materna (mUPD), e quando o par de cromossomos descendem do gameta masculino é ou paterna (pUPD) (MALUF, RIEGEL, 2011). Também foram encontradas mutações de *WTX* em 32%, *CTNNB1* em 15%, *WT1* em 12% e *TP53* em 5% dos tumores. Além disso, o estudo identificou associações entre 11p15 e *WTX*, entre *WT1* e *CTNNB1*, entre *WT1* e pUPD 11p15, e uma forte associação negativa entre *WT1* e epimutação H19.

3.6 Alterações em *WT1* e *CTNNB1*

WT1, localizado no cromossomo 11p13, foi clonado pela primeira vez em 1990 como um gene supressor de tumor em TW (CALL *et al.*, 1990; BONETTA *et al.*, 1990; GESSLER *et al.*, 1990). O *WT1* codifica um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento dos rins e das gônadas (HUFF, 1998; DOME, HUFF, 2003), inativado em linhagem germinativa de crianças com predisposição genética ao TW e em um subconjunto de cânceres esporádicos, que pode causar graves anormalidades da diferenciação renal e sexual (LEE, HABER, 2001).

Koufos *et al.* (1984) publicaram um estudo em que 3 de 7 casos de TWs primários analisados apresentaram a perda do cromossomo 11p. No mesmo ano, diferentes estudos mostraram perdas no cromossomo 11p em pacientes com TWs (ORKIN, GOLDMAN, SALLAN, 1984; FEARON, VOGELSTEIN, FEINBERG, 1984; REEVE *et al.*, 1984).

Ao longo dos anos, os estudos têm mostrado que 11p13 está alterado na linhagem germinativa ou somaticamente em cerca de 15% dos casos de TWs (CHARLTON, PRITCHARD-JONES, 2016). Além disso, cerca de 15% dos TWs apresentam mutação em *CTNNB1* (RUTESHOUSER, ROBINSON, HUFF, 2008; GADD *et al.*, 2017), as quais normalmente ocorrem em concomitância com *WT1* (SCOTT *et al.*, 2012).

3.7 11p15

Outra região gênica onde são encontradas anormalidades em aproximadamente 50 a 80% dos pacientes com TW são nos locis em 11p15 (GADD *et al.*, 2017), mais especificamente no locus *H19/IGF2*, que engloba o fator de crescimento *IGF2* e o RNA não codificante *H19* (SCOTT *et al.*, 2012).

Cerca de 70% dos casos esporádicos de TWs são caracterizados por perda de imprinting (LOI, do inglês *Loss of Imprinting*) ou LOH de 11p15 (MASCHIETTO *et al.*, 2014a) – o imprinting é um processo de silenciar genes por meio da metilação do DNA, em que uma cópia de um gene de em um indivíduo (da mãe ou do pai) é expressa (não metilada), enquanto a outra cópia é suprimida (metilada) (JELINIC, SHAW, 2007).

3.8 Candidatos a biomarcadores para serem implementados em TWs

Os grupos internacionais COG e SIOP vêm testando prospectivamente diversos candidatos a biomarcadores (**Tabela 1**). Atualmente, os protocolos terapêuticos objetivam personalizar o tratamento de pacientes com TWs, essencialmente com a finalidade de diminuir os efeitos colaterais a curto e longo prazo, mas sem reduzir a sobrevida, além de intensificar o tratamento nos casos que apresentam pior prognóstico. Com o uso de biomarcadores, estudos recentes têm buscado definir os grupos de pacientes com TW de baixo e alto risco.

Tabela 1 - Candidatos a biomarcadores de TW.

Biomarcador	Ocorrência	Tipo Histológico	Alterações	Referências
AMERI (Xq)	15 a 20%	Todas as histologias	Perda	WEGERT <i>et al.</i> , 2009
1p	11%	Histologia favorável	Perda	GRUNDY <i>et al.</i> , 2005
1q	30%	Todas as histologias	Ganho	BOWN <i>et al.</i> , 2002; CHAGTAI <i>et al.</i> , 2016
MYCN (2p)	13%	Histologia desfavorável	Amplificações	WILLIAMS <i>et al.</i> , 2015
WT1 (11p)	10 a 15%	Todas as histologias	Perda	SCOTT <i>et al.</i> , 2012; GADD <i>et al.</i> , 2017
16q	17%	Histologia favorável	Perda	GRUNDY <i>et al.</i> , 2005
TP53 (17p)	4% a 20%	Histologia desfavorável	Perda	MASCHIETTO <i>et al.</i> , 2014b; WEGERT <i>et al.</i> , 2017

4 Justificativa

Nas últimas décadas, a abordagem multidisciplinar do tratamento dos TWs tornou-se um exemplo das histórias de sucesso da oncologia pediátrica (SZYCHOT, APPS, PRITCHARD-JONES, 2014). Na América do Norte e Europa, os recentes avanços na terapia

do TW evoluíram para modificar a intensidade de tratamento de acordo com propriedades biológicas específicas (LOVVORN *et al.*, 2015).

Entre as contribuições para os avanços no tratamento de TW estão a adequação da terapia com base em fatores clínicos e biológicos, como idade do paciente, tamanho e volume do tumor, resposta à quimioterapia e LOH nos cromossomos 1p e 16q (DOME *et al.*, 2013; DOME *et al.*, 2014).

Ensaio clínicos sucessivos realizados pelo COG, SIOP e outros grupos de estudo resultaram em sobrevida global superior a 90% para pacientes com TW. Contudo, os tratamentos têm morbidades associadas e existem subgrupos – com características histológicas e moleculares desfavoráveis, doença bilateral e doença recorrente – em que a sobrevida global cai significativamente.

A fim de melhorar as taxas de cura, identificar pacientes de alto risco e reduzir a morbidade relacionada ao tratamento – neoplasias secundárias, doenças cardíacas, problemas reprodutivos e fadiga crônica, entre outras complicações (GREEN *et al.*, 2001; WRIGHT, GREEN, DAW, 2009; BRESLOW *et al.*, 2010; TERMUHLEN *et al.*, 2011; WONG *et al.*, 2016) – novas abordagens são necessárias.

Desse modo, biomarcadores mais específicos para a estratificação do tratamento poderiam permitir a terapia adaptada de acordo com os aspectos biológicos de cada tumor, além de identificar alvos terapêuticos com um perfil de eficácia/toxicidade mais favorável em comparação com os agentes quimioterápicos normalmente utilizados (DOME *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Validar os candidatos a biomarcadores *AMERI* (Xq), 1p, 1q, *MYCN* (2p), *WT1* (11p), 16q e *TP53* (17p) em pacientes com TW tratados no Centro Infantil Boldrini.

2 Objetivos específicos

- Selecionar pacientes com TW tratados no Centro Infantil Boldrini com material biológico disponível;
- Coletar as informações clínicas e patológicas dos pacientes;
- Extrair o DNA das amostras de tumores congelados viáveis;
- Avaliar o número de cópias de *AMERI* (Xq), 1p, 1q, *MYCN* (2p), *WT1* (11p), 16q e *TP53* (17p);
- Comparar os achados moleculares com as informações clínicas e patológicas dos pacientes;
- Comparar os achados moleculares com os achados dos estudos de coortes internacionais.

3 METODOLOGIA

3.1 Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Infantil Boldrini sob o número do Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE): 18608519.2.0000.5376 (**Anexos**).

3.2 Casuística

As amostras de tecido renal são provenientes de crianças com diagnóstico anatomopatológico confirmado de TW de casos retrospectivos, e a maioria delas tratada de acordo com o protocolo COG no Centro Infantil Boldrini entre os anos de 2005 e 2020. Neste período, conforme informações concedidas pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital Infantil Boldrini, foram registrados 192 pacientes portadores de TW.

Dos 192 pacientes, após análise dos prontuários, constatou-se que 6 pacientes, posteriormente, foram diagnosticados com um outro tipo de tumor renal. Para os experimentos, foram utilizados pacientes diagnosticados com TW com amostras congeladas no Biobanco da instituição e que tivessem o termo de consentimento assinado pelo responsável legal. Assim, dos 186 pacientes restantes, 47 casos foram selecionados para as análises moleculares (**Figura 3**) realizado no software Lucidchart.

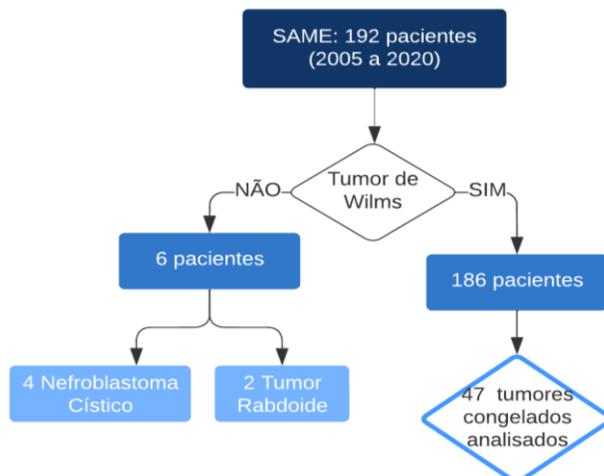


Figura 3 - Fluxograma da casuística produzido no Lucidchart. Observação: Nefroblastoma Cístico é TW cístico.

3.3 Variáveis

A partir do levantamento dos dados clínicos e patológicos extraídos dos prontuários dos pacientes, as variáveis deste estudo foram organizadas em três categorias (paciente, tumor e tratamento), conforme apresentado no **Quadro 5**.

Quadro 5 - Variáveis do estudo.

Paciente	Tumor	Tratamento
Quantidade	Estadiamento patológico	Quimioterapia Pré-Nefrectomia
Sexo	Peso da Peça Cirúrgica Total	Radioterapia
Cor	Lateralidade	Protocolo
Peso ao Nascimento	Classificação Histológica	Regime
Idade ao Diagnóstico	Predomínio Histológico	Desvio de Tratamento
Peso ao Diagnóstico	Metástase ao Diagnóstico	Duração do 1º Esquema Quimioterápico
Altura ao Diagnóstico		Resposta
Índice de Massa Corporal (IMC)		Óbito
Estadiamento Clínico		

3.4 Seleção das amostras

As amostras de TW deste estudo foram obtidas no Biobanco do Centro de Pesquisa do Centro Infantil Boldrini. Essas amostras foram coletadas por biópsia, antes de qualquer procedimento/tratamento e armazenadas em RNAlater a -80°C .

Para cada tumor, com o uso de bisturi, foi realizado um corte do tumor, que ficou armazenado em microtubos de 1,5 mL e congelado a -20°C até o momento da extração de DNA.

3.5 Extração de DNA

Para a padronização de extração de material congelado, foi utilizado o Kit GenELUTE Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. As amostras foram extraídas em temperatura ambiente. Inicialmente, com auxílio de uma pinça anatômica, o tecido foi cuidadosamente coletado, fragmentado e transferido para um microtubo de 1.5 mL. Em seguida, foi adicionado 20-30 μL Lysis Solution T para macerar o tecido. Em seguida, foi adicionado o volume restante de Lysis Solution T para completar 180 μL e adicionado 20 μL de Proteinase K, e então o tubo foi vortexado e incubado a 55°C até a digestão completa (2 a 4 horas). Após completar a digestão, o tubo foi vortexado novamente, adicionado 20 μL de RNase A Solution e incubado a 2 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200 μL de Lysis Solution C ao tubo, que foi vortexado por 15 seg para homogeneizar a solução. Posteriormente, o tubo foi incubado a 70°C por 10 minutos. Enquanto o tubo estava na incubação, foi montada a Coluna + Tubo Coletor de 2 mL. Para a sua preparação, foi adicionado 500 μL de Column Preparation Solution e centrifugado a 12.000 x g por 1 minuto. Finalizada a centrifugação, foi descartado o líquido, mas mantido o tubo coletor. Em seguida, foi adicionado 200 μL de etanol 100% ao lisado e vortexado por 10 seg, deixando a solução homogênea. Em seguida, foi transferido todo o conteúdo do passo anterior (lisado + etanol) para a coluna tratada (utilizando uma ponteira de fundo largo), e em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 7.000 x g por 1 minuto. Finalizada a centrifugação,

foi descartado o tubo coletor e posicionado a coluna sobre um novo. Em seguida, foi adicionado 500 μL de Wash Solution diluído na coluna e centrifugado a 7.000 x g por 1 minuto. Após, foi descartado o líquido, mas mantido o tubo coletor. Em seguida, foi adicionado 500 μL de Wash Solution diluído na coluna e centrifugado a velocidade máxima (16.000x g) por 3 minutos. Então, a coluna ficou seca para retirar todo o etanol. Após, foi descartado o tubo coletor e posicionado a coluna sobre um novo coletor. Em seguida, foi pipetado 100 μL de Elution Solution no centro da coluna e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Após, foi centrifugado por 1 minuto a 7.000 x g. Em seguida, a etapa anterior foi repetida utilizando um novo tubo coletor para uma segunda eluição, em que foi utilizado 70 μL de Elution Solution.

3.6 Avaliação do DNA

Para obter o controle de qualidade do material genômico extraído foram realizadas as seguintes etapas:

- 1) Quantificação obtida pelo fluorômetro Qubit Fluorometric Quantitation (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).
- 2) Pureza do DNA extraído avaliada pela razão 260/280 analisada no espectrofotômetro Biodrop Duo (Biochrom Ltd Cambourne, Cambridge), que deve ficar acima de 1,7, pois abaixo indicar a presença de outras moléculas na amostra, como proteínas (acima de 1,8 a amostra é considerada pura).
- 3) Integridade do DNA genômico avaliada através de eletroforese em gel de agarose (banda de alto peso molecular sem arraste significativo que indique degradação).

3.6.1 Quantificação - Qubit

Para quantificar o DNA, foi utilizado o kit Qubit dsDNA BR Assay (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), conforme especificações do fabricante.

Inicialmente, foi preparado o mix de quantificação na proporção 1:200 (buffer + fluoróforo). Exemplo: 199 uL de buffer + 1 uL de fluoróforo. Em seguida, foi pipetado 198 uL de mix + 2 uL de cada amostra, nos respectivos tubos de quantificação previamente identificados. Os tubos foram incubados no escuro à temperatura ambiente por 2 minutos. Por fim, os tubos foram inseridos para leitura no equipamento Qubit Fluorometric Quantitation.

3.6.2 Pureza - Biodrop

Para ver a pureza do DNA, foi utilizado o equipamento Biodrop conforme especificações do fabricante. Inicialmente, foi pego 2 uL da solução em que foi eluída a amostra para solução utilizar como “branco” no equipamento, calibrando-o. Em seguida, para avaliar a razão 260/280, foi pipetado 2 uL de amostra diretamente no Biodrop.

3.6.3 Integridade - Gel de Agarose

Após determinadas concentrações das amostras, seguiu-se para o passo de controle de qualidade, com o preparo do gel de agarose 0,8%. Com o auxílio de uma espátula, foi pesado 0,4 g de agarose em um erlenmeyer. Em seguida, foi medido na proveta 50 mL de TBE 1x e inserido no erlenmeyer com a agarose, que foi levado ao micro-ondas até a dissolução completa da agarose (cerca de 2 minutos). Depois de retirado do micro-ondas, foi adicionado 2 uL de syber safe no erlenmeyer e deixado solidificando no suporte para gel de agarose, previamente montado com a fita. Após completamente solidificado o líquido, foram aplicadas as amostras e o ladder 1kb, conforme os seguintes passos: foi pipetado 2 uL da

amostra e completado com TA 1x para o volume final de aplicação de 10 uL, e, considerando a quantificação (ng/uL) de cada amostra, foi aplicado diferentes quantidades de uL de amostra (se 50 ng, então 1 uL de amostra, se 50 ng, então 2 uL de amostra, e se 10 ng, então 5 uL de amostra). Especificações da corrida: foi aplicado 4,5 uL de ladder no primeiro poço do gel, e aplicado 10 uL (amostra + TA 1x) no gel nos poços restantes; a máquina de eletroforese foi setada para 100 V por 40 minutos; após a corrida, o gel foi fotografado no Chemidoc.

3.7 MLPA

A técnica de Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (MLPA) é baseada na amplificação de até 60 sondas, que detecta variações no número de cópias em sequências curtas de DNA (50-70 nucleotídeos), descrita inicialmente por Schouten *et al.* (2002) e hoje patenteada pela empresa holandesa MRC-Holland. Ao longo dos anos, MLPA tornou-se uma das técnicas mais utilizadas para a investigação molecular de doenças genéticas (STUPPIA *et al.*, 2012, MRC-Holland, 2022).

A técnica é baseada na hibridização de sondas específicas em regiões de interesse do genoma. Para isso, a MLPA é composta das seguintes etapas, de acordo com a MRC-Holland: 1) Desnaturação da amostra de DNA; 2) Hibridação de uma mistura de sondas MLPA que são adicionadas à amostra de DNA desnaturado, em que cada sonda contém dois oligonucleotídeos (5' - 3' e 3' - 5') separados que devem hibridar com sequências alvo imediatamente adjacentes para serem ligadas em uma única sonda; 3) Ligação apenas das sondas que foram hibridizadas; 4) Amplificação das sondas ligadas por meio de uma reação de PCR, com um primer marcado de forma fluorescente, resultando em um conjunto de amplicons de PCR exclusivos; 5) Eletroforese capilar para separar os amplicons, permitindo que os produtos de amplificação sejam visualizados durante a separação do fragmento em um instrumento; 6) Análise dos fragmentos, que produzem um eletroferograma específico de cada amostra – aqui cabe ressaltar que a técnica de MLPA é relativa, ou seja, a altura relativa de cada pico de sonda individual, em comparação com as alturas de pico de sondas relativas

em várias amostras de DNA de referência, reflete o número de cópias relativo da sequência alvo correspondente em uma amostra.

Abaixo, seguem as etapas detalhadas da técnica de MLPA, seguindo o Protocolo Geral MLPA - MRC Holland.

1) Desnaturação do DNA (1º dia)

A primeira etapa consistiu em aquecer as amostras de DNA de 5 µl por 5 minutos a 98°C.

- Rotulação de tubos de 0,2 ml.
- Adição de 5 µl de amostra de DNA (totalizando 80 ng) a cada tubo.
- Colocação dos tubos no termociclador.
- Iniciação das etapas 1-2 do programa de MLPA.
- Certificação de que as amostras estavam a 25°C antes da remoção dos tubos do termociclador.

2) Hibridização de sondas para amostra de DNA (1º dia)

A segunda etapa consistiu em adicionar 3 µl do master mix de hibridização a cada amostra de DNA, incubar por 1 minuto a 95°C e hibridizar por 16 horas a 60°C.

- Preparação do master mix de hibridização (por reação): 1.5 µl MLPA buffer e 1.5 µl SALSA probemix. Misturado bem com pipetagem.
- Adição do master mix de hibridização aos tubos com DNA da etapa anterior.
- Misturado bem pipetando suavemente para cima e para baixo.
- Continuação com as etapas 3-4 do programa de MLPA.

3) Ligação de sondas hibridizadas (2º dia)

A terceira etapa consistiu em abaixar a temperatura do termociclador para 54°C, abrir os tubos e adicionar 32 µl do master mix de Ligase-65, incubar por 15 minutos a 54°C e aquecer a inativação da enzima ligase: 5 minutos a 98°C.

- Preparação do master mix de Ligase-65 (por reação): 25 µl água ultrapura, 3 µl ligase buffer A, 3 µl ligase buffer B e 1 µl enzima Ligase-65. Misturar bem pipetando suavemente para cima e para baixo.
- Continuação com a etapa 5 do programa do termociclador.
- Adição de 32 µl do master mix de Ligase-65 a cada reação MLPA, quando o termociclador atingiu 54°C e enquanto as amostras estavam dentro do termociclador. Misturado bem pipetando suavemente para cima e para baixo.
- Continuação com as etapas 6-8 do programa de MLPA.

4) Amplificação de PCR de sondas ligadas (2º dia)

A quarta etapa consistiu em esfriar até a temperatura ambiente, abrir os tubos, adicionar 10 µl do master mix de polimerase à temperatura ambiente, iniciar PCR (35 x {95°C 30 - segundos, 60°C - 30 segundos, 72°C - 60 segundos}, 72°C - 20 minutos, pausa a 15°C).

- Preparação do master mix de polimerase (por reação): 7.5 µl água ultrapura, 2 µl SALSA PCR primer mix e 0.5 µl SALSA polymerase. Misturado bem pipetando suavemente para cima e para baixo.
- Adição de 10 µl do master mix de polimerase a cada reação MLPA à temperatura ambiente. Misturado bem pipetando suavemente para cima e para baixo. Colocado imediatamente os tubos no termociclador e continuado o programa do termociclador com as etapas 9-11.
- Após a reação de PCR, os tubos não foram abertos na mesma sala do termociclador. Para evitar contaminação, foram utilizadas micropipetas diferentes para realizar as reações MLPA e manusear produtos MLPA PCR.
- O produto PCR foi armazenado protegido da luz a 4°C até ser processado. Logo após isso, o produto foi armazenado entre -25°C e -15°C.

5) Separação de fragmentos por eletroforese capilar (2º dia)

O instrumento utilizado foi ABI-3500, com o corante primer FAM, capilares de 36, 50 cm e a mistura de injeção de 0.7 µl de reação de PCR, 0.2 µl LIZ GS 500 tamanho padrão, 9 µl HiDi formamida. Após a injeção da mistura, a placa de injeção foi selada, aquecida por 3

min a 86°C, resfriada por 2 min a 4°C (foi aquecido brevemente a mistura de injeção antes da eletroforese capilar).

6) Análise dos resultados

As análises dos dados foram realizadas por meio do Coffalyser.Net analysis software (www.mrcholland.com).

A **Tabela 2** mostra todas as etapas do programa de termociclador da técnica de MLPA.

Tabela 2 - Programa de termociclador para técnica de MLPA.

Desnaturação do DNA			
1	98°C	5 minutos	
2	25°C	Pausa	
Reação de Hibridização			
3	95°C	1 minuto	
4	60°C	16-20 horas	
Reação de Ligação			
5	54°C	Pausa	
6	54°C	15 minutos	
7	98°C	5 minutos	
8	20°C	Pausa	
9	35 ciclos	95°C	30 segundos
		60°C	30 segundos
		72°C	60 segundos
10	72°C	20 minutos	
11	15°C	Pausa	

3.8 Validação de amostras utilizando ensaios TaqMan®

As amostras de DNA que mostraram grande desvio padrão nos dados do MLPA foram submetidas a qPCR no sistema SDS 7500 Fast – que é uma variação da técnica de PCR, a qual permite que a amplificação e quantificação da sequência de interesse ocorram em tempo real. Para tanto, o experimento foi realizado com o ensaio *TaqMan* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), que tem maior especificidade e sensibilidade.

A técnica é baseada em uma sonda (oligonucleotídeo) que contém uma molécula fluorescente chamada *reporter* na extremidade 5', responsável por gerar a fluorescência, e outra molécula chamada *quencher* na extremidade 3', que absorve o sinal fluorescente do *reporter* (ou seja, quando a sonda está intacta, as duas moléculas trocam energia uma com a outra e a fluorescência fica inibida). Durante a qPCR, a sonda hibridiza com a sequência alvo de DNA de fita simples. Na amplificação, a *Taq* DNA polimerase cliva a sonda ligada ao DNA, de modo que o *repórter* e o *quencher* são separados, o que resulta no aumento da intensidade da fluorescência emitida, o que permite a quantificação do produto amplificado a cada ciclo (HOLLAND *et al.*, 1991; HEID *et al.*, 1996).

Para este estudo foram utilizadas duas sondas: uma da região de interesse e uma referência (RNaseP), sendo que em cada uma delas há um *reporter* e um *quencher*, marcadas cada uma com corantes diferentes, VIC™ e TAMRA™. A **Tabela 3** mostra os reagentes utilizados para a reação de PCR quantitativa realizada neste estudo.

Tabela 3 - Reação e ciclo de PCR multiplex.

Reagentes	Volume por reação	Ciclo de qPCR (40x)
TaqPath™ ProAmp™ Master Mix	5,0 µL	95°C – 10 min
TaqMan® Copy Number Assay (20x)	0,5 µL	95°C – 15 s
TaqMan® Copy Number Reference Assay (20x)	0,5 µL	60°C – 1 min
DNA	3,0 µL	
Água	1,0 µL	
Volume total	10,0 µL	

3.9 Avaliação do número de cópias de genes nos TWs

Os experimentos de MLPA foram avaliados no programa Coffalyser.Net (MRC Holland, Amsterdam, Holanda) que identifica um pico da seguinte forma: a) normal quando o Índice de Pico Relativo (RPR) resulta dentro de uma faixa de 0,7 a 1,3, b) excluído quando o RPR é $<0,7$, c) duplicado quando o RPR é $> 1,3$. Estes valores são calculados a partir dos valores de fluorescência de sondas desenhadas em regiões normalmente não alteradas (controle interno) além de uma amostra controle.

Para amostras analisadas em qPCR, foi utilizado o software *Applied Biosystems CopyCaller*® (Thermo Fisher), que analisa os dados gerados por experimentos *TaqMan*® *Copy Number Assay* executados em sistemas de PCR em tempo real da Applied Biosystems.

O software CopyCaller® realiza uma análise de quantificação relativa de CT comparativa ($\Delta\Delta CT$) dos dados em tempo real, que determina o número de cópias da sequência alvo em cada amostra. O método $\Delta\Delta CT$ primeiro calcula a diferença (ΔCT) entre os ciclos de limiar das sequências de ensaio alvo e de referência. Em seguida, o método compara os valores de ΔCT das amostras com uma amostra calibradora que contém um número conhecido de cópias da sequência alvo (Thermo Fisher, 2022).

O ensaio deste estudo utilizou a quantificação relativa, já que buscou analisar alterações na expressão gênica em uma determinada amostra relativa à outra amostra de referência, no caso, o rim normal. Além disso, no ensaio é utilizado um controle endógeno como uma referência ativa, no caso a RNase P. Foi feita a avaliação da quantidade de cópias para as regiões cromossômicas: *AMER1* (Xq), 1p, 1q, *MYCN* (2p), *WT1* (11p), 16q e *TP53* (17p).

3.10 Correlação dos achados com características clínicas e patológicas

As características clínico-patológicas foram organizadas em uma tabela em Excel (Microsoft, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA), considerando variáveis qualitativas e quantitativas e analisadas no programa IBM® SPSS Statistics 23 (International

Business Machines Corporation, IBM, Armonk, Nova York, EUA) e foram comparadas com as características moleculares de cada paciente utilizando o teste qui-quadrado (X^2).

Contudo, uma vez que os dados não atenderam a todos os pressupostos do teste (a amostra deve ter pelo menos 5 observações em cada célula), foram utilizados os resultados do Teste Exato de Fisher, que tem p-valor preciso para todos os tamanhos amostrais.

3.11 Avaliação de amostras armazenadas em parafina

Este estudo também avaliou casos da coorte dos pacientes com TW de 2005 a 2020 que estavam armazenados em material parafinado no Hospital do Centro Infantil Boldrini, a fim de aumentar o número de indivíduos e aprimorar os resultados.

3.11.1 Seleção de amostras tumorais parafinadas

Junto ao Departamento de Patologia, foi realizada uma busca das lâminas de hematoxilina-eosina (HE) referentes às amostras de tumores com predomínio de componente blastematoso fixadas em parafina. Todos os casos foram revisados pela patologista Dra. Izilda Aparecida Cardinalli, acompanhados da pesquisadora (TOB), confirmando o componente histológico de interesse, ou seja, a seleção de lâminas com maior % de componente blastematoso. Durante a revisão das lâminas e dos prontuários, foi preenchida uma ficha com as seguintes características referente a composição da lâmina: % componente blastematoso, % componente epitelial, % componente estromal, % necrose e demais observações do patologista responsável e/ou pesquisadora.

Para cada bloco selecionado, foi feita uma macrodissecção dos componentes do rim normal e do TW, realizada pelos técnicos do Departamento de Patologia (Irineu Mantovanelli Neto e Aparecido Paulo de Moraes), juntamente com a pesquisadora (TOB). Para cada bloco, foram realizados de 5 a 10 cortes transversais de 5 μm de espessura utilizando o micrótomo (LEICA RM2125RT). O conjunto de cortes foram armazenados em microtubos de 1,5 mL e congelados a -20°C até o momento da extração de DNA.

3.11.2 Extração de DNA

Para a padronização de extração de material parafinado, foi utilizado o kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), seguindo o protocolo FFPE Tissue Lysate de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. As amostras foram extraídas em temperatura ambiente conforme as seguintes etapas:

Etapa 1 – Preparando o lisado: 1. Foram colocados cinco cortes de 5 µm de espessura de cada amostra em um microtubo estéril. 2. seguido de adição de 1 mL de xilol às amostras, que em seguida foram homogeneizadas por alguns segundos. 3. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados à velocidade máxima da centrífuga durante 3 minutos e o sobrenadante foi removido. 4. Logo após, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto, com posterior homogeneização e centrifugação (velocidade máxima durante 3 minutos) e removido o sobrenadante (o passo 4 foi repetido mais uma vez). 5. Em seguida, os microtubos foram incubados com a tampa aberta a 37°C por aproximadamente 10 minutos para evaporar os resíduos de etanol. 6. Logo após, foram adicionados aos microtubos 180 µL de PureLink® Genomic Digestion Buffer e 20 µL de Proteinase K e misturados por breve vórtex e incubados a 50°C por aproximadamente 3 horas. 7. Após a incubação, o lisado foi centrifugado (velocidade máxima durante 3 minutos) e transferido para um novo microtubo estéril. 8. Em seguida, foram adicionados 20 µL de RNase A ao lisado, com posterior homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 2 minutos. 9. Em seguida, foram adicionados ao lisado 200 µL de PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer e misturado por vórtices breves. 10. Para finalizar esta etapa, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto ao lisado, misturado em vórtex por 5 segundos para obter uma solução homogênea.

Etapa 2 – Ligação do DNA: O lisado (~ 640 µL) foi adicionado à PureLink® Spin Column. Em seguida, a coluna foi centrifugada a $10.000 \times g$ durante 1 minuto. Após a centrifugação, o tubo de coleta foi descartado e a coluna foi colocada em um PureLink® Collection Tube.

Etapa 3 – Lavagem do DNA: 1. Foram adicionados à coluna 500 µL de Wash Buffer 1 e em seguida, a coluna foi centrifugada a $10.000 \times g$ durante 1 minuto, e então descartado o tubo de coleta e colocado a coluna de centrifugação em um PureLink® Collection Tube. 2.

Foram adicionados à coluna 500 µL de Wash Buffer 2 e em seguida a coluna foi centrifugada à velocidade máxima durante 3 minutos e novamente descartado o tubo de coleta.

Etapa 4 – Eluição do DNA: A coluna de centrifugação foi transferida para um microtubo estéril de 1,5 mL e foi adicionado a ela 100 µL de PureLink® Genomic Elution Buffer. Posteriormente, a coluna foi incubada em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada à velocidade máxima durante 1 minuto. Com o objetivo de recuperar maior quantidade de DNA, foi executado novamente o passo anterior utilizando 50 µL de PureLink® Genomic Elution Buffer em um novo microtubo estéril de 1,5 mL. Os microtubos foram identificados e armazenados em alíquotas a 4°C para uso imediato e a -20°C para armazenamento a longo prazo, para evitar o congelamento e descongelamento repetidos do DNA.

3.11.3 Quantificação do DNA

Para quantificar o DNA, foi utilizado o kit Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), conforme especificações do fabricante. Foi preparada uma solução contendo 2 µL de DNA diluído e 198 µL do mix previamente preparado e incubado no escuro à temperatura ambiente por 2 minutos. Logo após, foi realizada a leitura no aparelho Qubit Fluorometric Quantitation e determinadas as concentrações das amostras.

3.11.4 Avaliação da integridade do DNA

A integridade qualidade do DNA foi avaliada por uma PCR multiplex, que amplifica quatro bandas de aproximadamente 100, 200, 300 e 400 pares de bases flanqueando sequências localizadas no gene Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*GAPDH*), com 4 pares de *primers* conforme o conjunto de 8 primers listados na (**Tabela 19**). O que possibilitou estimar a degradação e verificar a possibilidade de amplificar tamanhos de fragmentos equivalentes aos fragmentos para avaliar o número de cópias. A reação e o ciclo de PCR utilizados estão descritos na **Tabela 20**.

Tabela 19 - Sequências dos *Primers*.

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Fragmento da Amplificação
GAPDH 1	GTTCCAATATGATTCCACCC	CCATCACCATCTTCCAGGAG	100bp
GAPDH 2	AGGTGGAGCGAGGCTAGC	AGGACATTTCCACCGCAA	198bp
GAPDH 3	AGGTGAGACATTCTTGCTGG	GACGCTGACTGGTTAGTGGA	299bp
GAPDH 4	ACAGTCCATGCCATCACTGC	CAACGACCACTTTGTCAAGC	398bp

Tabela 20 - Reação e ciclo de PCR multiplex.

Reagentes	Volume por reação	Ciclo de PCR
H2O milli-Q	12,3 µL	94°C – 4 minutos 94°C – 1 minuto 56°C – 1 minuto (35 ciclos) 72°C – 1 minuto 72°C – 7 minutos 4°C – ∞
Buffer 10X c/ MgCl ₂	5,0 µL	
MgCl ₂ (50mM)	1,5 µL	
dNTP (10mM)	1,0 µL	
Primer 10mM (de cada um dos 8)	0,5 µL (X8)*	
Taq DNA polimerase 5U/uL	0,2 µL	
DNA	6,0 µL	
Volume total	30 µL	

*Observação: oito *primers* foram utilizados nesta reação.

3.11.5 Gel de agarose

O método da PCR convencional requer a visualização em gel de agarose para determinar a amplificação e especificidade do amplicon. A PCR foi verificada em gel de agarose (2%) em TBE (1X), que foi preparado com 1g de agarose e 50 mL de TBE (1X).

3.11.6 Ensaios TaqMan® Gene Expression

Após a otimização das extrações de amostras em FFPE, as amostras de DNA que amplificaram pelo menos a banda de 100 pb foram submetidas em qPCR no sistema SDS 7500 Fast. Amplificar uma banda de 100 bases seria suficiente para a integridade uma vez que todas as reações de qPCR apresentavam em torno deste tamanho. Para tanto, o experimento foi realizado com o ensaio TaqMan, da mesma forma como descrito em métodos para material congelado.

4 RESULTADOS

4.1 Seleção de casos

O SAME registrou 192 pacientes com TWs entre os anos de 2005 e 2020. Após verificação dos prontuários, foram excluídos 6 casos, visto que o diagnóstico não foi confirmado como TW. Assim, foram utilizados 186 casos para as análises descritivas. Destes, 47 casos continham amostras congeladas armazenadas no Biobanco, que foram utilizadas para validação dos biomarcadores candidatos.

4.2 Análise Descritiva

Os pacientes foram descritos conforme a lateralidade do tumor (unilateral ou bilateral) e histologia do tumor (favorável ou desfavorável), isso porque o TW apresenta características distintas quando é unilateral ou bilateral e quando é de histologia favorável ou desfavorável.

4.2.1 Pacientes diagnosticados com tumores de histologia favorável

As informações apresentadas foram retiradas dos prontuários dos pacientes. Os pacientes diagnosticados com TW unilateral e sem anaplasia totalizaram 153 de 186 (82,3%) casos, ou seja, são pacientes como TW esporádico e de histologia favorável.

Na **Tabela 4** estão listadas todas as variáveis avaliadas neste estudo, dividida em três partes (A, B e C), contendo: em A as características dos pacientes, em B as características dos tumores e em C as características dos tratamentos.

Resumidamente, a **Tabela 4** mostra predomínio da cor branca (autodeclarada, 72,5%) entre os pacientes, e maioria com índice de massa corporal (IMC) adequado (68,6%). Quanto

ao tumor, a maioria (74,5%) apresenta os três componentes celulares em proporções variadas, sendo 49,7% com predomínio do componente blastematoso, sem metástase ao diagnóstico (60,1%), 32% com estadiamento clínico III e 39,2% com estadiamento patológico II. A maioria dos casos (84,3%) seguiu o protocolo de tratamento estabelecido pelo COG, 66% dos pacientes com cirurgia seguido de quimioterapia, 48,4% seguindo o regime COG DD-4A (48,4%). Do total de pacientes, 81% não tiveram eventos e 88,9% sobreviveram após 5 anos do diagnóstico. Ao nascimento, os bebês pesaram 3.255 g (720 a 5.000 g) em média. Ao diagnóstico, as médias foram de 48 meses de idade (1 a 304 meses), 17,3 kg (4,1 a 68 kg), 102 cm de altura (54 a 172 cm). Já o produto da nefrectomia pesou 509 g em média (70 a 1.900g).

Tabela 4 - Características qualitativas dos casos com TW de histologia favorável e esporádicos.

A - Características dos Pacientes			
		N	%
Quantidade		153	100
Sexo			
	Feminino	78	51
	Masculino	75	49
Cor (autodeclarada)			
	Branco	111	72,5
	Pardo	28	18,3
	Negro	8	5,2
	Amarelo	2	1,3
	Não informado	4	2,6
Peso ao Nascimento (g)			
	Média	3.255	-
Idade ao Diagnóstico (meses)			
	Média	48	-
Peso ao Diagnóstico (g)			
	Média	17.264	-
Altura ao Diagnóstico (cm)			
	Média	102	-
Índice de Massa Corporal (IMC)			
	Baixo IMC para idade (< Percentil 3)	10	6,5
	IMC adequado ou Eutrófico (\geq Percentil 3 e < Percentil 85)	105	68,6
	Sobrepeso (\geq Percentil 85 e < Percentil 97)	14	9,2
	Obesidade (\geq Percentil 97)	9	5,9
	Não informado	15	9,8
Estadiamento Clínico			
	I	25	16,3
	II	37	24,2
	III	50	32,7
	IV	37	24,2
	Não informado	4	2,6

B) Características dos Tumores			
Estadiamento Patológico			
	I	30	19,6
	II	60	39,2
	III	41	26,8
	IV	6	3,9
	Não informado	16	10,5
Peso da Peça Tumoral Total (g)			
	Média	509	-
Lateralidade			
	Direito	72	47,0
	Esquerdo	78	51,0
	Não informado	3	2,0
Classificação Histológica			
	Unifásico	2	1,3
	Bifásico	15	9,8
	Trifásico	114	74,5
	Necrótico	3	2,0
	Não informado	19	12,4
Predomínio Histológico			
	Blastematoso	76	49,7
	Estromal	24	15,7
	Epitelial	33	21,6
	Misto	5	3,3
	Necrose	3	2,0
	Não informado	12	7,8
Metástase ao Diagnóstico			
	Sim	50	32,7
	Não	92	60,1
	Não informado	11	7,2

C) Características dos Tratamentos			
Quimioterapia Pré-Nefrectomia (a)			
	Sim	43	28,1
	Não	101	66,0
	Não informado	9	5,9
Radioterapia (b)			
	Sim	841	54,9
	Não	8	39,9
	Não informado		5,2
Protocolo			
	COG	129	84,3
	SIOP	9	5,9
	Misto	7	4,6
	Não informado	8	5,2
Regime			
	COG (EE-4A)	55	35,9
	COG (DD-4A)	74	48,4
	SIOP (Stage III)	5	3,3
	SIOP (Stage IV)	4	2,6
	Misto	7	4,6
	Não informado	8	5,2
Desvio de Tratamento*			
	Sim	7	4,6
	Não	136	88,9
	Não informado	10	6,5
Duração do 1º Esquema de Quimioterapia (c)			
	Média	164	-
Resposta			
	Respondeu	124	81,0
	Recaiu	19	12,4
	Progrediu	5	3,3
	Não informado	5	3,3
Óbito			
	Sim	14	9,1
	Não	136	88,9
	Não informado	3	2,0

(a) A quimioterapia aqui se refere inclusive ao protocolo COG, que dependendo do estadiamento, utiliza esquema quimioterápico antes da nefrectomia.

(b) A radioterapia aqui se refere a qualquer parte do corpo, não apenas na região pélvica.

(c) Os esquemas quimioterápicos apresentam durações diferentes, esse valor é a média dos valores apresentados, ou seja, há pacientes que foram tratados em menor tempo e há pacientes que foram tratados por maior tempo. Considerando COG (EE-4A) – 19 semanas e COG (DD-4A) – 25 semanas.

* Os motivos dos desvios de tratamento, ou seja, da alteração ou troca de esquema quimioterápico, foram:

Paciente 45 - Iniciou tratamento com o protocolo DD-4A (de 25/06/2014 a 05/01/2015). Após diagnóstico de metástase durante o tratamento para o pulmão, trocou para o protocolo ICE em 09/02/2015 e foi a óbito em 20/02/2015.

Paciente 74 - Iniciou o tratamento com o protocolo DD-4A (de 19/08/2011 a 16/09/2011). Depois foi para o protocolo ICE (de 26/09/2011 a 04/03/2012). Devido à progressão tumoral, realizou o protocolo NWTS-4 por 44 semanas (quimioterapia paliativa) - Protocolo I, NWTS-IV (de 13/08/2012 a 03/05/2013) e foi a óbito em 26/09/2013.

Paciente 89 - Iniciou o tratamento com o protocolo DD-4A por 15 semanas. Devido à progressão tumoral, realizou o protocolo ICE (de 22/11/2010 a 29/03/2011) e foi a óbito em 08/07/2011.

Paciente 103 - Iniciou o tratamento com o protocolo DD-4A (de 15/05/2009 a 29/07/2009). Devido à não resposta, foi trocado o protocolo para o Regimen I - NWTS-V (de 31/08/2009 a 26/11/2009).

Paciente 120 - Iniciou o tratamento com o protocolo DD-4A em 26/05/2008, completando duas semanas e depois passou para Regimen I, que parou em 04/10/2008, e foi a óbito em 30/10/2008.

Paciente 128 - Iniciou o tratamento com o protocolo DD-4A (de 13/07/07 a 12/09/2007). Depois passou para Regimen I - NWTS-V (de 24/09/2007 a 13/11/2007) e foi a óbito em 05/12/2007.

Paciente 130 - Iniciou o tratamento com o protocolo DD-4A (de 12/07/2007 a 08/01/2008). Depois fez ICE (de 26/02/2008 a 10/06/2008 - sofreu choque séptico), em seguida realizou o Protocolo J - NWTS-IV (de 10/07/2008 a 16/02/2009).

Devido às diferenças de abordagens, é necessário analisar os pacientes tratados conforme os protocolos do COG e da SIOP separadamente. Assim, a análise dos pacientes com TW de histologia favorável tratados com protocolo COG, resultou na associação significativa entre a variável “**Resposta**” ao tratamento com as variáveis “**Radioterapia**” ($p=0,023$), “**Tratamento**” ($p=0,024$) e “**Óbito**” ($p<0,0001$) (**Tabela 5A**). Ao comparar a variável “**Óbito**” não foi observada nenhuma associação significativa entre as variáveis (**Tabela 5B**). As variáveis com valores estatisticamente significativos estão sinalizadas com asterisco (*).

Tabela 5 - Associação das características qualitativas dos casos com histologia favorável e esporádicos tratados com COG.

A) Características clínicas e patológicas de pacientes tratados conforme protocolo do COG em comparação com a “resposta ao tratamento” (exceto tratamentos desconhecidos, mistos e SIOP)

		RESPOSTA			
		Respondeu	Recaiu	Progridiu	Total
Classificação Histológica ⁽¹⁾	Unifásico	2 (1,7%)	0 (0,0%)	-	2 (1,7%)
	Bifásico	10 (8,5%)	1 (0,8%)	-	11 (9,3%)
	Trifásico	94 (79,7%)	10 (8,5%)	-	104 (88,2%)
	Necrótico	1 (0,8%)	0 (0,0%)	-	1 (0,8%)
	Total	107 (90,7%)	11 (9,3%)	-	118 (100,0%)
Predomínio Histológico ⁽²⁾	Blastematoso	63 (50,8%)	7 (5,7%)	-	70 (56,5%)
	Estromal	20 (16,1%)	3 (2,4%)	-	23 (18,5%)
	Epitelial	26 (21,0%)	1 (0,8%)	-	27 (21,8%)
	Misto	2 (1,6%)	0 (0,0%)	-	2 (1,6%)
	Necrose	2 (1,6%)	0 (0,0%)	-	2 (1,6%)
	Total	113(91,1%)	11 (8,9%)	-	124 (100,0%)
Estadiamento Patológico ⁽³⁾	I	24 (19,8%)	3 (2,5%)	-	27 22,3%)
	II	53 (43,8%)	4 (3,3%)	-	57 (47,1%)
	III	29 (24,0%)	4 (3,3%)	-	33 (27,3%)
	IV	4 (3,3%)	0 (0,0%)	-	4 (3,3%)
	Total	110 (90,9%)	11 (9,1%)	-	121 (100,0%)
Metástase ao Diagnóstico* ⁽⁴⁾	Sim	33 (26,4%)	5 (4,0%)	-	38 (30,4%)
	Não	81 (64,8%)	6 (4,8%)	-	87 (69,6%)
	Total	114 (91,2%)	11 (8,8%)	-	125 (100,0%)
Quimioterapia Pré-Nefrectomia ⁽⁵⁾	Sim	36 (28,8%)	3 (2,4%)	-	39 (31,2%)
	Não	79 (63,2%)	7 (5,6%)	-	86 (68,8%)
	Total	115 (92,0%)	10 (8,0%)	-	125 (100,0%)
Radioterapia* ⁽⁶⁾	Sim	62 (48,8%)	10 (7,9%)	-	72 (56,7%)

	Não	54 (42,5%)	1 (0,8%)	-	55 (43,3%)
	Total	116 (91,3%)	11 (8,7%)	-	127 (100,0%)
Tratamento* (7)	EE-4A	53 (41,4%)	1 (0,8%)	-	54 (42,2%)
	DD-4A	64 (50,0%)	10 (7,8%)	-	74 (57,8%)
	Total	117 (91,4%)	11 (8,6%)	-	128 (100,0%)
Óbito* (8)	Sim	0 (0,0%)	4 (3,1%)	-	4 (3,1%)
	Não	117 (91,4%)	7 (5,5%)	-	124 (96,9%)
	Total	117 (91,4%)	11 (8,6%)	-	128 (100,0%)

Observação: variável “desvio” foi uma constante, pois todos os pacientes analisados nessa categoria foram “sem desvio”. * indica $p \leq 0,05$.

(1) $X^2_{(3)} = 0,320$; $p = 1,000$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: a resposta não depende da classificação histológica ($p > 0,05$), e rejeitamos a H1: a resposta depende da classificação histológica ($p \leq 0,05$).

(2) $X^2_{(4)} = 1,887$; $p = 0,664$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: a resposta não depende do predomínio histológico ($p > 0,05$), e rejeitamos a H1: a resposta depende do predomínio histológico ($p \leq 0,05$).

(3) $X^2_{(3)} = 1,196$; $p = 0,764$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: a resposta não depende do estadiamento patológico ($p > 0,05$), e rejeitamos a H1: a resposta depende do estadiamento patológico ($p \leq 0,05$).

(4) $X^2_{(1)} = 1,292$; $p = 0,307$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: a resposta não depende da metástase ao diagnóstico ($p > 0,05$), e rejeitamos a H1: a resposta depende da metástase ao diagnóstico ($p \leq 0,05$).

(5) $X^2_{(1)} = 0,007$; $p = 1,000$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: a resposta não depende da quimioterapia pré-nefrectomia ($p > 0,05$), e rejeitamos a H1: a resposta depende da quimioterapia pré-nefrectomia ($p \leq 0,05$).

(6) $X^2_{(1)} = 5,743$; $p = 0,023$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, rejeitamos a H0: a resposta não depende da radioterapia ($p > 0,05$), e aceitamos a H1: a resposta depende da radioterapia ($p \leq 0,05$).

(7) $X^2_{(1)} = 5,405$; $p = 0,024$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, rejeitamos a H0: a resposta não depende do tratamento ($p > 0,05$), e aceitamos a H1: a resposta depende do tratamento ($p \leq 0,05$).

(8) $X^2_{(1)} = 43,918$; $p < 0,0001$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, rejeitamos a H0: a resposta não depende do óbito ($p > 0,05$), e aceitamos a H1: a resposta depende do óbito ($p \leq 0,05$).

B) Características clínicas e patológicas de pacientes tratados conforme protocolo do COG em comparação com o “óbito” (exceto tratamentos desconhecidos, mistos e SIOF)

		ÓBITO		
		Não	Sim	Total
Classificação Histológica ⁽¹⁾	Unifásico	2 (1,7%)	0 (0,0%)	2 (1,7%)
	Bifásico	11 (9,3%)	0 (0,0%)	11 (9,3%)
	Trifásico	100 (84,8%)	4 (3,4%)	104 (88,2%)
	Necrótico	1 (0,8%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)
	Total	114 (96,6%)	4 (3,4%)	118 (100,0%)
Predomínio Histológico ⁽²⁾	Blastematoso	68 (54,9%)	2 (1,6%)	70 (56,5%)
	Estromal	22 (17,7%)	1 (0,8%)	23 (18,5%)
	Epitelial	26 (21,0%)	1 (0,8%)	27 (21,8%)
	Misto	2 (1,6%)	0 (0,0%)	2 (1,6%)
	Necrose	2 (1,6%)	0 (0,0%)	2 (1,6%)
	Total	120 (96,8%)	4 (3,2%)	124 (100,0%)
Estadiamento Patológico ⁽³⁾	I	26 (21,5%)	1 (0,8%)	27 (22,3%)
	II	56 (46,3%)	1(0,8%)	57 (47,1%)
	III	31 (25,6%)	2(1,7%)	33 (27,3%)
	IV	4 (3,3%)	0 (0,0%)	4 (3,3%)
	Total	117 (96,7%)	4 (3,3%)	121 (100,0%)
Metástase ao Diagnóstico ⁽⁴⁾	Sim	36 (28,8%)	2 (1,6%)	38 (30,4%)
	Não	85 (68,0%)	2 (1,6%)	87 (69,6%)
	Total	121 (96,8%)	4 (3,2%)	125 (100,0%)
Quimioterapia Pré-Nefrectomia ⁽⁵⁾	Sim	37 (29,6%)	2 (1,6%)	39 (31,2%)
	Não	84 (67,2%)	2 (1,6%)	86 (68,8%)
	Total	121 (96,8%)	4 (3,2%)	125 (100,0%)
Radioterapia ⁽⁶⁾	Sim	68 (53,6%)	4 (3,1%)	72 (56,7%)
	Não	55 (43,3%)	0 (0,0%)	55 (43,3%)

	Total	123 (96,9%)	4 (3,1%)	127 (100,0%)
Tratamento ⁽⁷⁾	EE-4A	54 (42,2%)	0 (0,0%)	54 (42,2%)
	DD-4A	70 (54,7%)	4 (3,1%)	74 (57,8%)
	Total	124 (96,9%)	4 (3,1%)	128 (100,0%)

Observação: variável “desvio” foi uma constante, pois todos os pacientes analisados nessa categoria foram “sem desvio”.

(1) $X^2_{(3)}=0,557$; $p=1,000$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: o óbito não depende da classificação histológica ($p>0,05$), e rejeitamos a H1: o óbito depende da classificação histológica ($p\leq 0,05$).

(2) $X^2_{(4)}=0,276$; $p=1,000$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: o óbito não depende do predomínio histológico ($p>0,05$), e rejeitamos a H1: o óbito depende do predomínio histológico ($p\leq 0,05$).

(3) $X^2_{(3)}=1,363$; $p=0,620$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: o óbito não depende do estadiamento patológico ($p>0,05$), e rejeitamos a H1: o óbito depende do estadiamento patológico ($p\leq 0,05$).

(4) $X^2_{(1)}=0,750$; $p=0,584$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: o óbito não depende da metástase ao diagnóstico ($p>0,05$), e rejeitamos a H1: o óbito depende da metástase ao diagnóstico ($p\leq 0,05$).

(5) $X^2_{(1)}=0,680$; $p=0,588$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: o óbito não depende da quimioterapia pré-nefrectomia ($p>0,05$), e rejeitamos a H1: o óbito depende da quimioterapia pré-nefrectomia ($p\leq 0,05$).

(6) $X^2_{(1)}=3,155$; $p=1,333$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: o óbito não depende da radioterapia ($p>0,05$), e rejeitamos a H1: o óbito depende da radioterapia ($p\leq 0,05$).

(7) $X^2_{(1)}=3,013$; $p=0,138$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H0: o óbito não depende do tratamento ($p>0,05$), e rejeitamos a H1: o óbito depende do tratamento ($p\leq 0,05$).

Resumindo, com relação aos pacientes tratados pelo COG, no que diz respeito à variável “**Resposta**” ao tratamento, o teste exato de Fisher mostrou que não há associação, ou não há dependência entre a variável “**Resposta**” e as seguintes variáveis: “**Metástase ao Diagnóstico**” ($X^2_{(1)}=1,292$; $p=0,307$), “**Classificação Histológica**” ($X^2_{(3)}=0,320$; $p=1,000$), “**Predomínio Histológico**” ($X^2_{(4)}=1,887$; $p=0,664$), “**Estadiamento Patológico**” ($X^2_{(3)}=1,196$; $p=0,764$) e “**Quimioterapia Pré-Nefrectomia**” ($X^2_{(1)}=0,007$; $p=1,000$). O teste exato de Fisher também mostrou que há associação entre a variável “**Resposta**” e as seguintes variáveis: “**Radioterapia**” ($X^2_{(1)}=5,743$; $p=0,023$) e “**Tratamento**” ($X^2_{(1)}=5,405$; $p=0,024$).

Com relação aos pacientes tratados pelo COG, no que diz respeito à variável “**Óbito**”, o teste exato de Fisher mostrou que não há associação, ou não há dependência entre a variável “**Óbito**” e as seguintes variáveis: “**Classificação Histológica**” ($X^2_{(3)}=0,557$; $p=1,000$), “**Predomínio Histológico**” ($X^2_{(4)}=0,276$; $p=1,000$), “**Estadiamento Patológico**” ($X^2_{(3)}=1,363$; $p=0,620$), “**Metástase ao Diagnóstico**” ($X^2_{(1)}=0,750$; $p=0,584$), “**Quimioterapia Pré-Nefrectomia**” ($X^2_{(1)}=0,680$; $p=0,588$), “**Radioterapia**” ($X^2_{(1)}=3,155$; $p=1,333$) e

“**Tratamento**” ($X^2_{(1)}= 3,013$; $p= 0,138$).

Já para os pacientes com TW de histologia favorável tratados com protocolo SIOP, observou-se associação significativa entre a variável “**Resposta**” ao tratamento com a variável “**Estadiamento Patológico**” ($p=0,048$) (**Tabela 6A**). Ao comparar a variável “**Óbito**” não foi observada nenhuma associação significativa entre as variáveis (**Tabela 6B**). As variáveis com valores estatisticamente significativos estão sinalizadas com asterisco (*).

Tabela 6 - Associação das características qualitativas dos casos com histologia favorável e esporádicos tratados com SIOP.

A) Características clínicas e patológicas de pacientes tratados conforme protocolo da SIOP em comparação com a “resposta ao tratamento” (exceto tratamentos desconhecidos, mistos e COG)

		RESPOSTA			
		Respondeu	Recaiu	Progrediu	Total
Classificação Histológica ⁽¹⁾	Unifásico	-	-	-	-
	Bifásico	1 (14,2%)	0 (0,0%)	-	1 (14,2%)
	Trifásico	2 (28,6%)	2 (28,6%)	-	4 (57,2%)
	Necrótico	2 (28,6%)	0 (0,0%)	-	2 (28,6%)
	Total	5 (71,4%)	2 (28,6%)	-	7 (100,0%)
Predomínio Histológico ⁽²⁾	Blastematoso	1 (14,3%)	1 (14,3%)	-	2 (28,6%)
	Estromal	1 (14,3%)	0 (0,0%)	-	1 (14,3%)
	Epitelial	2 (28,6%)	0 (0,0%)	-	2 (28,6%)
	Misto	0 (0,0%)	1 (14,3%)	-	1 (14,3%)
	Necrose	1 (14,3%)	0 (0,0%)	-	1 (14,3%)
	Total	5 (71,4%)	2 (28,6%)	-	7 (100,0%)
Estadiamento Patológico* ⁽³⁾	I	-	-	-	-
	II	0 (0,0%)	1 (14,3%)	-	1 (14,3%)
	III	5 (71,4%)	0 (0,0%)	-	5 (71,4%)
	IV	0 (0,0%)	1 (14,3%)	-	1 (14,3%)
	Total	5 (71,4%)	2 (28,6%)	-	7 (100,0%)
Metástase ao Diagnóstico ⁽⁴⁾	Sim	3 (42,8%)	2 (28,6%)	-	5 (71,4%)
	Não	2 (28,6%)	0 (0,0%)	-	2 (28,6%)
	Total	5 (71,4%)	2 (28,6%)	-	7 (100,0%)
Radioterapia ⁽⁵⁾	Sim	5 (71,4%)	1 (14,3%)	-	6 (85,7%)
	Não	0 (0,0%)	1 (14,3%)	-	1 (14,3%)
	Total	5 (71,4%)	2 (28,6%)	-	7 (100%)
Tratamento ⁽⁶⁾	Stage III	3 (37,5%)	2 (25,0%)	-	5 (62,5%)

	Stage IV	2 (25,0%)	1 (12,5%)	-	3 (37,5%)
	Total	5 (62,5%)	3 (37,5%)	-	8 (100,0%)
Óbito ⁽⁷⁾	Sim	5 (71,4%)	1 (14,3%)	-	6 (85,7%)
	Não	0 (0,0%)	1 (14,3%)	-	1 (14,3%)
	Total	5 (71,4%)	2 (28,6%)	-	7 (100,0%)

Observação: não foram analisadas as variáveis “desvio” e “quimioterapia pré-nefrectomia” porque não houve desvio do tratamento e o protocolo estabelece a quimioterapia pré-nefrectomia como parte essencial para crianças maiores do que 6 meses. * indica $p \leq 0,05$.

(1) $X^2_{(2)} = 2,100$; $p = 0,619$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : a resposta não depende da classificação histológica ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : a resposta depende da classificação histológica ($p \leq 0,05$).

(2) $X^2_{(4)} = 4,550$; $p = 0,810$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : a resposta não depende do predomínio histológico ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : a resposta depende do predomínio histológico ($p \leq 0,05$).

(3) $X^2_{(2)} = 7,000$; $p = 0,048$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, rejeitamos a H_0 : a resposta não depende do estadiamento patológico ($p > 0,05$), e aceitamos a H_1 : a resposta depende do estadiamento patológico ($p \leq 0,05$).

(4) $X^2_{(1)} = 1,120$; $p = 1,000$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : a resposta não depende da metástase ao diagnóstico ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : a resposta depende da metástase ao diagnóstico ($p \leq 0,05$).

(5) $X^2_{(1)} = 2,917$; $p = 0,286$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : a resposta não depende da radioterapia ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : a resposta depende da radioterapia ($p \leq 0,05$).

(6) $X^2_{(1)} = 0,036$; $p = 1,000$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : a resposta não depende do tratamento ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : a resposta depende do tratamento ($p \leq 0,05$).

(7) $X^2_{(1)} = 2,917$; $p = 0,286$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : a resposta não depende do óbito ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : a resposta depende do óbito ($p \leq 0,05$).

B) Características clínicas e patológicas de pacientes tratados conforme protocolo da SIOP em comparação com o “óbito” (exceto tratamentos desconhecidos, mistos e COG)

		ÓBITO		
		Não	Sim	Total
Classificação Histológica ⁽¹⁾	Unifásico	-	-	-
	Bifásico	1 (14,3%)	0 (0,0%)	1 (14,3%)
	Trifásico	3 (42,8%)	1 (14,3%)	4 (57,1%)
	Necrótico	2 (28,6%)	0 (0,0%)	2 (28,6%)
	Total	6 (85,7%)	1 (14,3%)	7 (100,0%)
Predomínio Histológico ⁽²⁾	Blastematoso	2 (28,6%)	0 (0,0%)	2 (28,6%)
	Estromal	1 (14,3%)	0 (0,0%)	1 (14,3%)
	Epitelial	2 (28,6%)	0 (0,0%)	2 (28,6%)
	Misto	0 (0,0%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)
	Necrose	1 (14,3%)	0 (0,0%)	1 (14,3%)
	Total	6 (85,7%)	1 (14,3%)	7 (100,0%)
Estadiamento Patológico ⁽³⁾	I	-	-	-
	II	1 (14,3%)	0 (0,0%)	1 (14,3%)
	III	5 (71,4%)	0 (0,0%)	5 (71,4%)
	IV	0 (0,0%)	1 (14,3%)	1 (14,3%)
	Total	6 (85,7%)	1 (14,3%)	7 (100,0%)
Metástase ao Diagnóstico ⁽⁴⁾	Sim	4 (57,1%)	1 (14,3%)	5 (71,4%)
	Não	2 (28,6%)	0 (0,0%)	2 (28,6%)
	Total	6 (85,7%)	1 (14,3%)	7 (100,0%)
Radioterapia ⁽⁵⁾	Sim	5 (71,4%)	1 (14,3%)	6 (85,7%)
	Não	1 (14,3%)	0 (0,0%)	1 (14,3%)
	Total	6 (85,7%)	1 (14,3%)	7 (100,0%)
Tratamento ⁽⁶⁾	Stage III	4 (57,1%)	0 (0,0%)	4 (57,1%)
	Stage IV	2 (28,6%)	1 (14,3%)	3 (42,9%)

Total	6 (85,7%)	1 (14,3%)	7 (100,0%)
--------------	-----------	-----------	------------

Observação: variável “desvio” foi uma constante, pois todos os pacientes analisados nessa categoria foram “sem desvio”; variável “quimioterapia pré-nefrectomia”, pois todos os pacientes analisados nessa categoria foram “sem quimioterapia pré-nefrectomia”. * indica $p \leq 0,05$.

(1) $X^2_{(2)} = 0,875$; $p = 1,000$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : o óbito não depende da classificação histológica ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : o óbito depende da classificação histológica ($p \leq 0,05$).

(2) $X^2_{(4)} = 7,000$; $p = 0,429$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : o óbito não depende do predomínio histológico ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : o óbito depende do predomínio histológico ($p \leq 0,05$).

(3) $X^2_{(2)} = 7,000$; $p = 0,286$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : o óbito não depende do estadiamento patológico ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : o óbito depende do estadiamento patológico ($p \leq 0,05$).

(4) $X^2_{(1)} = 0,467$; $p = 1,000$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : o óbito não depende da metástase ao diagnóstico ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : o óbito depende da metástase ao diagnóstico ($p \leq 0,05$).

(5) $X^2_{(1)} = 0,194$; $p = 1,000$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : o óbito não depende da radioterapia ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : o óbito depende da radioterapia ($p \leq 0,05$).

(6) $X^2_{(1)} = 1,556$; $p = 0,429$ (Teste Exato de Fisher). Ou seja, aceitamos a H_0 : o óbito não depende do tratamento ($p > 0,05$), e rejeitamos a H_1 : o óbito depende do tratamento ($p \leq 0,05$).

Resumindo, com relação aos pacientes tratados pela SIOP, no que diz respeito à variável “**Resposta**” ao tratamento, o teste exato de Fisher mostrou que não há associação, ou não há dependência entre a variável “**Resposta**” e as seguintes variáveis: “**Classificação Histológica**” ($X^2_{(2)} = 2,100$; $p = 0,619$), “**Predomínio Histológico**” ($X^2_{(4)} = 4,550$; $p = 0,810$), “**Metástase ao Diagnóstico**” ($X^2_{(1)} = 1,120$; $p = 1,000$), “**Radioterapia**” ($X^2_{(1)} = 2,917$; $p = 0,286$), “**Tratamento**” ($X^2_{(1)} = 0,036$; $p = 1,000$) e “**Óbito**” ($X^2_{(1)} = 2,917$; $p = 0,286$). O teste exato de Fisher também mostrou que há associação entre a variável “**Resposta**” e a variável “**Estadiamento Patológico**” ($X^2_{(2)} = 7,000$; $p = 0,048$).

Com relação aos pacientes tratados pela SIOP, no que diz respeito à variável “**Óbito**”, o teste exato de Fisher mostrou que não há associação, ou não há dependência entre a variável “**Óbito**” e as seguintes variáveis: “**Classificação Histológica**” ($X^2_{(2)} = 0,875$; $p = 1,000$), “**Predomínio Histológico**” ($X^2_{(4)} = 7,000$; $p = 0,429$), “**Estadiamento Patológico**” ($X^2_{(2)} = 7,000$; $p = 0,286$), “**Metástase ao Diagnóstico**” ($X^2_{(1)} = 0,467$; $p = 1,000$), “**Radioterapia**” ($X^2_{(1)} = 0,194$; $p = 1,000$) e “**Tratamento**” ($X^2_{(1)} = 1,556$; $p = 0,429$).

4.1.2 Pacientes diagnosticados com doença bilateral

Os pacientes diagnosticados com TW bilateral, considerados de estadio IV, totalizaram 25 de 186 (13,4% dos casos). Na **Tabela 7** estão listadas as características desses pacientes, resumidamente: IMC adequado (60%), estadiamento patológico I (36%), classificação histológica trifásica (48%), predomínio histológico blastematoso (44%), metástase ao diagnóstico ausente (68%), quimioterapia pré-nefrectomia (68%), protocolo COG (76%), regime COG DD-4A (76%), melhor resposta ao tratamento (76%) e óbito ausente (88%).

Ao nascimento, os bebês pesaram 3.161 g (1.020 a 4.000 g) em média. Ao diagnóstico, as médias foram de 33 meses de idade (8 a 81 meses), 15,104 kg (6,600 a 34,000 kg), 95 cm de altura (70 a 128 cm). Já o produto da nefrectomia pesou 311 g (120 a 800 g) em média.

Tabela 7 - Características qualitativas dos casos bilaterais.

A - Características dos Pacientes			
		N	%
Quantidade		25	100
Sexo			
	Feminino	10	40
	Masculino	15	60
Cor (autodeclarada)			
	Branco	13	52
	Pardo	10	40
	Negro	1	4
	Amarelo	1	4
Peso ao Nascimento (g)			
	Média	3.161	-
Idade ao Diagnóstico (meses)			
	Média	33,28	-
Peso ao Diagnóstico (g)			
	Média	15.104	-
Altura ao Diagnóstico (cm)			
	Média	94,88	-
Índice de Massa Corporal (IMC)			
	Baixo IMC para idade (< Percentil 3)	2	8
	IMC adequado ou Eutrófico (\geq Percentil 3 e < Percentil 85)	15	60
	Sobrepeso (\geq Percentil 85 e < Percentil 97)	6	24
	Obesidade (\geq Percentil 97)	1	4
	Não informado	1	4

B) Características dos Tumores			
Estadiamento Patológico			
	I	9	36
	II	5	20
	III	4	16
	IV	1	4
	Não informado	6	24
Peso da Peça Tumoral Total (g)			
	Média	311,15	-
Classificação Histológica			
	Unifásico	1	4
	Bifásico	4	16
	Trifásico	12	48
	Necrótico	1	4
	Não informado	7	28
Predomínio Histológico			
	Blastematoso	11	44
	Estromal	4	16
	Epitelial	3	12
	Necrose	1	4
	Não informado	6	24
Metástase ao Diagnóstico			
	Sim	3	12
	Não	17	68
	Não informado	5	20

C) Características dos Tratamentos			
Quimioterapia Pré-Nefrectomia			
	Sim	17	68
	Não	6	24
	Não informado	2	8
Radioterapia			
	Sim	8	32
	Não	15	60
	Não informado	2	8
Protocolo			
	COG	19	76
	SIOP	1	4
	Misto	2	8
	Não informado	3	12
Regime			
	COG (EE-4A)	1	4
	COG (DD-4A)	18	72
	SIOP (Stage III)	1	4
	SIOP (Stage IV)	0	0
	Misto	2	8
	Não informado	3	12
Desvio de Tratamento*			
	Sim	2	8
	Não	21	84
	Não informado	2	8
Duração do 1º Esquema de Quimioterapia (dias)			
	Média	175	
Resposta			
	Respondeu	19	76
	Recaiu	2	8
	Progrediu	1	4
	Não informado	3	12
Óbito			
	Sim	3	12
	Não	22	88

*Paciente 87 - Iniciou o tratamento com o protocolo DD-4A (de 16/08/2010 a 17/11/2011). Depois, devido à progressão tumoral, mudou para o protocolo ICE (de 26/11/2010 a 16/01/2011 - 3 ciclos).

Paciente 92 - Iniciou o tratamento com o protocolo EE-4A (até a 5ª semana). Depois prosseguiu com tratamento DD-4A (da 6ª semana a 24ª semana). Devido à recidiva renal à direita, foi realizado protocolo ICE (5 ciclos).

4.1.3 Pacientes diagnosticados com tumores de histologia desfavorável

Os pacientes diagnosticados com TW com anaplasia totalizaram 8 de 186 (4,3% dos casos), ou seja, são pacientes com TW com histologia desfavorável.

Na **Tabela 8** estão listadas as características desses pacientes, que apresentaram predomínio das seguintes características: IMC adequado (50%), estadiamento clínico III (62,5%), estadiamento patológico III (62,5%), classificação histológica trifásica (75%), predomínio histológico blastematoso (87,5%), protocolo COG (75%) e regime COG DD-4A (50%).

Ao nascimento, os bebês pesaram 3.084 g (2.385 a 3.590 g) em média. Ao diagnóstico, as médias foram de 59 meses de idade (17 a 128 meses), 17,450 kg (12,400 a 31,300 kg), 107 cm de altura (81 a 153 cm). Já o produto da nefrectomia pesou 561 g (178 a 1.850 g) em média.

Tabela 8 - Características qualitativas dos casos com histologia desfavorável (anaplasia).

A - Características dos Pacientes			
		N	%
Quantidade		8	100
Sexo			
	Feminino	4	50
	Masculino	4	50
Cor (autodeclarada)			
	Branco	5	62,5
	Pardo	3	37,5
	Negro	0	
	Amarelo	0	
	Não informado	0	
Peso ao Nascimento (g)			
	Média	3.084	-
Idade ao Diagnóstico (meses)			
	Média	59	-
Peso ao Diagnóstico (g)			
	Média	17.450	-
Altura ao Diagnóstico (cm)			
	Média	107	-
Índice de Massa Corporal (IMC)			
	Baixo IMC para idade (< Percentil 3)	3	37,5
	IMC adequado ou Eutrófico (\geq Percentil 3 e < Percentil 85)	4	50
	Sobrepeso (\geq Percentil 85 e < Percentil 97)	0	
	Obesidade (\geq Percentil 97)	1	12,5
	Não informado	0	
Estadiamento Clínico			
	I	1	12,5
	II	0	
	III	5	62,5
	IV	2	25,0

B) Características dos Tumores		
Estadiamento Patológico		
	I	12,5
	II	12,5
	III	62,5
	IV	0
	Não informado	12,5
Peso da Peça Tumoral Total (g)		
	Média	561
		-
Lateralidade		
	Direito	50
	Esquerdo	50
Classificação Histológica		
	Unifásico	0
	Bifásico	12,5
	Trifásico	75,0
	Necrótico	0
	Não informado	12,5
Predomínio Histológico		
	Blastematoso	87,5
	Estromal	
	Epitelial	12,5
	Misto	
	Necrose	
	Não informado	
Metástase ao Diagnóstico		
	Sim	50
	Não	50

C) Características dos Tratamentos			
Quimioterapia Pré-Nefrectomia	Sim	2	25
	Não	6	75
Radioterapia	Sim	7	87,5
	Não	1	12,5
Protocolo	COG	6	75
	SIOP	0	
	Misto	2	25
Regime	COG (EE-4A)	1	12,5
	COG (DD-4A)	4	50,0
	Regimen I	1	12,5
	Misto	2	25,0
Desvio de Tratamento*	Sim	2	25
	Não	6	75
Duração do 1º Esquema de Quimioterapia	Média	147	
Resposta	Respondeu	5	62,5
	Recaiu	2	25,0
	Progridiu	1	12,5
Óbito	Sim	1	12,5
	Não	7	87,5

*Paciente 54 - Iniciou o tratamento com EE-4A (por 18 semanas) e mudou para DD-4A (por 24 semanas) e Paciente 179 - Iniciou o tratamento com DD-4A (por 7 semanas) e mudou para Regimen I (por 5 a 24 semanas).

4.3 Extração e avaliação do DNA

De todos os casos citados acima, 47 tiveram amostras adequadamente armazenadas no Biobanco do Centro Infantil Boldrini, que foram utilizadas para prosseguir com os experimentos para a validação dos biomarcadores.

O DNA foi extraído utilizando o kit comercial Kit GenELUTE Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich by Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), seguindo o protocolo fornecido pela empresa.

As quantificações das amostras foram realizadas por fluorometria (Qubit 2.0) e por espectrofotometria (Biodrop). A recuperação de DNA variou de 25,6 a 860,0 ng/uL em 100 uL, conforme mostra a **Tabela 9** (Anexos). A avaliação da integridade foi feita por meio da corrida de gel de agarose a 0,8% para todas as amostras conforme a imagem representativa na **Figura 4**.

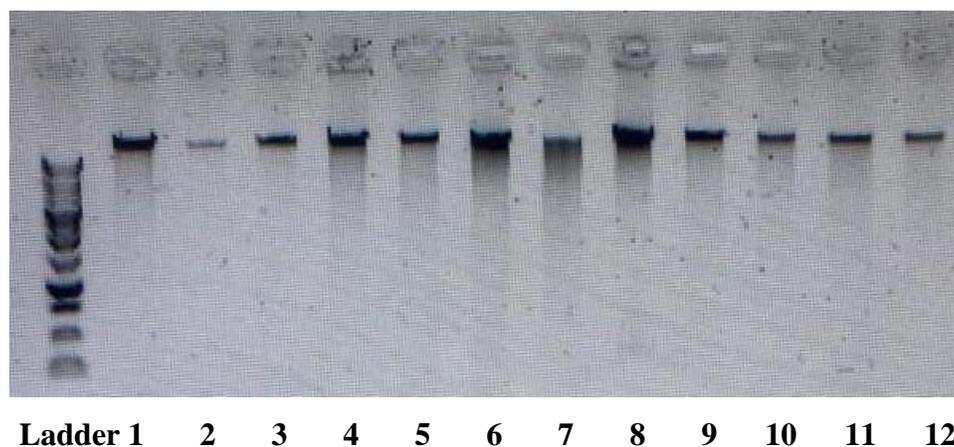


Figura 4 - Gel de agarose 0,8% de 12 amostras de DNA. O marcador é o ladder de 1 Kb plus (Invitrogen™). Na imagem, é possível verificar o ladder na posição do primeiro pocinho do gel e nos demais pocinhos as 12 amostras da corrida.

As amostras apresentadas na **Figura 4**, que são representações de todas as outras amostras, indicam que o DNA estava íntegro e por isso foram utilizadas para os passos seguintes do estudo. Esse procedimento foi adotado para as demais amostras do estudo.

4.4 Avaliação do número de cópias dos potenciais biomarcadores

O número de cópias foi avaliado pela técnica de MLPA em 47 amostras, contudo, três amostras foram excluídas pelos critérios de qualidade conforme instruções do fabricante MRC Holland. Dessas 44, três casos eram bilaterais e um caso teve duas amostras analisadas. Logo, foram analisados 40 casos. A **Figura 5** apresenta uma representação gráfica da corrida de MLPA de uma amostra. Na seção dos **Anexos – Quadro 6**, estão presentes todos os painéis gerados pelo Coffalyzer dos 40 casos analisados, dos três rins normais e dos casos excluídos.

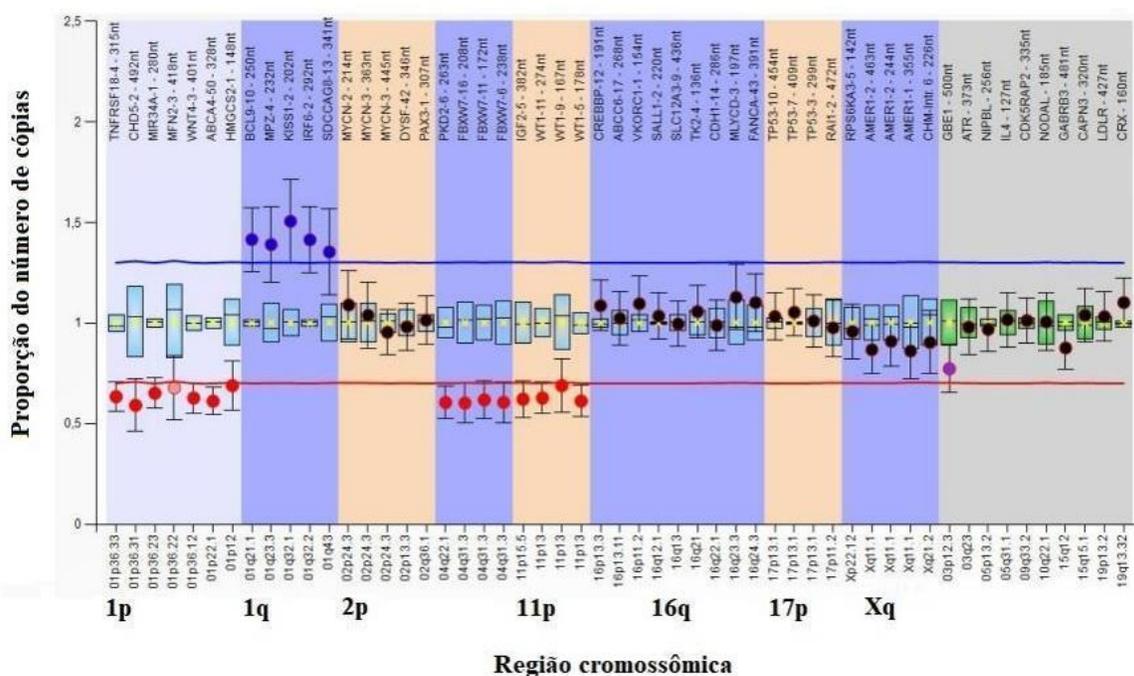


Figura 5 - Representação gráfica extraída do Coffalyzer.NET (MRC Holland) da amostra 517/18. Foram avaliadas as regiões cromossômicas 1p, 1q, 2p (*MYCN*), 11p (*WT1*), 16q, 17p (*TP53*) e Xq (*AMER1*), que identificou a perda em 1p, o ganho em 1q e a perda em 11p. Em verde, estão representadas sondas controles que são usadas para estimar o número de cópias dos alvos de interesse. No eixo X estão identificadas as regiões cromossômicas, neste caso, as de interesse são as indicadas na figura. No eixo Y é possível ver a proporção do número de cópias de cada região avaliada, sendo que 0,5 indica 1 cópia (perda), 1 indica 2 cópias (normal), 1,5 indica 3 cópias (ganho). Quanto às linhas vermelha e azul, indicam as fronteiras da normalidade da amostra. As sondas controle do experimento estão presentes na região cinza da imagem.

Para a técnica de MLPA foram utilizados três rins normais como controle (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Amostras de referência utilizadas na técnica de MLPA.

Amostras	Qubit (ng/ul)	Biodrop (A260/280)
121/21 2I	74	1.700
161/21 1C	105	1.844
230/21 0B	93	1.692

As amostras avaliadas estão representadas na **Tabela 11**, que também indica se houve alteração do número de cópias em *AMERI* (Xq), 1p, 1q, *MYCN* (2p), *WT1* (11p), 16q e *TP53* (17p). Das 40 amostras analisadas, 20 mostraram alterações. Conforme apresentado na **Tabela 11**, a frequência das alterações do número de cópias nos TWs unilaterais, tanto de histologia favorável quanto com anaplasia, foi: 4 perdas de *AMERI* (Xq), 1 ganho de *AMERI* (Xq), 6 perdas de 1p, 9 ganhos de 1q, 3 ganhos de *MYCN* (2p), 6 perdas de *WT1* (11p), 9 perdas de 16q, 3 perdas de *TP53* (17p) e 1 ganho de *TP53* (17p).

Tabela 11 - Alterações de número de cópias dos potenciais biomarcadores selecionados para TWs avaliados por MLPA em amostras selecionadas.

Paciente	Amostra	Xq	1p	1q	2p	11p	16q	17p
1	773/09 - MD/PR/O (Anaplasia)						P	P
2	242/19 - MD/R (Anaplasia)			G			P	
3	013/05 - R/O	P		G				
4	396/10 - MD/PR/O		P	G		P	P	P
5	540/09 - R/O		P	G				
6	517/18 - R		P	G		P		
7	045/19 - MD/MT/R	G		G				
8	348/20 T1* - MD/MT/R	P					P	
	348/20 T2* - MD/MT/R	P					P	

9	433/18 - MD	P			P	P		
10	583/17 - MT/R					P	P	
11	247/17 - MD				P			
12	154/11 - MD			G		P		
13	546/05 - MD			G				
14	218/05 - MD					P		
15	171/05 - MD							
16	488/09 A	P	G					
17	037/06					P		
18	119/18	P	G			P		
19	328/17				G			
20	427/06	P		G			G	
21	047/20 H - MT/R							
22	484/19 - MD							
23	512/19							
24	554/19 - MD							
25	064/20 H							
26	249/20							
27	082/19 - MD							
28	242/09							
29	105/09							
30	742/07							
31	434/07							
32	757/06							
33	694/09							
34	214/17							
35	279/14 - MD/MT/PR/O							
36	239/11							
37	322/17							
38	269/17 - MD							
39	422/18							
40	202/18							
Total		4P/1G	6P	9G	3G	6P	9P	3P/1G

Legenda: P = perda, G = ganho, MT = metástase durante o tratamento, MD = metástase ao diagnóstico, O = óbito, R = Recaída, PR = Progressão. **A amostra 348 teve duas regiões avaliadas do tumor: 348/20-T1 e 348/20-T2.**

Além das 40 amostras, 3 amostras de tumores bilaterais também foram analisadas, em que: 541/19 – paciente que respondeu ao tratamento e apresentou perda em *AMER1* (Xq), 831/09 – paciente com recaída apresentou ganho em *MYCN* (2p) e 208/18 – paciente com metástase durante o tratamento que apresentou ganho em 1p e perda em 16q.

Das 40 amostras de TWs esporádicos e histologia favorável analisadas por MLPA, 8 não atingiram os critérios de qualidade para o experimento (**Anexos – Quadro 6**), ou seja, apresentaram discordância entre as sondas que avaliaram a mesma região genômica, em que algumas estavam dentro do limiar e uma ou outra estava abaixo da linha vermelha ou acima da linha azul (essas linhas indicam as fronteiras da normalidade da amostra); além das sondas controle do experimento, que ficam na região cinza da imagem, também discordarem entre si (**Figura 6**).

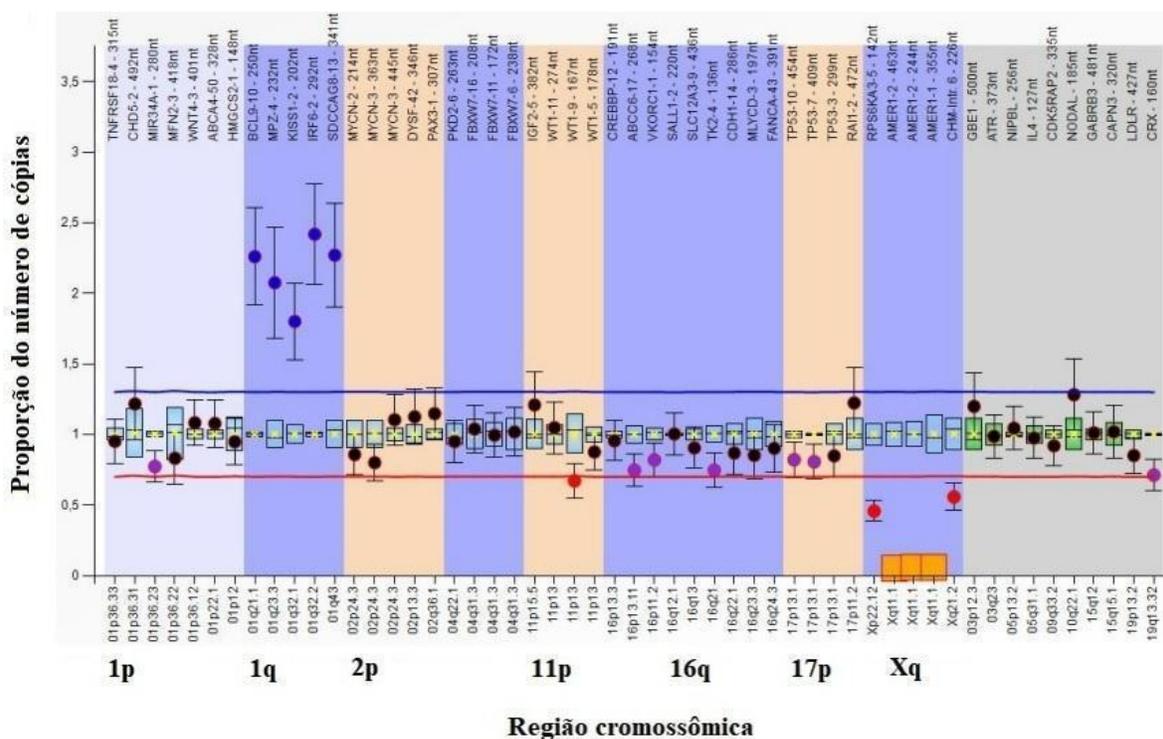


Figura 6 - Representação gráfica extraída do Coffalyzer.NET (MRC Holland) da amostra 013/05. Nesse caso, não é possível, por exemplo, inferir sobre a perda em 17p (*TP53*).

Então, para confirmar se houve alteração ou não no biomarcador estudo, essas 8 amostras foram analisadas por qPCR: 5 foram avaliadas em 1q, 2 em *MYCN* (2p), 1 em *WT1* (11p), 2 em *TP53* (17p) (**Tabela 12**). Apenas uma amostra reavaliada em 1q apresentou ganho, as demais não apresentaram alteração para os biomarcadores estudados.

Tabela 12 - Alterações de número de cópias dos potenciais biomarcadores selecionados para TWs avaliados por MLPA e qPCR em amostras selecionadas.

Amostra	Xq	1p	1q	2p	11p	16q	17p	Confirmação qPCR
013/05 - R/O	P		G					Sem alterações 17p
396/10 - MD/PR/O		P	G		P	P	P	Ganho 1q
171/05 - MD								Sem alterações 1q
488/09 A		P	G					Sem alterações 11p
037/06					P			Sem alterações 17p
047/20 H - MT/R								Sem alterações 1q e 2p
348/20 T1 - MD/MT/R	P					P		Sem alterações 1q
773/09 - MD/PR/O (Anaplasia)						P	P	Sem alterações 1q e 2p

Legenda: P = perda, G = ganho, MT = metástase durante o tratamento, MD = metástase ao diagnóstico, O = óbito, R = Recaída.

Abaixo está a representação gráfica (**Figura 7**), dos casos avaliados por meio da qPCR (além de MLPA), em que é possível detectar apenas alteração na amostra 396, que apresentou ganho em 1q. As demais amostras foram consideradas normais.

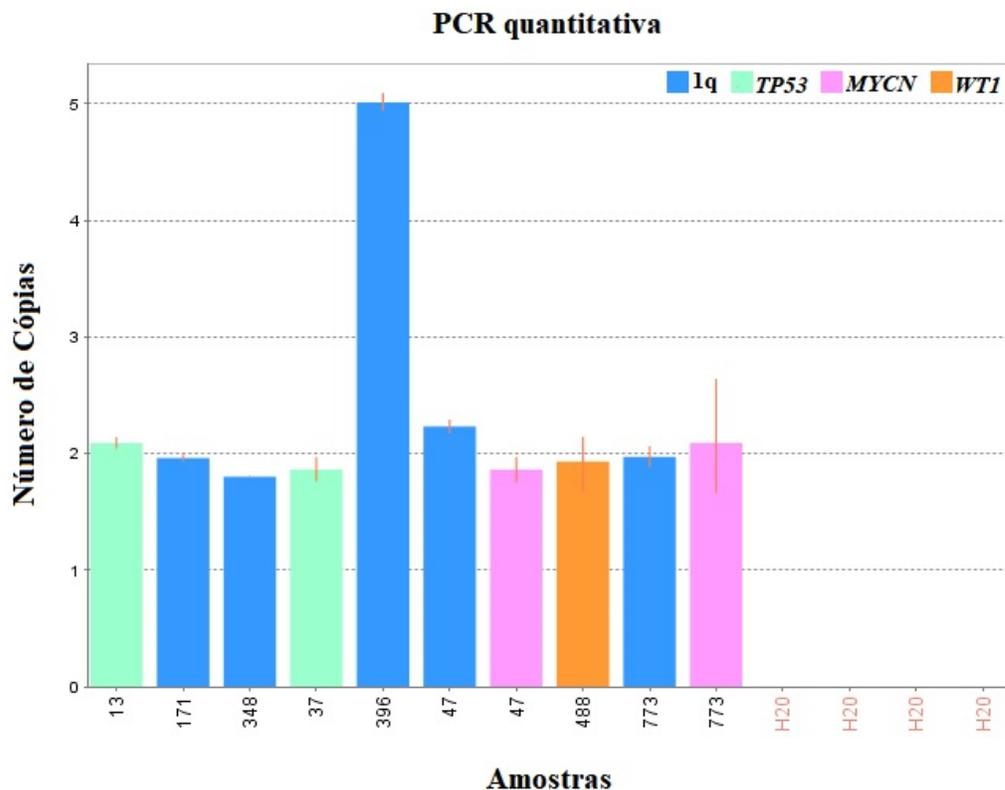


Figura 7 - Representação extraída do programa CopyCaller® v2.1 (Applied Biosystems®, Thermo Fisher). A imagem mostra as oito amostras que foram avaliadas para alteração do número de cópias. As regiões que foram avaliadas neste experimento foram 1q (azul), e *TP53* (verde), *MYCN* (rosa) e *WT1* (laranja). O eixo Y indica o número de cópias da região avaliada, enquanto o eixo X indica as amostras dos pacientes e a água. As amostras 47 e 773 foram avaliadas em duas regiões.

Em resumo, as alterações consideradas verdadeiras são aquelas que foram identificadas por MLPA e no caso de dúvida, foram confirmadas por qPCR. Amostras discordantes entre os dois experimentos foram consideradas negativas uma vez que o MLPA é a técnica de escolha pelos estudos clínicos em TWs para avaliação do número de cópias.

Parte desses dados foram usados no artigo “Somatic Copy Number Alteration in Circulating Tumor DNA for Monitoring of Pediatric Patients with Cancer”, publicado na *Biomedicines* em 2023 (**Anexos**).

4.5 Comparação entre informações clínico-patológicas e moleculares

Após a obtenção dos dados moleculares, procedeu-se para a comparação entre as características clínico-patológicas (**Tabela 13**) e os achados moleculares.

Tabela 13 - Características clínicas e patológicas dos 40 pacientes.

	Variáveis contínuas	Média	Mediana
	Idade ao diagnóstico (n = 40, em meses)	46,83 (2-304)	38
	Peso ao nascer (n = 34, em gramas)	3083,44 (720-3950)	3.102,50
	Peso ao diagnóstico (n = 38, em gramas)	16900,13 (6400-68000)	14.350
	Altura (n = 37, em centímetros)	100,89 (63-170)	99,00
	IMC (n = 36)	15,62 (11-28)	14,97
	Peso da peça tumoral (n = 35, em gramas)	591,80 (200-1720)	530,00
	Variáveis categóricas	Frequência	Porcentagem (%)
Resposta (40)	Respondeu	29	72,5
	Recaiu	8	20,0
	Progrediu	3	7,5
Óbito (40)	Sim	5	12,5
	Não	35	87,5
Cor (autodeclarada) (38)	Branco	26	68,4
	Pardo	9	23,7
	Preto	2	5,3
	Amarelo	1	2,6
Sexo (40)	Feminino	20	50,0
	Masculino	20	50,0
Lateralidade (40)	Direita	21	52,5
	Esquerda	19	47,5

Estadiamento Clínico (39)	I	8	20,5
	II	10	25,6
	III	9	23,1
	IV	12	30,8
Estadiamento Patológico (38)	I	7	18,4
	II	14	36,8
	III	16	42,1
	IV	1	2,6
Metástase ao Diagnóstico (39)	Sim	16	40,0
	Não	24	60,0
Predomínio Histológico (39)	Blastematoso	25	64,1
	Estromal	6	15,4
	Epitelial	6	15,4
	Misto	1	2,6
	Necrose	1	2,6
Classificação Histológica (38)	Unifásico	-	-
	Bifásico	6	15,8
	Trifásico	31	81,6
	Necrótico	1	2,6
Anaplasia (38)	Sim	2	5,3
	Não	36	94,7
Pré-Quimioterapia (39)	Sim	9	23,1
	Não	30	76,9
Radioterapia (40)	Sim	23	57,5
	Não	17	42,5
Desvio de Tratamento (39)	Sim	3	7,7
	Não	36	92,3
Tratamento (38)	EE-4A	14	36,8

	DD-4A	18	47,4
	Regimen I	1	2,6
	Stage IV	2	5,3
	Misto	3	7,9

Observação: entre parênteses, estão mostrados o número de pacientes avaliados para cada parâmetro.

Com relação às variáveis contínuas, a **Tabela 13** mostra os valores em média e mediana, bem como o menor e o maior valor de cada uma delas. Ao nascimento, os bebês pesaram 3.083 g (720 - 3.950 g) em média. Ao diagnóstico, as médias foram de 47 meses de idade (2 a 304 meses), 16,900 kg (6,400 a 68,000), 101 cm de altura (63 a 170 cm) e o IMC foi de 15,62 (11 a 28). Já o produto da nefrectomia pesou 592 g (200 a 1.720 g) em média.

Com relação às variáveis categóricas, a **Tabela 13** mostra o predomínio das seguintes características: respondeu ao tratamento (72,5%), óbito ausente (87,5%) estadiamento clínico IV (30,8%), estadiamento patológico III (42,1%), metástase ao diagnóstico ausente (60,0%), predomínio histológico blastematoso (64,1%), classificação histológica trifásica (81,6%), anaplasia ausente (94,7%), realização de pré-quimioterapia ausente (76,9%), radioterapia presente (57,5%), desvio de tratamento ausente (92,3) e protocolo COG DD-4A (47,4%).

Com relação aos achados moleculares, a **Tabela 14** mostra a quantidade de alterações em cada um dos sete biomarcadores avaliados neste estudo.

Tabela 14 - Número de alterações encontradas nos 40 tumores avaliados.

Cromossomo	Sem alterações	Perdeu	Ganhou
Xq	36	3	1
1p	34	6	-
1q	31	-	9
2p	37	-	3
11p	34	6	-
16q	32	8	-
17p	36	3	1

Analisando a **Tabela 14**, as regiões cromossômicas que apresentaram perdas foram: Xq (n = 3), 1p (n = 6), 11p (n = 6), 16q (n = 8) e 17p n = (3); e as regiões que apresentaram ganhos foram: Xq (n = 1), 1q (n = 9), 2p (n = 3) e 17p (n = 1).

Utilizando o programa Origin (OriginLab Corporation, Microsoft Windows, 2022), foram produzidos quatro gráficos relacionando as quatro características patológicas (resposta, óbito, histologia e estadiamento) e as alterações do número de cópias dos sete biomarcadores (*AMER1*, 1p, 1q, *MYCN*, *WT1*, 16q e *TP53*).

Na **Figura 8** é mostrada a variável **óbito (óbito ou não óbito)** em comparação com os biomarcadores e a perda ou o ganho de números de cópias com relação ao número de 40 pacientes.

Dos 40 pacientes analisados, 5 apresentaram óbito, sendo que 4 apresentaram alguma alteração em pelo menos um dos biomarcadores analisados. Retomando a **Tabela 11**, é possível corroborar que esses pacientes foram:

- 1) **Paciente 773/09 (MD/PR/O - Anaplasia) - com perda em 16q e 17p (*TP53*)**
- 2) **Paciente 013/05 (R/O) - com perda em Xq (*AMER1*) e ganho em 1q**
- 3) **Paciente 396/10 (MD/PR/O) - com perda 1p, 11p, 16q e 17p; e ganho em 1q**
- 4) **Paciente 540/09 (R/O) - com perda em 1 p e ganho em 1q.**

Contudo, um paciente que foi a óbito não apresentou nenhuma alteração nos biomarcadores: 279/14 MD/MT/PR/O.

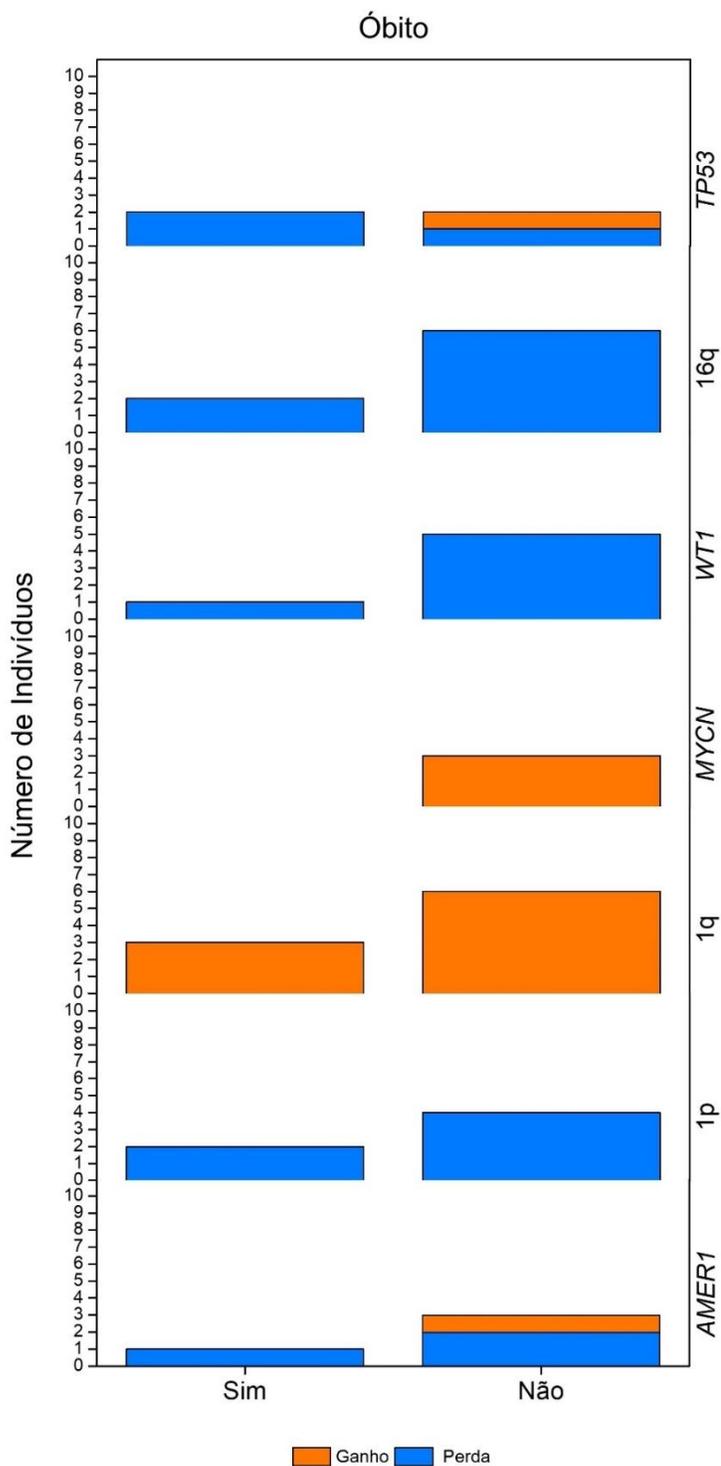


Figura 8 - Comparação entre o óbito ou não óbito, os biomarcadores e o ganho ou a perda do número de cópias, com relação a 40 pacientes. No eixo X, estão especificadas as variáveis óbito e não óbito. No eixo Y à esquerda, está especificado o número de indivíduos (total de 40 indivíduos analisados), e à direita, está especificado o tipo de biomarcador. A cor laranja representa o ganho do número de cópias e a cor azul representa a perda do número de cópias.

Na **Figura 9** é mostrada a variável **resposta (respondeu, recaiu ou progrediu)** em comparação com os biomarcadores e a perda ou o ganho de números de cópias. É possível verificar o predomínio do ganho de 1q em 5 pacientes com recaída.

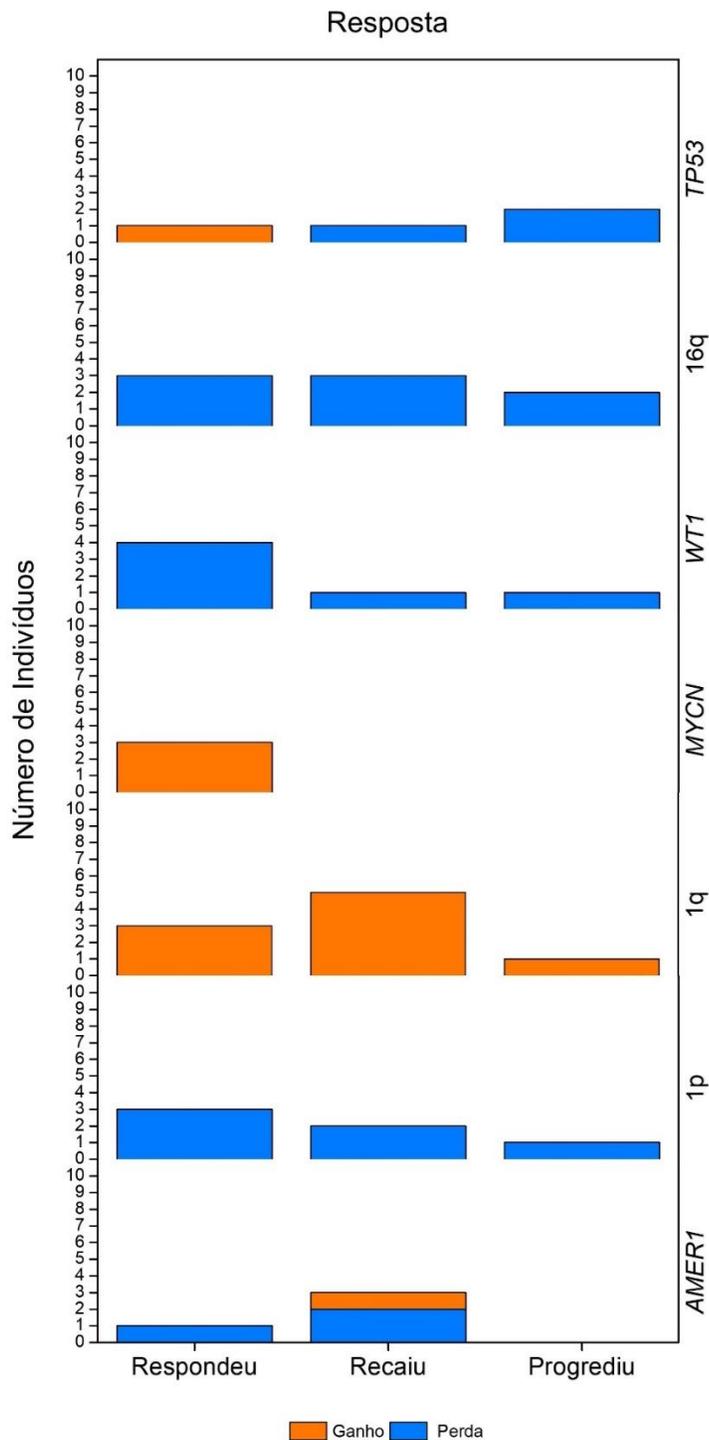


Figura 9 - Comparação entre as respostas ao tratamento, os biomarcadores e o ganho ou a perda do número de cópias. No eixo X, estão especificadas as variáveis respondeu, recaiu e progrediu. No eixo Y à esquerda, está especificado o número de indivíduos (total de 40 indivíduos analisados), e à direita, está especificado o tipo de biomarcador. A cor laranja representa o ganho do número de cópias e a cor azul representa a perda do número de cópias.

Na **Figura 10** é mostrada a variável **estadiamento (I, II, III ou IV)** em comparação com os biomarcadores e a perda ou o ganho de números de cópias. É possível verificar o predomínio de III no ganho de 1q (5/40) e perda de 16q (4/40).

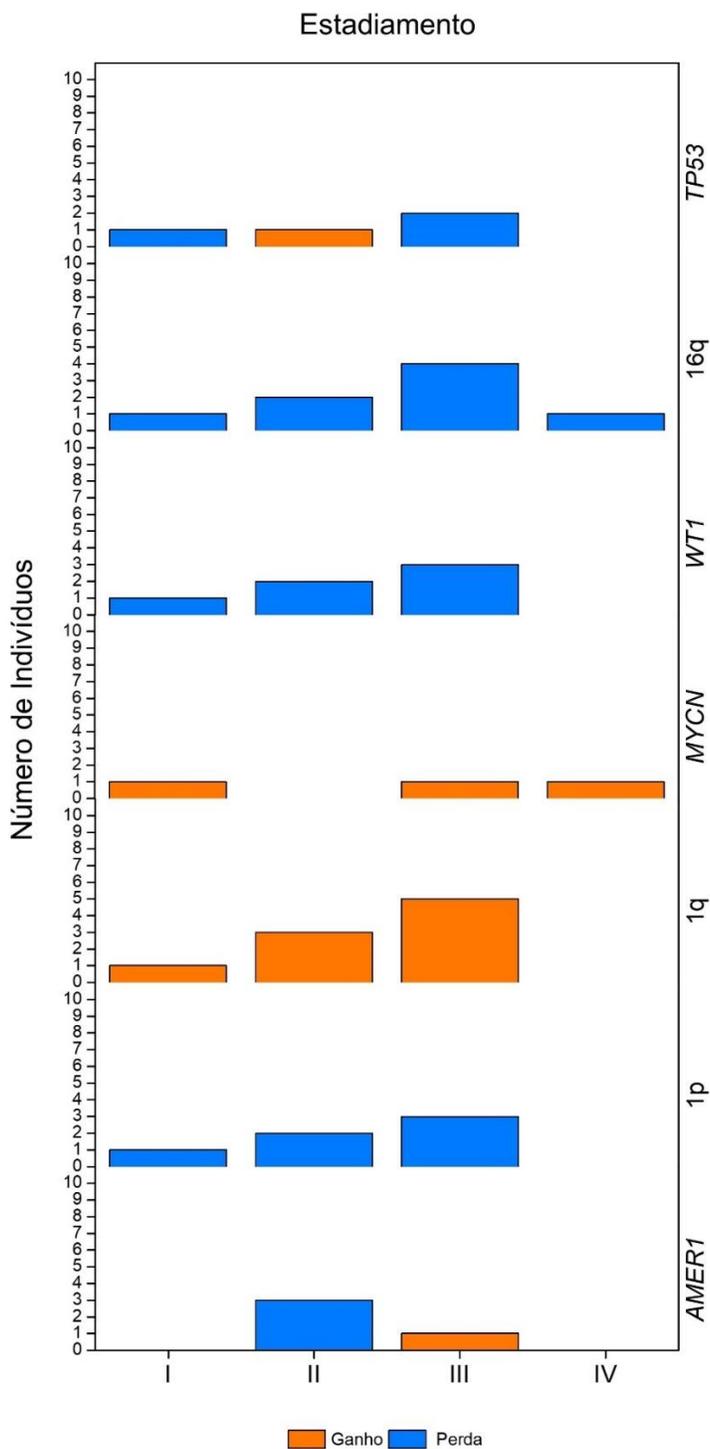


Figura 10 - Comparação entre os estadiamentos patológicos, os biomarcadores e o ganho ou a perda do número de cópias. No eixo X, estão especificadas as variáveis I, II, III e IV. No eixo Y à esquerda, está especificado o número de indivíduos (total de 40 indivíduos analisados), e à direita, está especificado o tipo de biomarcador. A cor laranja representa o ganho do número de cópias e a cor azul representa a perda do número de cópias.

Na **Figura 11** é mostrada a variável **histologia (Blastematoso, Estromal, Epitelial, Misto, Regressivo e Anaplasia difusa)** em comparação com os biomarcadores e a perda ou o ganho de números de cópias. É possível verificar o predomínio de blastematoso no ganho de 1q (5/40) e de estromal na perda de 16q (3/40).

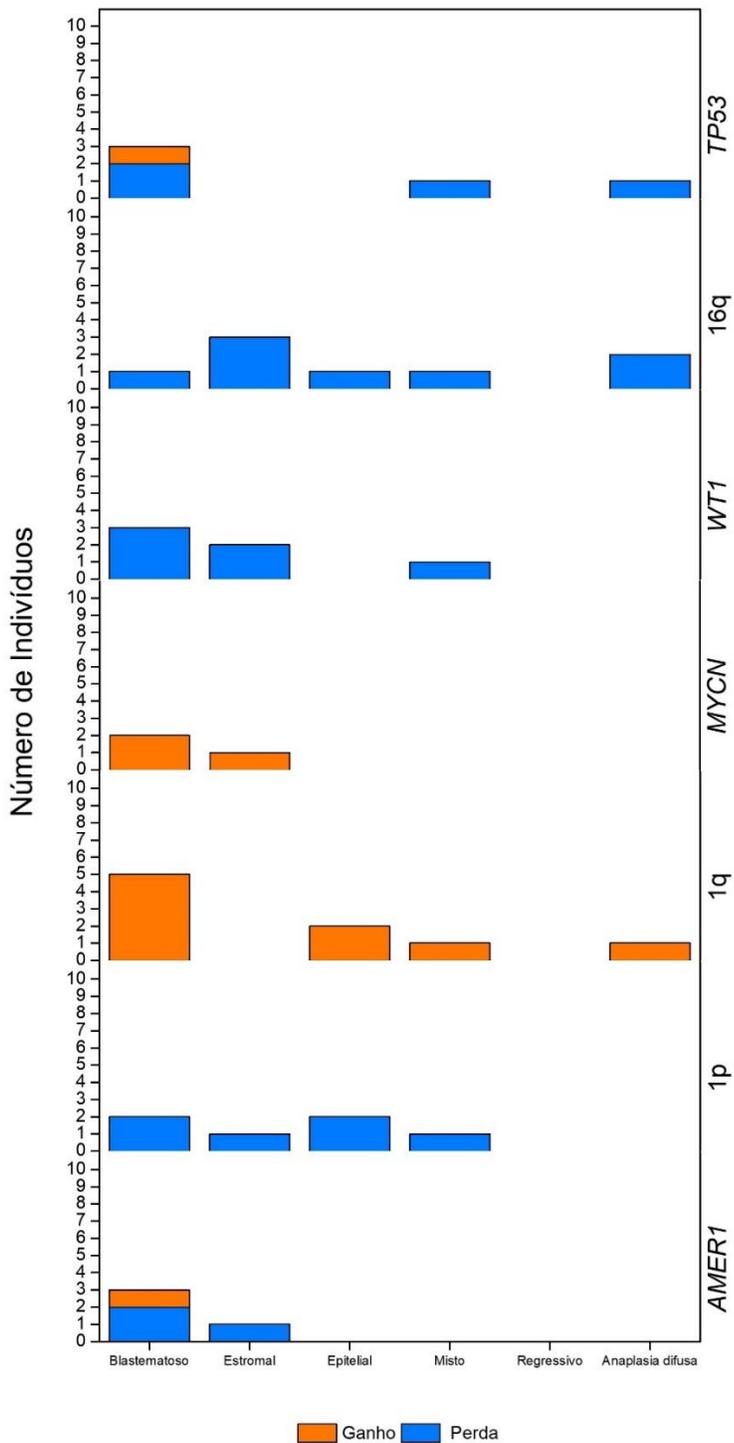


Figura 11 - Comparação entre os tipos histológicos, os biomarcadores e o ganho ou a perda do número de cópias. No eixo X, estão especificadas as variáveis blastematoso, estromal, epitelial, misto, regressivo, anaplasia difusa. No eixo Y à esquerda, está especificado o número de indivíduos (total de 40 indivíduos analisados), e à direita, está especificado o tipo de biomarcador. A cor laranja representa o ganho do número de cópias e a cor azul representa a perda do número de cópias.

Para prosseguir as análises, foram realizados os testes de normalidade, ou seja, para determinar se as amostras seguiram uma distribuição normal. Considerando o Teste de Shapiro-Wilk mais adequado para grupos amostrais inferiores a 50, consideramos que a maior parte dos dados seguem uma distribuição não normal. Por esta razão, foram utilizados testes não paramétricos para as comparações que se seguem.

Considerando as hipóteses do teste de normalidade (H_0 : distribuição da amostra = distribuição normal e H_1 : distribuição da amostra \neq distribuição normal), quando $p > 0,05$, os dados têm uma distribuição normal, e quando $p < 0,05$ os dados têm uma distribuição não normal. Logo, quatro características têm o $p < 0,05$, apresentados na **Tabela 15** na coluna “Significância”: Tempo do 1º esquema quimioterápico, peso ao nascer, IMC e peso da peça tumoral. Por isso, os dados foram considerados não normais.

Tabela 15 - Teste de normalidade das variáveis contínuas dos 40 pacientes.

Características	Estatística	Grau de Liberdade	Significância
Tempo do 1º esquema quimioterápico	0,624	26	<0,001
Idade ao diagnóstico	0,969	26	0,595
Peso ao nascer	0,861	26	0,002
Peso ao diagnóstico	0,973	26	0,702
Altura	0,976	26	0,773
IMC	0,858	26	0,002
Peso da peça tumoral	0,817	26	<0,001

A **Tabela 16** contém a comparação entre as características moleculares comparadas com a variável “resposta ao tratamento”. A **Tabela 17** contém a comparação das características moleculares comparadas com a variável “óbito”. As variáveis com valores estatisticamente significativos estão sinalizadas com asterisco (*).

Tabela 16 - Comparação de características moleculares com a variável “resposta ao tratamento”.

		RESPOSTA			
		Respondeu	Recaiu	Progrediu	Total
Xq ⁽¹⁾	Sem alterações	28 (70,0%)	5 (12,5%)	3 (7,5%)	36 (90,0%)
	Perda	1 (2,5%)	2 (5,0%)	0 (0,0%)	3 (7,5%)
	Ganho	0 (0,0%)	1 (2,5%)	0 (0,0%)	1 (2,5%)
	Total	29 (72,5%)	8 (20,0%)	3 (7,5%)	40 (100,0%)
1p ⁽²⁾	Sem alterações	26 (65,0%)	6 (15,0%)	2 (5,0%)	34 (85,0%)
	Perda	3 (7,5%)	2 (5,0%)	1 (2,5%)	6 (15,0%)
	Ganho	-	-	-	-
	Total	29 (72,5%)	8 (20,0%)	3 (7,5%)	40 (100,0%)
1q ^{*(3)}	Sem alterações	26 (65%)	3 (7,5%)	2 (5,0%)	31 (77,5%)
	Perda	-	-	-	-
	Ganho	3 (7,5%)	5 (12,5%)	1 (2,5%)	9 (22,5%)
	Total	29 (72,5%)	8 (20,0%)	3 (7,5%)	40 (100,0%)
2p ⁴	Sem alterações	26 (65,0%)	8 (20,0%)	3 (7,5%)	37 (92,5%)
	Perda	-	-	-	-
	Ganho	3 (7,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (7,5%)
	Total	29 (72,5%)	8 (20,0%)	3 (7,5%)	40 (100,0%)
11p ⁵	Sem alterações	25 (62,5%)	7 (17,5%)	2 (5,0%)	34 (85,0%)
	Perda	4 (10,0%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	6 (15,0%)
	Ganho	-	-	-	-
	Total	29 (72,5%)	8 (20,0%)	3 (7,5%)	40 (100,0%)
16q ^{*(6)}	Sem alterações	26 (65,0%)	5 (12,5%)	1 (2,5%)	32 (80,0%)
	Perda	3 (7,5%)	3 (7,5%)	2 (5,0%)	8 (20,0%)
	Ganho	-	-	-	-
	Total	29 (72,5%)	8 (20,0%)	3 (7,5%)	40 (100,0%)

17p ^{*(7)}	Sem alterações	28 (70,0%)	7 (17,5%)	1 (2,5%)	36 (90,0%)
	Perda	0 (0,0%)	1 (2,5%)	2 (5,0%)	3 (7,5%)
	Ganho	1 (2,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,5%)
	Total	29 (72,5%)	8 (20,0%)	3 (7,5%)	40 (100,0%)

¹⁾ $X^2_{(4)}=8,970$; $p=0,069$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,335

²⁾ $X^2_{(2)}=1,911$; $p=0,214$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,219

³⁾ $X^2_{(2)}=10,000$; $p=0,006$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,500 (**estatisticamente significativo**)

⁴⁾ $X^2_{(2)}=1,230$; $p=1,000$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,175

⁵⁾ $X^2_{(2)}=0,863$; $p=0,579$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,147

⁶⁾ $X^2_{(2)}=7,304$; $p=0,019$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,427 (**estatisticamente significativo**)

⁷⁾ $X^2_{(4)}=18,038$; $p=0,008$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,475 (**estatisticamente significativo**)

Os testes exato de Fisher mostraram associação significativa entre a variável “resposta” com as seguintes variáveis moleculares: com o 1q ($X^2_{(2)}=10,000$; $p=0,006$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,500), com o 16q ($X^2_{(2)}=7,304$; $p=0,019$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,427) e com o 17p ($X^2_{(4)}=18,038$; $p=0,008$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,475).

Tabela 17 - Comparação de características moleculares com a variável “óbito”.

		ÓBITO		
		Não	Sim	Total
Xq ¹	Sem alterações	32 (80,0%)	4 (10,0%)	36 (90,0%)
	Perda	2 (5,0%)	1 (2,5%)	3 (7,5%)
	Ganho	1 (2,5%)	0 (0,0%)	1 (2,5%)
	Total	35 (87,2%)	5 (12,5%)	40 (100,0%)
1p ²	Sem alterações	31 (77,5%)	3 (7,5%)	34 (85,0%)
	Perda	4 (10,0%)	2 (5,0%)	6 (15,0%)
	Ganho	-	-	-
	Total	35 (87,5%)	5 (12,5%)	40 (100,0%)
1q ³	Sem alterações	29 (72,5%)	2 (5,0%)	31 (77,5%)
	Perda	-	-	-
	Ganho	6 (15,0%)	3 (7,5%)	9 (22,5%)
	Total	35 (87,2%)	5 (12,5%)	40 (100,0%)
2p ⁴	Sem alterações	32 (80,0%)	5 (12,5%)	37 (92,5%)
	Perda	-	-	-
	Ganho	3 (7,5%)	0 (0,0%)	3 (7,5%)
	Total	35 (87,5%)	5 (12,5%)	40 (100,0%)
11p ⁵	Sem alterações	30 (75,0%)	4 (10,0%)	34 (85,0%)
	Perda	5 (12,5%)	1 (2,5%)	6 (15,0%)
	Ganho	-	-	-
	Total	35 (87,5%)	5 (12,5%)	40 (100,0%)
16q ⁶	Sem alterações	29 (72,5%)	3 (7,5%)	32 (80,0%)
	Perda	6 (15,0%)	2 (5,0%)	8 (20,0%)
	Ganho	-	-	-
	Total	35 (87,5%)	5 (12,5%)	40 (100,0%)

17p ⁷	Sem alterações	33 (82,5%)	3 (7,5%)	36 (90,0%)
	Perda	1 (2,5%)	2 (5,0%)	3 (7,5%)
	Ganho	1 (2,5%)	0 (0,0%)	1 (2,5%)
	Total	35 (87,5%)	5 (12,5%)	40 (100,0%)

¹⁾ $X^2_{(2)}=1,397$; $p=0,427$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,187

²⁾ $X^2_{(1)}=2,801$; $p=0,154$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,265

³⁾ $X^2_{(1)}=4,608$; $p=0,065$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,339

⁴⁾ $X^2_{(1)}=0,463$; $p=1,000$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,108

⁵⁾ $X^2_{(1)}=0,112$; $p=1,000$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,053

⁶⁾ $X^2_{(1)}=1,429$; $p=0,257$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,189

⁷⁾ $X^2_{(2)}=8,762$; $p=0,069$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,468

Os testes Exato de Fisher não mostraram nenhuma associação significativa entre a variável “óbito” com as variáveis moleculares.

Levando em consideração que os testes de hipóteses mostram se há ou não associação entre duas variáveis, mas não quantifica a força da associação, foi realizado a análise multivariada das características que foram associadas. Contudo, os pressupostos dos testes não foram atendidos devido ao baixo número de amostras avaliadas.

4.6 Avaliação de amostras armazenadas em parafina

Dos casos de TWs armazenados em parafina, foram selecionados aqueles com predomínio de componente blastematoso. Para controle do estudo, foram registrados a porcentagem aproximada de componentes de cada um dos blocos selecionados, através da leitura das lâminas de cada um deles (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Casos selecionados para o estudo.

Paciente	Lâmina	% Blastemal	% Epiteial	% Estromal	% Necrose	Observações
5	12	0%	5%	95%		

22	J	70%	20%	10%		
27	11	95%	0%	0%		5% fibrose
37	A1	0%	85%	5%		Tumor representa 90% da lâmina
38	9	70%	15%	15%		
45	10	90%				10% de rim normal presente
46	A	5%	0%	70%	25%	
53	5	10%	80%	10%		
60	A	70%	0%	10%	20%	
61	3					Não tem componente blastematosol
63	13	0%	15%	25%	Muito necrótico	Tumor representa 40% da lâmina
67	4B	90%	5%	5%		
71	9	70%	10%	20%		
72	5	15%	50%	35%		
78	8	95%	2%	3%		
82	K	80%	15%	5%		
86	3	40%	20%	20%	20%	
91	7	95%	0%	5%		
106	13	80%	10%	10%		
107	S/N	40%	10%	50%		
108	7	20%	70%	10%		
109	12	80%	0%	20%		
113	?					
118	14	0%	10%	90%		
119	17	90%	5%	5%		
120	8C	40%	30%	30%		

127	8	90%	5%	5%	
129	6	2%	95%	3%	
134	7	0%	5%	0%	95%
139	T3	85%	5%	0%	10%
145	5	10%	85%	5%	
146	9	90%	0%	10%	
152	H	90%	0%	10%	
156	S/N	90%	0%	10%	
163	5	90%	0%	10%	
165	TU	90%	0%	10%	
166	C	5%	0%	0%	95%
172	S/N	90%			
175	16	80%	10%	10%	
177	6	95%	3%	2%	
179	8	95%	5%	0%	Tumor representa 40% da lâmina
181	1J	60%	0%	40%	
182	14	40%	40%	10%	10% fibrose
187	G5ul	100%	0%	0%	

Observação: foram selecionadas amostras de tecido renal normal adjacente ao tumor de alguns casos.

Após obtidas as concentrações satisfatórias de DNA das amostras de TW parafinadas (acima de 10 ng/ul), o produto da PCR foi verificado em gel de agarose (2%) em TBE (1X), que mostrou a boa integridade do DNA, uma vez que pelo menos 1 das quatro bandas apareceram no gel (**Figura 12**).

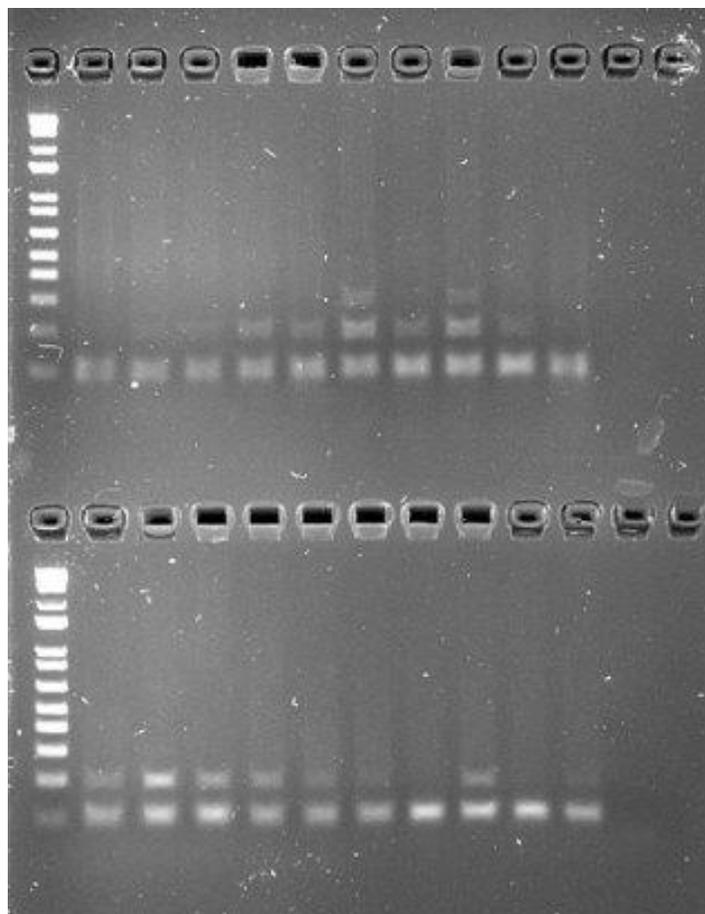


Figura 12 - Gel de agarose (2%) de 20 amostras de DNA extraídas de tumores em blocos de parafina. O marcador é o ladder de 1 Kb plus (Invitrogen™). Na imagem, é possível verificar o ladder (L) na posição do primeiro pocinho do gel (lado esquerdo) e nos demais pocinhos, as amostras de DNA extraídas de tumores emblocados em parafina. É possível verificar que há amostras com 100, 200 e até 300 pb.

Após a otimização das extrações de amostras em parafina, as amostras de DNA que amplificaram pelo menos a banda de 100 pb foram submetidas em qPCR no sistema SDS 7500 Fast. Algumas das amostras armazenadas em material parafinado, também estavam armazenadas em material congelado. Desse modo, foi possível comparar os resultados obtidos de ambos, que mostrou uma discordância entre os números de cópias identificados por qPCR, indicando que, para esses experimentos, não é possível usar o material parafinado e, portanto, não foi possível expandir o estudo para todas as amostras retrospectivas da instituição.

5 DISCUSSÃO

Este foi um estudo de avaliação de pacientes diagnosticados com TW em um período de 15 anos de uma única instituição, incluindo o perfil de número de cópias de biomarcadores que estão sendo testados prospectivamente por ensaios clínicos internacionais. Para tanto, este estudo validou alterações moleculares em Xq (*WTX*), 1p, 1q, 2p (*MYCN*), 11p (*WT1*), 16q e 17p (*TP53*) em pacientes atendidos no Centro Infantil Boldrini de 2005 a 2020. Para aumentar a coorte estudada, testamos os experimentos em material de parafina, contudo, devido à qualidade das amostras, os resultados obtidos foram descartados.

Com relação aos dados descritivos, dos 186 pacientes diagnosticados com TW unilateral e sem anaplasia totalizaram 153 de 186 (82,3% dos casos), com 74,5% de classificação histológica trifásica, conforme apresentado na literatura o TW tem uma morfologia heterogênea, apresentando três componentes histológicos principais: blastematoso, epitelial e estromal (BECKWITH *et al.*, 1990), embora nem todos os tumores sejam trifásicos (LI *et al.*, 2002). Esses pacientes tiveram melhor resposta ao tratamento (81%), sem recaída ou óbito (88,9%), também corroborando com a literatura, em que a sobrevida em cinco anos é superior a 90% para crianças em qualquer estadiamento da doença com histologia favorável que recebem tratamento adequado (IRTAN, EHRLICH, PRITCHARD-JONES, 2016).

Ao verificar todos os pacientes com histologia favorável tratados com protocolo COG, o teste exato de Fisher mostrou que não há associação, ou não há dependência entre a variável resposta e as seguintes variáveis: classificação histológica ($X^2_{(3)}= 0,320$; $p= 1,000$), predomínio histológico ($X^2_{(4)}=1,887$; $p=0,664$), estadiamento patológico ($X^2_{(3)}= 1,196$; $p= 0,764$), metástase ao diagnóstico ($X^2_{(1)}= 1,292$; $p= 0,307$) e quimioterapia pré-nefrectomia ($X^2_{(1)}= 0,007$; $p= 1,000$). O teste exato de Fisher também mostrou que há associação entre a variável resposta e as seguintes variáveis: radioterapia ($X^2_{(1)}= 5,743$; $p= 0,023$) e tratamento ($X^2_{(1)}= 5,405$; $p= 0,024$). Já é reconhecido que ambos os protocolos, COG e SIOP, atingem a mesma eficiência de tratamento (IRTAN, EHRLICH, PRITCHARD-JONES, 2016). O

protocolo do COG tem braços de tratamento que diferem conforme a histologia e o estadiamento. Ambos estão em acordo com esses achados.

Em contrapartida, o teste exato de Fisher mostrou que não há associação, ou não há dependência entre a variável óbito e as seguintes variáveis: classificação histológica ($X^2_{(3)}=0,557$; $p=1,000$), predomínio histológico ($X^2_{(4)}=0,276$; $p=1,000$), estadiamento patológico ($X^2_{(3)}=1,363$; $p=0,620$), metástase ao diagnóstico ($X^2_{(1)}=0,750$; $p=0,584$), quimioterapia pré-nefrectomia ($X^2_{(1)}=0,680$; $p=0,588$), radioterapia ($X^2_{(1)}=3,155$; $p=1,333$) e tratamento ($X^2_{(1)}=3,013$; $p=0,138$).

Já para os pacientes com TW de histologia favorável tratados com protocolo SIOP, o teste exato de Fisher mostrou que não há associação, ou não há dependência entre a variável resposta e as seguintes variáveis: classificação histológica ($X^2_{(2)}=2,100$; $p=0,619$), predomínio histológico ($X^2_{(4)}=4,550$; $p=0,810$), metástase ao diagnóstico ($X^2_{(1)}=1,120$; $p=1,000$), radioterapia ($X^2_{(1)}=2,917$; $p=0,286$), tratamento ($X^2_{(1)}=0,036$; $p=1,000$) e óbito ($X^2_{(1)}=2,917$; $p=0,286$). O teste exato de Fisher também mostrou que há associação entre a variável resposta e a variável estadiamento patológico ($X^2_{(2)}=7,000$; $p=0,048$). O tratamento quimioterápico realizado previamente à nefrectomia tem um impacto direto no estadiamento e na composição histológica dos tumores, como diminuir a quantidade de células blastomatosas, uma vez que essas células são melhores respondedoras ao tratamento quimioterápico (GRAF, TOURNADE, DE KRAKER, 2000), similar ao que foi encontrado neste estudo.

O teste exato de Fisher mostrou que não há associação, ou não há dependência entre a variável óbito e as seguintes variáveis: classificação histológica ($X^2_{(2)}=0,875$; $p=1,000$), predomínio histológico ($X^2_{(4)}=7,000$; $p=0,429$), estadiamento patológico ($X^2_{(2)}=7,000$; $p=0,286$), metástase ao diagnóstico ($X^2_{(1)}=0,467$; $p=1,000$), radioterapia ($X^2_{(1)}=0,194$; $p=1,000$) e tratamento ($X^2_{(1)}=1,556$; $p=0,429$).

O estudo também identificou pacientes diagnosticados com TW bilateral, que totalizaram 25 de 186 (13,4% dos casos), e pacientes diagnosticados com TW com anaplasia, que totalizaram 8 de 186 (4,3% dos casos), se aproximando com achados da literatura, que relata anaplasia em 5% a 10% dos TWs (ZUPPAN, BECKWITH, LUCKEY, 1988). A idade

dos pacientes com tumores unilaterais foi de 48 meses, comparado com 33 meses dos pacientes com doença bilateral. A literatura aponta que a doença apresenta um pico de incidência entre o 2º (24 meses) e o 3º ano (36 meses) de vida, sendo que a maioria das crianças (75%) desenvolve o TW entre 1 (12 meses) e 5 (60 meses) anos de idade (BRESLOW *et al.*, 1993; BALIS *et al.*, 2021).

Dos 186 casos para as análises descritivas, 40 casos foram estudados com relação às alterações genéticas. Analisando a literatura, a alteração genética mais comum presente em pacientes com TW é o ganho de 1q, encontrado em aproximadamente 25% dos TWs e é encontrada em 40% dos pacientes que apresentam recaída (DOME *et al.*, 2013, CHAGTAI *et al.*, 2016). Atualmente, o ganho de 1q é um marcador prognóstico independente de recorrência em pacientes com TW, tanto tratados pelo protocolo COG quanto SIOP, já que TWs com ganho de 1q parecem ser mais agressivos e têm maior potencial metastático, uma vez que a prevalência de ganho de 1q é maior entre os TWs de estadiamentos mais avançados (CHAGTAI *et al.*, 2016). Por esta razão, vem sendo considerado um biomarcador relevante para TW e está sendo testado tanto pelo COG quanto pela SIOP nos estudos clínicos prospectivos.

O ganho de 1q também foi a alteração mais frequente entre os pacientes avaliados neste estudo, 9/40 (22,5%) dos quais 3 pacientes apresentaram recidiva da doença e 3 pacientes foram a óbito. Neste estudo foi identificada associação significativa entre a resposta ao tratamento e *status* de 1q ($X^2_{(2)}=10,000$; $p=0,006$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,500), corroborando com os achados da literatura (HING *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2002, WILLIAMS *et al.*, 2004; NATRAJAN *et al.*, 2006a; NATRAJAN *et al.*, 2006b; GRATIAS *et al.*, 2013; CHAGTAI *et al.*, 2016).

A segunda alteração mais frequente neste estudo foi a LOH de 16q 8/40 (20%) dos casos apresentaram LOH 16q, sendo que a resposta ao tratamento foi significativamente associada com o 16q, $X^2_{(2)}=7,304$; $p=0,019$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,427. A terceira alteração mais frequente neste estudo foi a perda de 1p, presente em 6/40 (15%) dos casos, contudo, não foi encontrada associação significativa dessa variável com nenhuma outra do estudo. Também identificamos apenas um caso com perda concomitante de 1p e 16q, paciente que apresentou metástase e foi a óbito.

A LOH de 1p e 16q já foi avaliada pelo COG, incluindo a LOH de apenas 1p e apenas 16q, bem como LOH combinado de 1p e 16q em pacientes com TW (GRUNDY *et al.*, 2005, GRATIAS *et al.*, 2016). A literatura mostra que LOH 1p e 16q apareceram significativamente associados ao ganho de 1q, no entanto, na presença de ganho de 1q, a LOH de 16q e 1p perdem significância como marcadores prognósticos independentes. Na ausência de ganho 1q, a LOH de 16q e 1p retém seu impacto prognóstico adverso (GRATIAS *et al.*, 2016). Portanto, o uso efetivo de LOH 1p/16q é limitado a determinados subgrupos de pacientes.

Perda de *WT1* foi relatada por SCOTT *et al.* (2012) e ROYER-POKORA (2013), sendo que neste estudo, observamos em 6/40 pacientes avaliados (15%). Alterações somáticas em *WT1* são observadas em 10-20% dos casos de TWs e, em geral, não parecem ter valor prognóstico independente (TREGGER *et al.*, 2019), contudo, as mutações germinativas de *WT1* normalmente resultam em anormalidades geniturinárias e predisposição a TW (SCOTT *et al.*, 2006a; SCOTT *et al.*, 2006b), o que não foi avaliado neste estudo.

As alterações em *TP53*, *AMER1* e *MYCN* foram identificadas, respectivamente, em 4/40 (10%), 5/40 (12,5%) e 3/40 (7,5%) dos casos avaliados. Desses três, apenas o *TP53*, apresentou uma associação significativa com a variável resposta ao tratamento, com $X^2_{(4)}=18,038$; $p=0,008$ (Teste Exato de Fisher), V de Cramer: 0,475. O baixo número de casos não permite concluir sobre a associação com óbito, entretanto, a literatura reporta a associação entre perda e/ou mutação de *TP53* e prognóstico adverso para qualquer histologia (MASCHIETTO *et al.*, 2014, WEGERT *et al.*, 2018).

Parte desses dados foram avaliados em um estudo do grupo que busca por marcadores no DNA circulante tumoral (ctDNA) para serem usados como biópsia líquida (RUAS *et al.*, 2023). Semelhante ao TW, a maioria dos tumores pediátricos compartilham poucas mutações recorrentes, mas apresentam alterações estruturais como número de cópias (alterações de número de cópias, CNAs) (GRÖBNER *et al.*, 2018; RAHAL *et al.*, 2018; MA *et al.*, 2018; KATTNER *et al.*, 2019). O DNA livre na corrente sanguínea (cfDNA) é uma fonte proeminente para a detecção de biomarcadores específicos em pacientes com TW (WALZ *et al.*, 2023). Usando o perfil de CNAs de 1q, *MYCN* e 17p nos TWs e outros tumores

pediátricos, utilizamos PCR digital para caracterizar tais alterações no sangue periférico coletado ao diagnóstico desses pacientes. De forma geral, para todos os tumores, observamos que, ao diagnóstico, a identificação de CNAs foi concordante entre tumor e ctDNA em 56% dos casos, e para os 44% restantes, 91,4% dos CNAs estavam presentes apenas no cfDNA e 8,6% apenas no tumor. Esta discrepância pode ser explicada pela heterogeneidade intratumoral. A biópsia de um tumor nem sempre reflete a heterogeneidade clonal dentro do tumor primário, e a heterogeneidade espacial e temporal foi descrita para diversas entidades cancerígenas, incluindo TWs (CRESSWELL *et al.*, 2016).

Esses resultados sugerem que os pacientes brasileiros apresentam perfil molecular semelhante a outras coortes já analisadas (WEGERT *et al.*, 2017; PEROTTI *et al.*, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2015). A anaplasia, atualmente diagnosticada com base na morfologia das células tumorais, é encontrada em aproximadamente 5 a 10% dos TWs (ZUPPAN; BECKWITH; LUCKEY, 1988). No nosso estudo, dois pacientes apresentaram anaplasia (difusa), um deles apresentou a perda do gene *TP53* – esse paciente foi a óbito, corroborando com os dados da literatura, que demonstram que a presença de anaplasia difusa é considerada um fator prognóstico adverso, independentemente do tratamento inicialmente recebido (GROENENDIJK *et al.*, 2021).

Deste modo, assim como mostram diferentes estudos internacionais citados neste trabalho, este estudo contribuiu para enfatizar que diferentes biomarcadores moleculares estão associados a um risco aumentado de recaída do TW, e nossos dados sugerem que alguns desses biomarcadores podem ser aplicados para avaliar o perfil molecular dos TWs em pacientes brasileiros, como os biomarcadores 1p, 1q e 16q.

7 CONCLUSÃO

Ao realizar uma comparação das características clínicas e patológicas com os achados moleculares dos pacientes dessa coorte brasileira, há um predomínio de alterações moleculares em pacientes com metástase ao diagnóstico, metástase durante o tratamento, recaída, progressão e óbito.

Apenas um paciente que recaiu e foi a óbito não apresentou alteração genética, os demais apresentaram pelo menos uma alteração genética, sendo que o maior número de pacientes que foram a óbito apresentou ganho de 1q. Além disso, a perda de 16q também foi mais frequente em pacientes com desfechos mais problemáticos, como anaplásicos, com metástase ao diagnóstico, metástase durante o tratamento e óbito.

Contudo, algumas alterações não apresentaram associação significativa com o óbito e a recaída, como em *WT1* e *MYCN*.

Desse modo, nossos resultados sugerem, assim como na literatura, que a presença de LOH em 1p e 16q e o ganho de 1q, mostram-se potenciais biomarcadores para o prognóstico de sobrevida inferior em determinados pacientes com TW.

Por fim, rápidos avanços em diferentes frentes da ciência, juntamente com o aumento da colaboração internacional entre COG e SIOP, permitirá melhores desfechos de tratamento em pacientes com TW, para que o uso de biomarcadores no tratamento de pacientes com TW seja em breve uma realidade.

REFERÊNCIAS

1. Steliarova-Foucher, E.; Colombet, M.; Ries, L.A.G.; et al. International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *Lancet Oncol.* 18(6):719-731, 2017.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.
3. Stiller, C.A.; Allen, M.B.; Eatock, E.M. Childhood cancer in Britain: the National Registry of Childhood Tumors and incidence rates 1978-1987. *Eur J Cancer* 31A(12): 2028-34, 1995.
4. Rivera, M.N.; Haber, D.A. Wilms' tumor: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer* 5(9): 699-712, 2005.
5. Spreafico, F.; Bellani, F.F. Wilms' tumor: past, present and (possibly) future. *Expert Rev Anticancer Ther* 6(2): 249-58, 2006.
6. Davidoff, A.M. Wilms' tumor. *Curr Opin Pediatr* 21(3): 357-64, 2009.
7. Chu, A.; Heck, J.E.; Ribeiro, K.B.; et al. Wilms' tumor: a systematic review of risk factors and meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol* 24(5): 449-69, 2010.
8. Nakata, K.; Colombet, M.; Stiller, C.A.; et al. IICC-3 Contributors. Incidence of childhood renal tumours: An international population-based study. *Int J Cancer* 147(12):3313-3327, 2020.
9. Balis, F.; Green, D. M.; Anderson, C.; et al. Wilms tumor (nephroblastoma), version 2.2021. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 19(8), 945-977, 2021.
10. Breslow, N.; Olshan, A.; Beckwith, J.B.; et al. Epidemiology of Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol* 21:172-181, 1993.
11. Szychot, E.; Apps, J.; Pritchard-Jones, K. Wilms' tumor: biology, diagnosis and treatment. *Transl Pediatr* 3(1): 12-24, 2014.
12. Spreafico F, Fernandez CV, Brok J, et al. Wilms tumour. *Nat Rev Dis Primers* 7(1):75, 2021.
13. Breslow, N.; Olshan, A.; Beckwith, J.B.; et al. Ethnic variation in the incidence, diagnosis, prognosis, and follow-up of children with Wilms' tumor. *J Natl Cancer Inst* 86:49-51, 1994.
14. Hadley, L.G.; Rouma, B.S.; Saad-Eldin, Y. Challenge of pediatric oncology in Africa. *Semin Pediatr Surg.* May;21(2):136-41, 2012.

15. Apple, A.; Lovvorn, H.N. III. Wilms tumor in Sub-Saharan Africa: molecular and social determinants of a global pediatric health disparity. *Front Oncol* 10:606380, 2020.
16. Libes, J.; Hol, J.; Neto, J. C. A.; et al. Pediatric renal tumor epidemiology: Global perspectives, progress, and challenges. *Pediatric blood & cancer*, e30006, 2022.
17. Charlton, J.; Irtan, S.; Bergeron, C.; et al. Bilateral Wilms tumour: a review of clinical and molecular features. *Expert Rev. Mol. Med.*, 19, e8, 2017.
18. Kumar, V.; Abbas, A.; Fausto, N.; et al. *Patologia: Bases patológicas das doenças*. Elsevier, 2004.
19. Buckley, K.S. Pediatric genitourinary tumors. *Curr Opin Oncol* 23(3): 297-302, 2011.
20. INCA. Site do INCA, 2022. Estadiamento – Estadiar um caso de câncer significa avaliar seu grau de disseminação. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer/estadiamento#:~:text=O%20estadiamento%20patol%C3%B3gico%20baseia%2Dse,aplic%C3%A1vel%20a%20todos%20os%20tumores>. Acesso em: 10 nov. 2023.
21. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Wilms Tumor and Other Childhood Kidney Tumors Treatment (PDQ®): Health Professional Version. 2021 Aug 5. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002.
22. Beckwith, J.B.; Kiviat, N.B.; Bonadio, J.F. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pedriatr Path* 10(1-2): 1-36, 1990.
23. Maschietto, M.; de Camargo, B.; Brentani, H.; et al. Molecular profiling of isolated histological components of wilms tumor implicates a common role for the Wnt signaling pathway in kidney and tumor development. *Oncology* 75(1-2): 81-91, 2008.
24. Li, C.M.; Guo, M.; Borczuk, A.; et al. Gene expression in Wilms' Tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal epithelial transition. *Am J Pathol* 160:2181-90, 2002.
25. Gratas, E.J.; Dome, J.S.; Jennings, L.J.; et al. Association of Chromosome 1q Gain With Inferior Survival in Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34(26), 3189-94, 2016.
26. Beckwith, J.B.; Palmer, N.F. Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer*. May;41(5):1937-48, 1978.
27. Faria, P.; Beckwith, J.; Mishra, K; et al. Focal Versus Diffuse Anaplasia in Wilms Tumor - New Definitions with Prognostic Significance, *The American Journal of Surgical Pathology: Volume 20 - Issue 8 - p 909-920, August 1996*.

28. Zuppan, C.W.; Beckwith, J.B.; Luckey, D.W. Anaplasia in unilateral Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center. *Human Pathology*. 19:1199-1209, 1988.
29. Beckwith, J.B. Precursor lesions of Wilms tumor: clinical and biological implications. *Med Pediatr Oncol* 21 (3): 158-68, 1993.
30. Beckwith, J.B. New developments in the pathology of Wilms tumor. *Cancer Invest* 15 (2): 153-62, 1997.
31. Vuononvirta, R.; Sebire, N.J.; Dallosso, et al. Perilobar nephrogenic rests are nonobligate molecular genetic precursor lesions of insulin-like growth factor-II-associated Wilms tumors. *Clin Cancer Res* 14(23): 7635-44, 2008.
32. Schumacher, V.; Schuhen, S.; Sonner, S.; et al. Two molecular subgroups of Wilms' tumors with or without WT1 mutations. *Clin Cancer Res* 9(6): 2005-14, 2003.
33. Pritchard-Jones, K.; Maschietto, M.; Grundy, P. Chapter 9: biological and prognostic factors in Wilms tumors. In: *Renal Tumors of Childhood*, Pritchard-Jones K, Dome JS (Eds). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 153-166, 2014.
34. Charlton, J.; Pavasovic, V.; Pritchard-Jones, K. Biomarkers to detect Wilms tumors in pediatric patients: where are we now? *Future Oncol*. 11(15): 2221-2234, 2015.
35. Dome, J.S.; Perlman, E.J.; Graf, N. Risk stratification for Wilms tumor: current approach and future directions. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 215–223, 2014.
36. Lopes, R.I.; Lorenzo, A. Recent advances in the management of Wilms' tumor. *F1000Research* 6,670, 2017.
37. Van den Heuvel-Eibrink, M.M.; Hol, J.A.; Pritchard-Jones, K.; et al. Position paper: Rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 protocol. *Nat Rev Urol* 14 (12): 743-752, 2017.
38. D'Angio, G.J.; Breslow, N.; Beckwith, J.B.; et al. Treatment of Wilms' tumor. Results of the Third National Wilms' Tumor Study. *Cancer* 64(2): 349-60, 1989.
39. Jereb, B.; Burgers, J.M.; Tournade, M.F.; et al. Radiotherapy in the SIOP (International Society of Pediatric Oncology) nephroblastoma studies: a review. *Med Pediatr Oncol* 22(4): 221-7, 1994.
40. Green, D.M. The treatment of stages I-IV favorable histology Wilms' tumor. *J Clin Oncol* 22(8): 1366-72, 2004.
41. Graf, N.; Tournade, M.F.; De Kraker, J. The role of preoperative chemotherapy in the management of Wilms' tumor. The SIOP studies. *International Society of Pediatric Oncology. Urol Clin North Am* 27(3): 443-54, 2000.

42. Popov, S.D.; Sebire, N. J.; Vujanic, G.M. Wilms' Tumour – Histology and Differential Diagnosis. In M. M. van den Heuvel-Eibrink (Ed.), *Wilms Tumor*. Codon Publications, 2016.
43. Wang, J.; Li, M.; Tang, D.; et al. Current treatment for Wilms tumor: COG and SIOP standards *World Journal of Pediatric Surgery* 2:e000038, 2019.
44. Irtan, S.; Ehrlich, P.F.; Pritchard-Jones, K. Wilms tumor: “state-of-the-art” update, 2016. *Semin Pediatr Surg* 25:250–256, 2016.
45. Dome, J.S.; Graf, N.; Geller, J.I.; et al. Advances in Wilms Tumor Treatment and Biology: Progress Through International Collaboration. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33(27), 2999-3007, 2015.
46. Pritchard-Jones, K.; Bergeron, C.; de Camargo, B.; van den Heuvel-Eibrink, M.M.; et al. SIOP Renal Tumours Study Group. Omission of doxorubicin from the treatment of stage II-III, intermediate-risk Wilms' tumour (SIOP WT 2001): an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*. Sep 19;386(9999):1156-64, 2015.
47. Chen, X., Pappo, A., Dyer, M. Pediatric solid tumor genomics and developmental plasticity. *Oncogene* 34, 5207–5215, 2015.
48. Dome, J.S.; Huff, V. Wilms Tumor Predisposition. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, eds. *GeneReviews*®. [Internet]. University of Washington, Seattle: Seattle, WA, 2003.
49. Kalish, J.M.; Doros, L.; Helman, L.J.; et al. Surveillance recommendations for children with overgrowth syndromes and predisposition to Wilms tumors and hepatoblastoma. *Clin Cancer Res* 23:e115–122, 2017.
50. Hillen, L.M.; Kamsteeg, E.J.; Schoots, J.; et al. Refining the diagnosis of congenital nephrotic syndrome on long-term stored tissue: c.1097G>A (p.(Arg366His)) WT1 mutation causing Denys Drash syndrome. *Fetal Pediatr Pathol* 35:112–119, 2016.
51. Treger, T.D.; Chowdhury, T.; Pritchard-Jones, K.; et al.: The genetic changes of Wilms tumour. *Nat Rev Nephrol* 15 (4): 240-251, 2019.
52. Scott, R.H.; Murray, A.; Baskcomb, L.; et al. Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget* 3(3): 327-335, 2012.
53. Gadd, S.; Huff, V.; Walz, A.L.; et al. A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. *Nat Genet* 49 (10): 1487-1494, 2017.
54. Mahamdallie S., Yost S., Poyastro-Pearson E., et al. Identification of new Wilms tumour predisposition genes: an exome sequencing study. *Lancet Child Adolesc Health*. May;3(5):322-331, 2019.
55. Höglund, M.; Gisselsson, D.; Hansen, G.B.; et al. Wilms tumors develop through two distinct karyotypic pathways. *Cancer Genet Cytogenet* 150(1): 9-15, 2004.

56. Williams, R.D.; Al-Saadi, R.; Natrajan, R.; et al. Molecular profiling reveals frequent gain of MYCN and anaplasia-specific loss of 4q and 14q in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 50(12): 982-995, 2011.
57. Carraro, D.M., Ramalho, R.F., Maschietto, M. Gene Expression in Wilms Tumor: Disturbance of the Wnt Signaling Pathway and MicroRNA Biogenesis. *Wilms Tumor* 10, 149–162, 2016.
58. Duhme, C.; Busch, M.; Heine, E.; et al. WT1-Mutant Wilms Tumor Progression Is Associated With Diverting Clonal Mutations of CTNNB1. *J Pediatr Hematol Oncol.* Mar 1;43(2):e180-e183; 2021.
59. Virji, M.A.; Mercer, D.W.; Herberman, R.B. Tumor markers in cancer diagnosis and prognosis. *CA Cancer J Clin.* Mar-Apr;38(2):104-26, 1988.
60. Hayes, D.F.; Bast, R.C.; Desch, C.E.; et al: Tumor marker grading system: a frame work to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 88: 1456–1468, 1996.
61. Duffy, M. J. Clinical Uses of Tumor Markers: A Critical Review. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(3), 225–262, 2001.
62. Lahoti, C.; Thorner, P.; Malkin, D.; et al. Immunohistochemical detection of p53 in Wilms' tumors correlates with unfavorable outcome. *Am J Pathol*, 148:1577, 1996.
63. Wen, J.G.; van Steenbrugge, G.J.; Egeler, R.M.; et al: Progress of fundamental research in Wilms' tumor. *Urol Res* 25: 223– 230, 1997.
64. Ghanem, M. A.; van Steenbrugge, G. J.; Nijman, R. J. M.; et al. Prognostic markers in nephroblastoma (Wilms' tumor). *Urology*, 65(6), 1047–1054, 2005.
65. Hing, S.; Lu, Y. J.; Summersgill, B.; et al. Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology Wilms' tumors. *The American journal of pathology*, 158(2), 393–398, 2001.
66. Lu, Y.J.; Hing, S.; Williams, R.; et al. UK Children's Cancer Study Group Wilms' tumor group. Chromosome 1q expression profiling and relapse in Wilms' tumour. *Lancet* Aug 3;360(9330):385-6, 2002.
67. Williams, R.D.; Hing, S.N.; Greer, B.T.; et al. Prognostic classification of relapsing favorable histology Wilms tumor using cDNA microarray expression profiling and support vector machines. *Genes Chromosomes Cancer* Sep;41(1):65-79, 2004.
68. Natrajan, R.; Williams, R.D.; Hing, S.N.; et al. Array CGH profiling of favourable histology Wilms tumours reveals novel gains and losses associated with relapse. *J Pathol.* Sep;210(1):49-58, 2006a.

69. Natrajan, R.; Little, S.E.; Reis-Filho, J.S.; et al. Amplification and Overexpression of CACNA1E Correlates with Relapse in Favorable Histology Wilms' Tumors. *Clin Cancer Res* December 15(12) (24) 7284-7293, 2006b.
70. Perotti, D.; Spreafico, F.; Torri, F.; et al. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica Wilms Tumor Working Group. Genomic profiling by whole-genome single nucleotide polymorphism arrays in Wilms tumor and association with relapse. *Genes Chromosomes Cancer*, Jul;51(7):644-53, 2012.
71. Segers, H.; van den Heuvel-Eibrink, M.M.; Williams, R.D.; et al. Children's Cancer and Leukaemia Group and the UK Cancer Cytogenetics Group. Gain of 1q is a marker of poor prognosis in Wilms' tumors. *Genes Chromosomes Cancer* Nov;52(11):1065-74, 2013.
72. Gratias, E.J.; Jennings, L.J.; Anderson, J.R.; et al. Gain of 1q is associated with inferior event-free and overall survival in patients with favorable histology Wilms tumor: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer*. Nov 1;119(21):3887-94, 2013.
73. Chagtai, T.; Zill, C.; Dainese, L.; et al. Gain of 1q As a Prognostic Biomarker in Wilms Tumors (WTs) Treated With Preoperative Chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) WT 2001 Trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34(26): 3195-203, 2016.
74. Maw, M.A.; Grundy, P.E.; Millow, L.J.; et al. A third Wilms' tumor locus on chromosome 16q. *Cancer Res* 52(11): 3094-3098, 1992.
75. Cavenee, W.K.; Dryja, T.P.; Phillips, R.A., et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305 779–784, 1983.
76. Brown, M.A. Tumor suppressor genes and human cancer. *Adv. Genet.* 36 45–135, 1997.
77. Grundy, P.E.; Telzerow, P.E.; Breslow, N.; et al. Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome. *Cancer Res* 54(9): 2331-2333, 1994.
78. Grundy, P.E.; Breslow, N.E.; Li, S.; et al. Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol.* 23:7312, 2005.
79. Spreafico, F.; Gamba, B.; Mariani, L.; et al. AIEOP Wilms Tumor Working Group. Loss of heterozygosity analysis at different chromosome regions in Wilms tumor confirms 1p allelic loss as a marker of worse prognosis: a study from the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology. *J Urol* 189(1): 260-6, 2013.
80. Messahel, B.; Williams, R.; Ridolfi, A.; et al. Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG). Allele loss at 16q defines poorer prognosis Wilms tumour irrespective of treatment approach in the UKW1-3 clinical trials: a Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG) Study. *Eur J Cancer* 45(5): 819-26, 2009.

81. Fernandez, C.V.; Mullen, E.A.; Chi, Y.Y.; et al. Outcome and Prognostic Factors in Stage III Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the Children's Oncology Group Study AREN0532. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 36(3), 254-261, 2018.
82. Bardeesy, N.; Falkoff, D.; Petruzzi, M.J.; et al. Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nat Genet* 7: 91-97, 1994.
83. Malkin, D.; Sexsmith, E.; Yeger, H.; et al. Mutations of the p53 tumor suppressor gene occur infrequently in Wilms' tumor. *Cancer Res* 54: 2077-2079, 1994.
84. Bardeesy, N.; Beckwith, J.B.; Pelletier, J. Clonal expansion and attenuated apoptosis in Wilms' tumors are associated with p53 gene mutations. *Cancer Res* 55: 215-219, 1995.
85. El Bahtimi, R.; Hazen-Martin, D.J.; Re, G.G.; et al. Immunophenotype, mRNA expression, and gene structure of p53 in Wilms' tumors. *Mod Pathol* 9: 238-244, 1996.
86. D'Angio, G.J. Pre-or post-operative treatment for Wilms tumor? Who, what, when, where, how, why--and which. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 41, n. 6, p. 545- 549, 2003.
87. Maschietto, M.; Williams, R.D.; Chagtai, T.; et al. TP53 mutational status is a potential marker for risk stratification in Wilms tumour with diffuse anaplasia. *PLoS One* 9:e109924, 2014b.
88. Ooms, A. H.; Gadd, S.; Gerhard, D. S.; et al. Significance of TP53 Mutation in Wilms Tumors with Diffuse Anaplasia: A Report from the Children's Oncology Group. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(22), 5582-5591, 2016.
89. Wegert, J.; Vokuhl, C.; Ziegler, B.; et al. TP53 alterations in Wilms tumour represent progression events with strong intratumour heterogeneity that are closely linked but not limited to anaplasia. *The journal of pathology. Clinical research*, 3(4), 234-248, 2017.
90. Rickman, D.S.; Schulte, J.H.; Eilers, M. The expanding world of N-MYC-driven tumors. *Cancer Discov*, 8(2):150-63, 2018.
91. Nisen, P.D.; Zimmerman, K.A.; Cotter, S.V.; et al. *Cancer Res.* 46, 6217-6222, 1986.
92. Norris, M.D.; Brian, M.J.; Vowels, M.R.; et al. N-myc amplification in Wilms' tumor. *Cancer Genet Cytogenet.* 30(1):187-189, 1988.
93. McQuaid, S.; O'Meara, A. N-myc oncogene amplification in paediatric tumours. *Ir J Med Sci.* 159(6):172-174, 1990.
94. Schaub, R.; Burger, A.; Bausch, D.; et al. Array comparative genomic hybridization reveals unbalanced gain of the MYCN region in Wilms tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 172(1):61-65, 2007.

95. Williams, R.D.; Chagtai, T.; Alcaide-German, M.; et al. Multiple mechanisms of MYCN dysregulation in Wilms tumour. *Oncotarget* 6(9): 7232-43, 2015.
96. Jiménez Martín, O.; Schlosser, A.; Furtwängler, R.; et al. MYCN and MAX alterations in Wilms tumor and identification of novel N-MYC interaction partners as biomarker candidates. *Cancer Cell Int* 21, 555, 2021.
97. Wegert, J.; Wittmann, S.; Leuschner, I.; et al. WTX inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. *Genes Chromosomes Cancer* 48(12): 1102-11, 2009.
98. Rivera, M.N.; Kim, W.J.; Wells, J.; et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 315(5812): 642-645, 2007.
99. Ruteshouser, E.C.; Robinson, S.M.; Huff, V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer Jun*;47(6):461-70, 2008.
100. Perotti, D.; Gamba, B.; Sardella, M.; et al. Functional inactivation of the WTX gene is not a frequent event in Wilms' tumors. *Oncogene*. Jul 31;27(33):4625-32, 2008.
101. Hu, J.; Barrett, R.D.H. Epigenetics in natural animal populations. *J Evol Biol*. 30(9):1612– 32, 2017.
102. Maluf, S.W.; Riegel, M. *Citogenética Humana*. Porto Alegre: Artmed. 336 p, 2011.
103. Call, K.M.; Glaser, T.; Ito, C.Y.; et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell.*, 60(3):509–520, 1990.
104. Bonetta, L.; Kuehn, S.E.; Huang, A.; et al. Wilms tumor locus on 11p13 defined by multiple CpG island-associated transcripts. *Science*. 250(4983):994–997, 1990.
105. Gessler, M.; Poustka, A.; Cavenee, W.; et al. Homozygous Deletion in Wilms Tumours of a Zinc-finger Gene Identified by Chromosome Jumping. *Nature* 343 (6260), 774–778. 10.1038/343774a0, 1990.
106. Huff, V. Wilms tumor genetics. *Am J Med Genet* 79(4): 260-7, 1998.
107. Lee, S.B.; Haber, D.A. Wilms Tumor and the WT1 Gene. *Experimental Cell Research*, 264(1), 74–99, 2001.
108. Koufos, A.; Hansen, M.F.; Lampkin, B.C.; et al. Loss of alleles at loci on human chromosome 11 during genesis of Wilms' tumour. *Nature* 309, 170–172. 7, 1984.
109. Orkin, S.H.; Goldman, D. S.; Sallan, S.E. Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilms' tumour. *Nature* 309, 172–174. 8, 1984.

110. Fearon, E.R.; Vogelstein, B.; Feinberg, A. P. Somatic deletion and duplication of genes on chromosome 11 in Wilms' tumours. *Nature* 309, 176–178. 9, 1984.
111. Reeve, A.E.; Housiaux, P.J.; Gardner, R.J.; et al. Loss of a Harvey ras allele in sporadic Wilms' tumour. *Nature* 309, 174–176, 1984.
112. Maschietto, M.; Charlton, J.; Perotti, D.; et al. The IGF signalling pathway in Wilms tumours--a report from the ENCCA Renal Tumours Biology-driven drug development workshop. *Oncotarget*, 5(18): 8014-26, 2014a.
113. Jelicic, P.; Shaw, P. Loss of imprinting and cancer. *J. Pathol.*, 211: 261-268, 2007.
114. Bown, N.; Cotterill, S.J.; Roberts, P.; et al. Cytogenetic abnormalities and clinical outcome in Wilms tumor: A study by the U.K. cancer cytogenetics group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* 38(1): 11-21, 2002.
115. Charlton, J; Pritchard-Jones, K.. WT1 mutation in childhood cancer. The Wilms' tumor (WT1) gene. *Methods Mol. Biol.* 1467, 1-14, 2016.
116. Lovvorn, H.N.; Pierce, J.; Libes, J.; et al. Genetic and chromosomal alterations in Kenyan Wilms Tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 54(11):702-15, 2015.
117. Green, D.M.; Grigoriev, Y.A.; Nan, B.; et al. Congestive heart failure after treatment for Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study group. *J Clin Oncol* 19(7): 1926-34, 2001.
118. Wright, K.D.; Green, D.M.; Daw, N.C. Late effects of treatment for Wilms tumor. *Pediatr Hematol Oncol* 26(6): 407-413, 2009.
119. Breslow, N.E.; Lange, J.M.; Friedman, D.L.; et al. Secondary malignant neoplasms after Wilms tumor: an international collaborative study. *Int J Cancer* 127(3): 657-66, 2010.
120. Termuhlen, A.M.; Tersak, J.M.; Liu, Q.; et al. Twenty-five year follow-up of childhood Wilms tumor: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Pediatr Blood Cancer* 57(7): 1210-6, 2011.
121. Wong, K.F.; Reulen, R.C.; Winter, D.L.; et al. Risk of Adverse Health and Social Outcomes Up to 50 Years After Wilms Tumor: The British Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 34(15): 1772-9, 2016.
122. Schouten, J. P.; McElgunn, C. J.; Waaijer, R.; et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, v.30, p. 57, 2002.
123. Stuppia, L.; Antonucci, I.; Palka, G.; et al. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci*, 13(3):3245-76, 2012.

124. MRC Holland, 2022. Disponível em: <https://support.mrcholland.com/downloads/files/mlpa-general-protocol-one-tube>. Acesso em: maio de 2022.
125. Holland, P.M.; Abramson, R.D.; Watson, R.; et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88(16):7276-80, 1991.
126. Heid, C.A.; Stevens, J.; Livak, K.J.; et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10):986-94, 1996.
127. Thermo Fisher. CopyCaller® Software v2.0 User Guide - Disponível em: CopyCaller® Software User Guide (PN 4400042C) (thermofisher.com). Acessado em: maio de 2022.
128. Dome, J.S.; Fernandez, C.V.; Mullen, E.A.; et al. COG Renal Tumors Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: renal tumors. *Pediatr Blood Cancer* 60(6): 994-1000, 2013.
129. Royer-Pokora, B. Genetics of pediatric renal tumors. *Pediatr Nephrol* 28(1): 13-23, 2013.
130. Scott, R.H.; Walker, L.; Olsen, Ø.E.; et al. Surveillance for Wilms tumor in at-risk children: pragmatic recommendations for best practice. *Arch Dis Child* 91(12):995-9, 2006a.
131. Scott, R.H.; Stiller, C.A.; Walker, L.; et al. Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumor. *J Med Genet* 43(9):705-15, 2006b.
132. Ruas, J.S.; Silva, F.L.T.; Euzébio, M.F.; et al. Somatic Copy Number Alteration in Circulating Tumor DNA for Monitoring of Pediatric Patients with Cancer. *Biomedicines*. Apr 3;11(4):1082, 2023.
133. Gröbner, S.N.; Worst, B.C.; Weischenfeldt, J.; et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*. 2018 Mar 15;555(7696):321-327. doi: 10.1038/nature25480. Epub 2018 Feb 28. Erratum in: *Nature*. Jul;559(7714):E10, 2018.
134. Rahal, Z.; Abdulhai, F.; Kadara, H.; et al. Genomics of adult and pediatric solid tumors. *Am J Cancer Res*. Aug 1;8(8):1356-1386, 2018.
135. Ma, X.; Liu, Y.; Liu, Y.; et al. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature*. Mar 15;555(7696):371-376, 2018.
136. Kattner, P.; Strobel, H.; Khoshnevis, N.; et al. Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. *Cancer Metastasis Rev* 38, 673–682, 2019.
137. Walz, A.L.; Maschietto, M.; Crompton, B.; et al. Tumor biology, biomarkers, and liquid biopsy in pediatric renal tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 70 Suppl 2:e30130, May 2023.

138. Cresswell GD, Apps JR, Chagtai T, Mifsud B, Bentley CC, Maschietto M, Popov SD, Weeks ME, Olsen ØE, Sebire NJ, Pritchard-Jones K, Luscombe NM, Williams RD, Mifsud W. Intra-Tumor Genetic Heterogeneity in Wilms Tumor: Clonal Evolution and Clinical Implications. *EBioMedicine*. Jul;9:120-129, 2016.

139. Groenendijk, A.; Spreafico, F.; de Krijger, R.R.; et al. Prognostic Factors for Wilms Tumor Recurrence: A Review of the Literature. *Cancers (Basel)*. Jun 23;13(13):3142, 2021.

ANEXOS

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AVALIAÇÃO DE CANDIDATOS A BIOMARCADORES MOLECULARES PARA PACIENTES COM TUMOR DE WILMS NO BRASIL**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 28 de fevereiro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 TASSIA OLIVEIRA BIAZON
Data: 28/02/2024 16:26:40-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Tássia Oliveira Biazon**

RG n.º 46.317.746-0

Documento assinado digitalmente
 MARIANA CAMARGO MASCHIETTO
Data: 28/02/2024 17:24:36-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Mariana Camargo Maschietto**

RG n.º 30.569.339-6



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP
PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa:
 Avaliação de alterações moleculares em pacientes com tumor de Wilms

Informações Preliminares

Responsável Principal	
CPF/Documento: 218.636.748-37	Nome: Mariana Maschietto
Telefone: 19999561915	E-mail: marianamasc@gmail.com

Instituição Proponente	
CNPJ: 50.046.887/0001-27	Nome da Instituição: Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr.Domingos A Boldrini

É um estudo internacional? Não

■ **Equipe de Pesquisa**

CPF/Documento	Nome
052.306.328-87	Silvia Regina Brandalise
137.410.968-14	Izilda Aparecida Cardinali
632.725.636-87	Luiz Henrique Pereira
711.727.859-53	Jose Andres Yunes
435.984.058-63	NATALIA PAIVA DO NASCIMENTO
391.106.958-85	TÁSSIA OLIVEIRA BIAZON
360.861.408-71	Ana Luiza Ongaro Seidinger Conte
893.490.915-34	IVA LOUREIRO HOFFMANN

Área de Estudo

Área Temática Especial

Genética Humana:

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

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 2. Ciências Biológicas
- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Ciências Básicas

Título Público da Pesquisa: Avaliação de alterações moleculares em pacientes com tumor de Wilms

Contato Público			
CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
218.636.748-37	Mariana Maschietto	19999561915	marianamasc@gmail.com

Contato Científico: Mariana Maschietto

Data de Submissão do Projeto: 07/08/2019

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1409462.pdf

Versão do Projeto: 1

Desenho de Estudo / Apoio Financeiro



Desenho:

O presente estudo prevê a análise de variáveis moleculares em tumores de Wilms e diagnosticados em pacientes pediátricos. Considera-se que eventos genéticos e epigenéticos aberrantes sejam precoces na tumorigênese e que ocorram em um pool de células progenitoras tumorais (cancer stem cells). Tumores que adquirem plasticidade genética e epigenética em locais distintos da massa tumoral apresentam heterogeneidade intratumoral, fenômeno demonstrado para vários tipos de câncer. Portanto, enquanto essa arquitetura ajustável permite a expressão temporal e regulada de vias de sinalização celular, quando perturbada (durante o desenvolvimento ou somaticamente), podem desempenhar um papel importante na iniciação e progressão do câncer, com efeito semelhante à mutação gênica clássica. Esforços recentes têm se concentrado no uso de biomarcadores para melhorar a estratificação de risco e a introdução de novas terapias que minimizarão a toxicidade e melhorarão os resultados para pacientes com histologia desfavorável e doença recorrente. Por outro lado, a busca por novas terapias é imprescindível tendo em vista a estagnação nas taxas de cura assim como buscar alternativas mais eficientes que diminuam os efeitos tardios das terapias atuais. O foco desse estudo é investigar alterações dos mecanismos epigenéticos e genéticos potencialmente envolvidos na transformação celular e progressão, considerando as características peculiares dos tumores de Wilms. Desta forma, as alterações encontradas poderão ser testadas como biomarcadores potencialmente usados para auxiliar o diagnóstico e estratificação dos pacientes ou como alvos terapêuticos. Para este propósito, metodologias "ômicas" serão utilizadas para avaliar alterações exclusivas dos tumores.

Apoio Financeiro

CNPJ	Nome	E-mail	Telefone	Tipo
43.828.151/0002-26	FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO		1138384047	Institucional Secundário

Palavra Chave

Palavra-chave
tumor de Wilms, metilação de DNA, epigenética, genoma, genética

Detalhamento do Estudo

Resumo:

Os tumores sólidos pediátricos acometem 3% da população mundial e 70% destes pacientes sobrevivem e atingem a fase adulta. O tratamento dos tumores de pior prognóstico é acompanhado de efeitos colaterais danosos e já atingiu os limites de tolerância fazendo-se necessária a busca de terapias alternativas. Por outro lado, estima-se que um a cada 750-1000 adultos sobreviventes de câncer na infância sofrem com os efeitos adversos tardios decorrentes das atuais terapias. A compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos com a progressão dos tumores pediátricos é essencial para auxiliar no diagnóstico, estimar o prognóstico desses pacientes e abrir possibilidades terapêuticas. Esforços recentes têm se concentrado no uso de biomarcadores para melhorar a estratificação de risco e a introdução de novas terapias que minimizarão a toxicidade e melhorarão os resultados para pacientes com histologia desfavorável e doença recorrente. Por outro lado, a busca por novas terapias é imprescindível tendo em vista a estagnação nas taxas de cura assim como buscar alternativas mais eficientes que diminuam os efeitos tardios das terapias atuais. O foco desse estudo é investigar alterações dos mecanismos epigenéticos e genéticos potencialmente envolvidos na transformação celular e progressão, considerando as características peculiares dos tumores de Wilms. Desta forma, as alterações encontradas poderão ser testadas como biomarcadores potencialmente usados para auxiliar o diagnóstico e estratificação dos pacientes ou como alvos terapêuticos. Este estudo requer a integração de diversas áreas e especialidades, desde o uso de dados clínicos, análises histológicas dos tumores, experimentos para caracterização de metilação, sequenciamento, análises de bioinformática, experimentos de PCR em tempo real, entre outras. Como objetivo final, este trabalho pretende identificar biomarcadores para estratificar com precisão pacientes pediátricos portadores de tumor de Wilms, buscando melhorar a classificação de risco, identificar alvos e testar novas terapias.

Introdução:

Os tumores pediátricos são considerados uma doença rara, ainda assim é a primeira causa de morte relacionada a doença em crianças maiores de um ano de idade. Estima-se que, no mundo, cerca de uma a cada 500 crianças serão diagnosticadas com câncer até os 15 anos de idade. Os tipos de câncer que afetam indivíduos menores de 20 anos de idade formam um subgrupo específico com características biológicas, prognósticas e de resposta ao tratamento de longa duração distintas dos tumores de adultos. Estes tumores representam 1% da incidência anual de câncer nos Estados Unidos, aumentando em média 0,5% ao ano [1]. O percentual mediano dos tumores pediátricos observados nos Registros de Câncer de Base Populacional Brasileiros encontra-se próximo de 3%. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para cada ano do biênio 2018-2019 é de 12.500 casos novos de câncer em crianças e adolescentes, dos quais quase 25% resultam em morte, representando 8% das causas de óbito por doença em crianças e adolescentes até 19 anos de idade (<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-infantjuvenil>, 20/Dezembro/2018). Aproximadamente 50% dos cânceres da infância e adolescência são leucemias agudas ou cânceres do sistema nervoso central, o restante está distribuído entre neuroblastoma (6%), tumor de Wilms (5%), linfoma não-Hodgkin (4%), rhabdomyosarcoma infantil (3%), retinoblastoma (3%), osteossarcoma (3%), sarcoma de Ewing (1%), tumores de células germinativas (5%), blastoma pleuropulmonar, hepatoblastoma e carcinoma hepatocelular, entre outros tumores [2]. No Centro Infantil Boldrini, um dos maiores centros de atendimento aos pacientes com tumores pediátricos do Brasil, são atendidos, em média, 256 casos novos por ano, dos quais 35% são leucemias, 14% linfomas, 13% tumores de sistema nervoso central, 8% tumores ósseos, 7% tumores renais, 5% rhabdomyosarcomas, 5% neuroblastoma e outros sarcomas de partes moles e o restante representa até 12% do total (exemplo: hepatoblastoma, tumores de células germinativas, retinoblastoma, melanoma e outros tumores de pele). Estima-se que nos Estados Unidos, um a cada 750 indivíduos seja sobrevivente de algum câncer ocorrido durante a infância ou adolescência [1]. Esta é uma população muito vulnerável e que provavelmente sofrerá efeitos adversos à saúde e com grande impacto na qualidade de vida como consequência do tratamento curativo que receberam no passado, com alta mortalidade decorrente de tumores subsequentes, doenças cardíacas e problemas pulmonares. As crianças com câncer normalmente são tratadas com esquemas que combinam quimioterapia, cirurgia e radioterapia [3], uma abordagem de sucesso que levou às atuais taxas de cura, em torno de 80% (SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2015, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/), mas em países de baixa e média renda, apenas 30% dos pacientes têm uma sobrevida global maior do que cinco anos [4]. Ademais, a morbidade associada ao tratamento tem grande impacto na qualidade de vida para estas crianças, uma vez que os pacientes são expostos a um alto risco de toxicidade a longo prazo e resultando em efeitos colaterais significativos [5]. Para melhorar a sobrevida destas crianças, uma melhor estratificação de risco, baseado na biologia individualizada de cada tumor, se faz necessária para permitir tratamentos adaptados a cada paciente. Dessa forma, torna-se essencial a pesquisa molecular básica e o estudo dos

mecanismos biológicos envolvidos nos diferentes tipos de tumores pediátricos, tanto para o melhor entendimento da progressão tumoral como também para permitir um melhor acompanhamento dos pacientes, e desta forma identificar um tratamento personalizado que seja direcionado e eficiente baseado nas características individuais de cada tumor. Considera-se que eventos genéticos e epigenéticos aberrantes sejam precoces na tumorigênese e que ocorram em um pool de células progenitoras tumorais (cancer stem cells) [6]. Tumores que adquirem plasticidade genética e epigenética em locais distintos da massa tumoral apresentam heterogeneidade intratumoral, [7,8] fenômeno demonstrado para vários tipos de câncer. Portanto, enquanto esta arquitetura ajustável permite a expressão temporal e regulada de vias de sinalização celular, quando perturbada (durante o desenvolvimento ou somaticamente), podem desempenhar um papel importante na iniciação e progressão do câncer, com efeito semelhante à mutação gênica clássica. Diferentes tipos tumorais apresentam uma grande variação genética/epigenética no número e tipo de alterações, incluindo mutações. Tamanho variação pode refletir, principalmente, na ação de agentes mutagênicos, como luz ultravioleta em melanomas e tabaco em câncer de pulmão, ou então processos mutacionais específicos, como tumorigênese mediada por mutações em genes de reparo, como em subtipos de câncer de cólon. Por outro lado, tumores pediátricos carregam um número médio de mutações não-sinônimas que é, em geral, inferior ao de tumores sólidos adultos, com cerca de -9 mutações por tumor [9-11]. O estudo Pan-Cancer avaliou o perfil mutacional (547 amostras por sequenciamento de genoma completo e 414 amostras por sequenciamento de exoma) de 24 tipos de tumores pediátricos em uma coorte de 961 tumores de crianças, adolescentes e jovens adultos. Diferenças marcantes em termos de frequência de mutação e genes significativamente mutados foram identificadas em comparação com cânceres adultos previamente analisados. As frequências de mutação variaram entre os tipos de câncer (0,02 a 0,49 mutações por megabase: Mb) e foram em média 14 vezes menores do que em cânceres adultos. Adicionalmente, tumores recidivantes carregavam número significativamente maior de mutações do que os tumores primários [10]. Tumores com mais de 10 mutações por Mb têm sido referidos como "hipermutados" e estão frequentemente relacionados a deficiências em genes de reparo [12]. Um dos achados mais importantes foi a detecção de alguma alteração com potencial para terapia-alvo em quase 50% das neoplasias pediátricas, o que é altamente relevante para o planejamento de futuros ensaios clínicos. Os dados também indicam que -8% das crianças tem uma mutação germinativa predisponente inequívoca [10]. Um aspecto importante da biologia tumoral recentemente explorado utilizando as tecnologias de sequenciamento é a investigação de DNA tumoral livre circulante (cell-free circulating tumor DNA - ctDNA) no plasma ou soro de pacientes com câncer. A presença de ctDNA está relacionada à liberação na corrente sanguínea de fragmentos de DNA de células que sofreram apoptose ou necrose. A análise de ctDNA permite uma visão da dinâmica tumoral de forma não-invasiva e em tempo real [13], que pode fornecer informações complementares importantes para a escolha e direcionamento de terapias em pacientes com câncer [14,15]. A identificação e genotipagem do ctDNA pode oferecer informações sobre a heterogeneidade intracelular e evolução do câncer, assim como monitorar o paciente e detectar o surgimento de mecanismos de resistência baseado em mutações e alterações epigenéticas. Tumores renais na infância Os tumores renais pediátricos compreendem um espectro de subtipos morfológicos, incluindo tumores de histopatologia benigna. Algumas formas mais raras de câncer renal na infância são: sarcoma renal de células claras, tumor rabdoide renal, neofoma mesoblástico congênito, tumor renal cístico multicelular, carcinoma de células renais e angiomiolipoma [16,17]. O tumor de Wilms (TW) compreende aproximadamente 95% dos cânceres renais diagnosticados em crianças menores de 15 anos de idade, sendo a maior incidência nos primeiros dois anos de vida, seguido por taxas decrescentes com o aumento da idade, com incidências muito baixas entre 10-19 anos de idade [18, 19]. O tratamento do TW é sempre multidisciplinar, com cirurgia, quimioterapia e radioterapia em casos específicos. Atualmente, os fatores prognósticos considerados mais relevantes para a decisão terapêutica são o estadiamento clínico e o tipo histológico (blastematoso, epitelial e estromal). Com os avanços terapêuticos, as taxas de sobrevida global de pacientes com TW podem chegar a 90%. No entanto, a sobrevida global de certos subgrupos de pacientes, como aqueles com histologia desfavorável (ex. anaplasia), doença bilateral e recidiva da doença permanece em torno de 50%. Juntos, estes grupos de maior risco representam cerca de 25% dos pacientes com TW [20]. Pacientes tratados do TW podem apresentar efeitos adversos tardios como doenças cardíacas, hepáticas, complicações durante a gravidez e um risco aumentado de desenvolver neoplasias primárias subsequentes [21]. Sendo assim, o desafio atual, e objetivo deste estudo, é identificar marcadores que permitam reduzir ou intensificar o tratamento, diminuir a morbidade associada a toxicidade da terapia e aumentar as taxas de cura e sobrevida desses pacientes. O sucesso terapêutico do TW se deve aos esforços de grupos cooperativos multidisciplinares como: Renal Tumor Study Group – Société Internationale d’Oncologie Pédiatrique (RTSG-SIOP) e o Children Oncology Group (COG). Embora existam diferenças na abordagem terapêutica, esses grupos conduziram uma série de estudos clínicos e moleculares bem desenhados que geraram grande conhecimento baseado em evidências para estabelecer os melhores tratamentos para crianças com TW. As drogas padrão utilizadas de rotina no tratamento do TW são a vincristina, a actinomicina D e a doxorubicina. Pacientes de alto risco, que apresentam metástase ao diagnóstico ou recidiva tumoral são tratados com ciclofosfamida, carboplatina, etoposídeo e irinotecano, de acordo com o protocolo estabelecido no centro hospitalar [22,23]. Os TWs são encontrados associados a lesões indiferenciadas chamadas restos nefrogênicos (RN) em 40% e 100% dos casos esporádicos e bilaterais, respectivamente [24]. RNs são classificados baseados na localização no rim: RN perilobar (RNPL) são encontrados próximos a periferia do lóbulo renal e associados com TW com predomínio dos componentes blastematoso ou epitelial e perda de imprinting (Loss of imprinting, LOI) de 11p15.5 [25]. RN intralobar (RNIL) é encontrado na medula, como consequência de algum erro precoce durante a nefrogênese e são tipicamente associados com TW com predomínio de componente estromal com diferenciação para elementos mesenquimais e mutação/deleção de WT1 [26]. Desde os primeiros estudos envolvendo alterações genéticas em TWs e outros tumores embrionários, observa-se baixa frequência de mutações somáticas (cerca de 30 genes), que são detectadas somente em 30% dos casos. Destas mutações, os genes mais frequentemente alterados incluem WT1, CTNNB1, AMER1 (WTX), DROSHA, DGCR8, XPO5, DICER1, SIX1, SIX2, MLLT1, MYCN e TP53 [27,28]. Ganhos e perdas cromossômicas, bem como perda de heterozigotidade (Loss of Heterozygosity, LOH) são comumente vistos em TWs, como ganhos de cromossomos 1q, 2, 7q, 8, 12 e 13 e perdas de cromossomos 1p, 7p, 16q e 22q [29,30]. Alterações no número de cópias e perfis de expressão gênica foram associados à recidiva, como em 2p (ganho no número de cópias) e 11p15 e 11p13 (perda de heterozigotidade). O ganho do número de cópias em 1q também foi associado a comportamento biológico adverso em TWs [31], sendo que o ganho do cromossomo 1q é uma das anormalidades citogenéticas mais comuns no TW [32]. A LOH em 1p ou 16q mostrou tendências para aumento dos riscos de recidiva ou morte, sendo que a LOH em 1p e 16q na histologia favorável tem sido associada à doença resistente ao tratamento [20,33,34]. Em tumores sem quimioterapia neoadjuvante, a LOH de 1p e 16q combinada é associada ao pior prognóstico; e em tumores tratados ou não com quimioterapia, o ganho de 1q foi associado com recidiva tumoral [31,35]. Outras alterações cromossômicas comuns em TW ocorrem em 17p (perda do número de cópias; afetando TP53), associadas à histologia anaplásica [36]. O ganho do número de cópias em MYCN foi observado em aproximadamente 13% dos casos de TW, sendo mais comum em casos anaplásicos (7 de 23 casos, 30%) [37]. Aproximadamente 70% dos TWs têm alterações no locus 11p15 [27]. Outras alterações epigenéticas incluem metilação do DNA, maquinaria de biossíntese de miRNAs e modificações de histonas, sendo todos esses, processos que quando desregulados podem contribuir para o desenvolvimento e progressão de uma série de tumores sólidos pediátricos, incluindo os TWs [38,39]. A associação entre metilação do DNA de dinucleotídeos CpGs e câncer já é bem estabelecida. De forma geral, tumores apresentam hipometilação global do DNA em comparação aos tecidos adjacentes normais. Alterações de metilação do DNA gene-específica em TW foram descritas em regiões promotoras e enhancer de WT1 e SIX2, indicando que este mecanismo poderia ser um dos responsáveis pela modulação da expressão destes genes [40,41]. A hipermetilação de ilhas CpGs próximas a regiões 5' dos genes RASSF1A, TNFRSF12, MCJ e CALCA, bem como um perfil de hipometilação global também foram observados em TWs comparativamente ao tecido normal adjacente [42]. A importância da hipometilação global do DNA no câncer é evidenciada pela sua ocorrência generalizada e pelos achados de que esse padrão está muitas vezes significativamente associado a uma maior agressividade de alguns tipos de câncer e diminuição da sobrevida dos pacientes. [42-44].

Hipótese:

Data de Submissão do Projeto: 07/08/2019

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1409462.pdf

Versão do Projeto: 1

O desenvolvimento e aplicação de novos ensaios em tumores pediátricos é necessário principalmente para melhorar a estratificação de risco, direcionando ou modificando os tratamentos específicos para cada paciente. Por um lado, existem os esforços para desescalonar as terapias (a intensidade e a quantidade de drogas), mantendo altas taxas de cura, porém reduzindo a toxicidade do tratamento. Os avanços na tecnologia de genética molecular, a possibilidade de estudar o genoma, transcriptoma e o metiloma em larga escala impulsionaram a pesquisa relacionada às causas e processos carcinogênicos. Estes estudos são essenciais para possibilitar a detecção de genes de predisposição, suscetibilidade a doenças complexas assim como sua evolução e resposta a tratamento. Estes estudos também exploram potenciais biomarcadores e alternativas de tratamento. A busca e a identificação de um biomarcador não (ou menos) invasivo que possa ser avaliado em sangue periférico para ser usado tanto no diagnóstico diferencial desses tumores (antes da intervenção cirúrgica) como para o seguimento de resposta do tumor ao tratamento tem grandes implicações para o paciente e para seu prognóstico. Ensaio clínico sucessivos realizados pelo COG, pela Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (SIOP) e outros grupos têm resultado em uma sobrevida global superior a 90% para pacientes com TW. Contudo, a sobrevida para certos subgrupos (como aqueles com características histológicas e moleculares desfavoráveis, doença bilateral e doença recorrente) permanece em torno de 50%. Assim, novas abordagens são necessárias para melhorar o resultado desses subgrupos, especialmente em casos de recorrência, onde apenas aproximadamente 50% sobreviverão [45,46]. Um importante primeiro passo para o desenho de protocolos de tratamento baseados nesses marcadores consiste na validação de biomarcadores candidatos em pacientes da nossa população. Por esta razão, a hipótese dos pesquisadores é de que os resultados do presente projeto servirão de subsídio para apoiar a utilização de biomarcadores auxiliares no diagnóstico e prognóstico dos TWs, bem como na estratificação de risco, monitoramento da terapia e recaída da doença. Para isso, os esforços desta pesquisa se concentrarão em avaliar retrospectivamente os candidatos a biomarcadores 1p, 1q, 16q, 17p, MYCN e AMER1 em pacientes com TW tratados no Centro Infantil Boldrini em Campinas, São Paulo. Este projeto será desenvolvido em um ambiente hospitalar infantil que está associado com uma infraestrutura laboratorial e amplo acesso às tecnologias avançadas propostas nesse estudo. Contando com uma equipe multidisciplinar e o acesso às amostras dos pacientes, esta proposta traz um aspecto inovador no contexto mundial pelo fato de podermos acompanhar os níveis de DNA circulante durante o tratamento do paciente (para detecção de recaída tumoral) permitindo, se validado, a intervenção em um momento mais precoce da doença. Este projeto tem potencial de impactar a qualidade de vida de sobreviventes destes tumores e modificar o cenário de políticas públicas no tratamento atual da doença, além da oportunidade única de treinar e formar uma nova geração de cientistas e clínicos capacitados.

Objetivo Primário:

Caracterizar alterações moleculares genéticas e/ou epigenéticas para identificar e validar potenciais biomarcadores em tumores de Wilms que possam ser utilizados para estratificação de risco e/ou alvo terapêutico. Desenvolver um modelo animal para estudos pré-clínicos para testes de drogas como terapias alternativas de tumores de Wilms.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar, retrospectivamente, os candidatos a biomarcadores 1p, 1q, 16q, 17p, MYCN, AMER1 em material parafinado de pacientes com tumores de Wilms tratados no Centro Infantil Boldrini. 2. Avaliar os mesmos marcadores em amostras congeladas de pacientes com tumores de Wilms que estejam em acompanhamento no hospital. 3. Para os pacientes que apresentarem alterações de 1q e 17p, avaliar estas alterações em sangue periférico (amostras seriadas) para acompanhamento ao longo do tratamento. 4. Coletar as informações clínicas e patológicas relevantes para o estudo para correlacionar com os achados moleculares. 5. Caracterizar alterações genéticas e de níveis de expressão gênica associadas com os mecanismos epigenéticos alterados.

Metodologia Proposta:

Experimentos em material parafinado: avaliação de número de cópias de regiões cromossômicas e imuno-histoquímica. Experimentos em material congelado: validação dos achados em material parafinado e para técnicas que não funcionaram em material parafinado, determinação da expressão de genes específicos (qRT-PCR), relacionados com os mecanismos epigenéticos. Experimentos em material fresco: implante em modelo animal para teste de drogas.

Critério de Inclusão:

Serão incluídos no estudo pacientes com idade inferior a 18 anos, com diagnóstico histopatológico de tumor de Wilms, realizado consecutivamente entre os anos 2000 e 2018. Os critérios para exclusão do estudo consistem na ausência de material biológico para análise, material com qualidade insatisfatória para análise e não consentimento do paciente ou responsável para participação no estudo.

Alterações em 1p, 1q, 16q, 17p, MYCN, AMER1 serão avaliadas em amostras de parafina de tumor de Wilms após avaliação do patologista para seleção de área viável. Inicialmente a possibilidade de usar material parafinado será avaliada, se não for possível devido às limitações técnicas, as amostras congeladas dos respectivos casos serão incluídas no projeto. O Centro Infantil Boldrini recebe, em média, 17 casos de tumores renais por ano, dos quais 90% são tumores de Wilms.

Preliminarmente, conforme informações concedidas pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital Infantil Boldrini, foram registrados 172 pacientes portadores de TW no período de 2005 a 2018 no Hospital, sendo 89 femininos e 83 masculinos. Usando dados de literatura, estima-se que 25% dos pacientes recaíram ou a doença progrediu durante o tratamento, dos quais 50% foram a óbito. Portanto, acreditamos que a maioria dos casos continua com situação ativa junto ao Hospital. É pertinente ressaltar que para ter acesso aos prontuários dos pacientes, é necessária a aprovação do projeto pelo CEP.

Os pacientes que atenderem aos critérios de inclusão e estiverem em tratamento ou em acompanhamento clínico após o término da terapia serão convidados a participar deste projeto de pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, em anexo a este projeto). Nesta ocasião, o pesquisador principal ou um pesquisador associado, junto ao médico responsável pela criança, explicitará a natureza da pesquisa, bem como seus objetivos, riscos e benefícios. Após o entendimento do sujeito da pesquisa ou seu responsável legal, será obtido o consentimento para utilização de amostra tumoral previamente ressecada com fins terapêuticos ou diagnósticos. Não será realizado nenhum procedimento adicional para retirada de material biológico exclusivo para utilização nesta pesquisa, portanto não estão previstos riscos e desconfortos físicos aos pacientes. Cabe ressaltar que o material biológico só será utilizado para os fins do estudo desde que não prejudique o diagnóstico do paciente. Nos casos em que o paciente tiver entre 06 e 17 anos de idade será aplicado também um termo de assentimento (TA, em anexo a este projeto), com linguagem compatível para melhor compreensão da pesquisa, sem prejuízo do consentimento de seus responsáveis legais.

Riscos:

Não estão previstos riscos e desconfortos aos pacientes que consentirem na participação desta pesquisa pois não será realizado nenhum procedimento adicional para retirada de material biológico exclusivo para utilização nesta pesquisa. O material a ser utilizado no estudo é parte daquele que fora previamente retirado em cirurgia com fins diagnósticos e/ou terapêuticos. Cabe ressaltar que será utilizado somente o material excedente, não utilizado para o diagnóstico. Porém, qualquer risco eventual que aconteça no futuro em decorrência desta pesquisa, seja ele físico, psíquico, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual será imediatamente considerado pelos pesquisadores e comunicado ao Comitê de Ética em Pesquisa para que seja avaliada a necessidade de modificar ou suspender o estudo.

Benefícios:

É importante esclarecer que não haverá benefícios terapêuticos imediatos para os participantes desta pesquisa. Estudos científicos

baseiam-se na análise de grande número de amostras, sendo impossível estimar o benefício individual de cada paciente incluído no estudo. Pode ser que os resultados deste estudo tragam um benefício para uma parcela de pacientes no futuro. Estes resultados podem levar muitos anos para serem alcançados, por isso qualquer benefício proveniente desse estudo, caso haja, será apenas em longo prazo. A expectativa é que os resultados deste estudo possam beneficiar pacientes com câncer somente em protocolos terapêuticos futuros.

Metodologia de Análise de Dados:

As análises dependem dos experimentos aplicados. Está prevista uma avaliação intermediária durante a execução deste estudo, quando for alcançada metade do número previsto de pacientes analisados. Isto será feito para identificar se algum método empregado apresenta resultados insatisfatórios no que diz respeito à reprodutibilidade de resultados. Caso seja identificada esta situação, o método será modificado e, em último caso, será suspenso para evitar o gasto desnecessário de material biológico e reagentes. Alterações de número de cópias e de expressão gênica serão comparados entre as amostras tumorais e não tumorais, retiradas no processo cirúrgico, sem nenhuma intervenção adicional. Os experimentos deverão ser feitos em triplicata para permitir as comparações.

Desfecho Primário:

Padronização de ensaios de baixo/médio custo como uma adição aos atuais fatores de estratificação dos pacientes com tumores de Wilms.

Desfecho Secundário:

Validação de biomarcadores para estratificação de pacientes com tumores de Wilms. Teste de drogas em linhagens celulares e modelos xenograftos de tumores de Wilms. Também se espera identificar com precisão os indivíduos candidatos a novas terapias, cujos tumores apresentem-se refratários aos tratamentos atuais.

Tamanho da Amostra no Brasil: 172

Países de Recrutamento		
País de Origem do Estudo	País	Nº de participantes da pesquisa
Sim	BRASIL	172

Outras Informações

Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)?

Sim

Detalhamento:

Os dados clínico-patológicos serão comparados entre as alterações moleculares identificadas pelo estudo para validação de sua aplicabilidade.

Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa:

0

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro

ID Grupo	Nº de Indivíduos	Intervenções a serem realizadas
Pacientes com tumor de Wilms	0	nenhuma

O Estudo é Multicêntrico no Brasil?

Não

Propõe dispensa do TCLE?

Sim

Justificativa:

Aos pacientes que foram à óbito será solicitada ao Comitê de Ética em Pesquisa a dispensa da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A justificativa para esta solicitação baseia-se no potencial sofrimento dos familiares ao falarem a respeito do seu ente querido e sua doença. Também será solicitada dispensa de assinatura do TCLE para aqueles pacientes que não estão mais em acompanhamento de rotina no hospital, devido à não-atualização de seus endereços e telefones de contato. Também será solicitada dispensa de assinatura do TCLE para aqueles pacientes que, ao assinar o TCLE do Biobanco (CAAE 25574714.9.0000.5376, Biobanco do Centro Infantil Boldrini, Termo de consentimento: "Biobanco - TCLE.pdf") optaram por "Dispensa novo consentimento para as pesquisas com o material biológico e seus derivados, armazenados".

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Sim

Justificativa:

As amostras de ácidos nucleicos obtidas neste estudo constituem material de grande valor para pesquisas futuras. Por se tratar de um grupo amostral de pacientes pediátricos tratados e acompanhados em uma mesma instituição, muitos estudos futuros podem gerar dados importantes para a melhoria do entendimento da doença. Para evitar nova coleta ou redivisão de material nobre (tecido tumoral) no futuro, pretende-se armazenar o material excedente, não utilizado nesta pesquisa, em biorepositório específico, mediante autorização do paciente ou seu responsável legal. Os ácidos nucleicos serão armazenados em freezer -20°C em caso de DNA e freezer -70°C em caso de RNA. O armazenamento do material obedecerá às diretrizes da Resolução no 347, de 13 de Janeiro de 2005 e toda nova pesquisa a ser feita com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP.

Cronograma de Execução

Identificação da Etapa	Início (DD/MM/AAAA)	Término (DD/MM/AAAA)
Submissão do trabalho	01/12/2020	01/12/2022

Data de Submissão do Projeto: 07/08/2019

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1409462.pdf

Versão do Projeto: 1

Selecionar casuística de pacientes portadores de tumor de Wilms	15/08/2019	31/12/2019
Levantamento bibliográfico	15/08/2019	31/12/2022
Avaliar os candidatos a biomarcadores: 17p, MYCN, AMER1	01/04/2020	01/11/2020
Comparação dos achados	01/02/2020	30/06/2020
Organizar as informações clínicas e patológicas relevantes para o estudo para correlacionar com os achados moleculares	15/08/2019	31/12/2019
Selecionar área viável tumoral e extração de material nucleico	01/06/2020	01/12/2022

Orçamento Financeiro

Identificação de Orçamento	Tipo	Valor em Reais (R\$)
Plásticos (tubos, ponteiros, placa de cultura etc)	Custeio	R\$ 7.000,00
Sondas para amplificação	Custeio	R\$ 10.700,00
Oligonucleotídeos	Custeio	R\$ 2.600,00
Kits de quantificação	Custeio	R\$ 3.700,00
Material de biologia molecular (dNTP, oligodT, TBE, PBS, Tampão, sais)	Custeio	R\$ 5.000,00
MasterMix Qpcr	Custeio	R\$ 7.800,00
Kits pipetas	Custeio	R\$ 13.000,00
Enzimas para PCR e RT-PCR	Custeio	R\$ 8.000,00
Kits extração DNA (250)	Custeio	R\$ 5.100,00
Total em R\$		R\$ 62.900,00

Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador:

Este projeto conta com os recursos necessários para a sua execução concedidos pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no valor de R\$ 110.000,00 remanescentes de projeto relacionado (FAPESP 2014/10.250-7, em anexo a este projeto, segue o Termo de Outorga do referido projeto FAPESP).

Bibliografia:

[1] Smith MA, Seibel NL, Altekruse SF, Ries LAG, Melbert DL, O'Leary M, et al. Outcomes for Children and Adolescents With Cancer: Challenges for the Twenty-First Century. *J Clin Oncol* 2010;28:2625–34. doi:10.1200/JCO.2009.27.0421. [2] Robison LL, Hudson MM. Survivors of childhood and adolescent cancer: life-long risks and responsibilities. *Nat Rev Cancer* 2014;14:61–70. doi:10.1038/nrc3634. [3] Green DM, Kun LE, Matthay KK, Meadows AT, Meyer WH, Meyers PA, et al. Relevance of historical therapeutic approaches to the contemporary treatment of pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:1083–94. doi:10.1002/pbc.24487. [4] Lam CG, Howard SC, Bouffet E, Pritchard-Jones K. Science. 2019 Mar 15;363(6432):1182–1186. doi: 10.1126/science.aaw4892. Review. [5] Bhakta N, Liu Q, Ness KK, Baassiri M, Eissa H, Yeo F, et al. The cumulative burden of surviving childhood cancer: an initial report from the St Jude Lifetime Cohort Study (SJLIFE). *Lancet (London, England)* 2017;390:2569–82. doi:10.1016/S0140-6736(17)31610-0. [6] Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006;7:21–33. doi:10.1038/nrg1748. [7] Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004;4:143–53. doi:10.1038/nrc1279. [8] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–92. doi:10.1056/NEJMoa1113205. [9] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science (80-)* 2013;339:1546–58. doi:10.1126/science.1235122. [10] Gröbner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, Buchhalter I, Kleinheinz K, Rudneva VA, et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* 2018;555:321–7. doi:10.1038/nature25480. [11] Ma X, Liu Y, Liu Y, Alexandrov LB, Edmonson MN, Gawad C, et al. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature* 2018;555:371–6. doi:10.1038/nature25795. [12] Campbell BB, Light N, Fabrizio D, Zatzman M, Fuligni F, de Borja R, et al. Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer. *Cell* 2017;171:1042–1056.e10. doi:10.1016/j.cell.2017.09.048. [13] Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014;32:579–86. doi:10.1200/JCO.2012.45.2011. [14] Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 2013;368:1199–209. doi:10.1056/NEJMoa1213261. [15] Heitzer E, Auer M, Gasch C, Pichler M, Ulz P, Hoffmann EM, et al. Complex Tumor Genomes Inferred from Single Circulating Tumor Cells by Array-CGH and Next-Generation Sequencing. *Cancer Res* 2013;73:2965–75. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4140. [16] Geller E, Smergel EM, Lowry PA. Renal neoplasms of childhood. *Radiol Clin North Am* 1997;35:1391–413. [17] Charles AK, Vujani GM, Berry PJ. Renal tumours of childhood. *Histopathology* 1998;32:293–309. [18] Ries, L.A.G.; et al. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995. National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD, 1999. [19] Heck JE, He D, Janzen C, Federman N, Olsen J, Ritz B, Hansen J. Fetal programming and Wilms tumor. *Pediatr Blood Cancer*. 2019 Jan;66(1):e27461. doi:10.1002/pbc.27461. [20] Dome JS, Fernandez C V, Mullen EA, Kalapurakal JA, Geller JI, Huff V, et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: renal tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:994–1000. doi:10.1002/pbc.24419. [21] Wong K-F; Reulen R; Winter D; Guha J; Fidler M; Kelly J; et al. Risk of Adverse Health and Social Outcomes Up to 50 Years After Wilms Tumor: The British Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 2016;34:1772. doi:10.1200/JCO.2015.64.4344. [22] van den Heuvel-Eibrink MM, Hol JA, Pritchard-Jones K, van Tinteren H, Furtwängler R, Verschuur AC, et al. Position paper: Rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 protocol. *Nat Rev Urol* 2017;14:743–52. doi:10.1038/nrurol.2017.163. [23] Phelps H, Kaviary S, Borinstein S, Lovvorn H. Biological Drivers of Wilms Tumor Prognosis and Treatment. *Children* 2018;5:145. doi:10.3390/children5110145. [24] Beckwith J.B.; Kiviat, N.B.; Bonadio, J.F. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatr Pathol* 10(1-2): 1-36, 1990. [25] Vuononvirta R, Sebire NJ, Dalosso AR, Reis-Filho JS, Williams RD, Mackay A, et al. Perilobar Nephrogenic Rests Are Nonobligate Molecular Genetic Precursor Lesions of Insulin-Like Growth Factor-II-Associated Wilms Tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14:7635–44. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1620. [26] Schumacher V, Schuhen S, Sonner S, Weirich

Data de Submissão do Projeto: 07/08/2019

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1409462.pdf

Versão do Projeto: 1

A, Leuschner I, Harms D, et al. Two molecular subgroups of Wilms' tumors with or without WT1 mutations. *Clin Cancer Res* 2003;9:2005-14. [27] Scott RH, Murray A, Baskomb L, Turnbull C, Loveday C, Al-Saadi R, et al. Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget* 2012;3. doi:10.18632/oncotarget.468. [28] Gaddi S, Huff V, Huang C-C, Ruteshouser EC, Dome JS, Grundy PE, et al. Clinically relevant subsets identified by gene expression patterns support a revised oncogenic model of Wilms tumor: a Children's Oncology Group Study. *Neoplasia* 2012;14:742-56. [29] Williams RD, Alizadeh AA, Vatsis K, et al. Integrative genomics reveals frequent gain of MYCN and anaplasia-specific loss of 4q and 14q in Wilms tumors. *Cancer Chromosome Instability* 2011;50:982-95. doi:10.1002/gcc.20907. [30] Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, et al. Wilms tumors develop through two distinct karyotypic pathways. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;150:9-15. doi:10.1016/j.cancergencyto.2003.08.017. [31] Gratias EJ, Jennings LJ, Anderson JR, Dome JS, Grundy P, Perlman EJ. Gain of 1q is associated with inferior event-free and overall survival in patients with favorable histology Wilms tumor: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer* 2013;119:3887-94. doi:10.1002/cncr.28239. [32] Gratias EJ, Dome JS, Jennings LJ, Chi Y-Y, Tian J, Anderson J, et al. Association of Chromosome 1q Gain With Inferior Survival in Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2016;34:3189-94. doi:10.1200/JCO.2015.66.1140. [33] Grundy PE, Telzerow PE, Breslow N, Moksness J, Huff V, Paterson MC. Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome. *Cancer Res* 1994;54:2331-3. [34] Grundy PE, Breslow NE, Li S, Perlman E, Beckwith JB, Ritchey ML, et al. Loss of Heterozygosity for Chromosomes 1p and 16q Is an Adverse Prognostic Factor in Favorable-Histology Wilms Tumors: A Report From the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol* 2005;23:7312-21. doi:10.1200/JCO.2005.01.2799. [35] Chaghtai T, Zill C, Dainese L, Wegert J, Savola S, Popov S, et al. Gain of 1q As a Prognostic Biomarker in Wilms Tumors (WTs) Treated With Preoperative Chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) WT 2001 Trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study. *J Clin Oncol* 2016;34:3195-203. doi:10.1200/JCO.2015.66.0001. [36] Bardeesy N, Falkoff D, Petruzzi MJ, Nowak N, Zabel B, et al. (1994) Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nat Genet* 7: 91-97. DOI: 10.1038/ng0594-91. [37] Williams RD, Chaghtai T, Alcaide-German M, Apps J, Wegert J, Popov S, et al. Multiple mechanisms of MYCN dysregulation in Wilms tumour. *Oncotarget* 2015;6:7232-43. doi:10.18632/oncotarget.3377. [38] Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 2011;11:726-34. doi:10.1038/nrc3130. [39] Lawlor ER, Thiele CJ. Epigenetic Changes in Pediatric Solid Tumors: Promising New Targets. *Clin Cancer Res* 2012;18:2768-79. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1921. [40] Mares J, Kriz V, Weinhäusel A, Vodicková S, Kodet R, Haas OA, et al. Methylation changes in promoter and enhancer regions of the WT1 gene in Wilms' tumours. *Cancer Lett* 2001;166:165-71. [41] Metsuyanin S, Podeshakked N, Schmidt-Ott KM, Keshet G, Rechavi G, Blumental D, et al. Accumulation of Malignant Renal Stem Cells Is Associated with Epigenetic Changes in Normal Renal Progenitor Genes. *Stem Cells* 2008;26:1808-17. doi:10.1634/stemcells.2007-0322. [42] Ehrlich M, Jiang G, Fiala E, Dome JS, Yu MC, Long TL, et al. Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. *Oncogene* 2002;21:6694-702. doi:10.1038/sj.onc.1205890. [43] Itano O, Ueda M, Kikuchi K, Hashimoto O, Hayatsu S, Kawaguchi M, et al. Correlation of postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma with demethylation of repetitive sequences. *Oncogene* 2002;21:789-97. doi:10.1038/sj.onc.1205124. [44] Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Müller HM, Fiegl H, Goebel G, et al. DNA Hypomethylation and Ovarian Cancer Biology. *Cancer Res* 2004;64:4472-80. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0238. [45] Pritchard-Jones K, Sullivan R. Children with cancer: driving the global agenda. *Lancet Oncol* 2013;14:189-91. doi:10.1016/S1470-2045(13)70043-3. [46] Kalapurakal JA, Nan B, Norkoool P, Coppes M, Perlman E, Beckwith B, et al. Treatment outcomes in adults with favorable histologic type Wilms tumor—an update from the National Wilms Tumor Study Group. *Int J Radiat Oncol* 2004;60:1379-84. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.05.057. [47] Maschietto, M.; Williams, R.D.; Chaghtai, T.; Popov, S.D.; Sebire, N.J.; Vujanic, G.; Perlman, E.; Anderson, J.R.; Grundy, P.; Dome, J.S.; Pritchard-Jones, K. TP53 mutational status is a potential marker for risk stratification in Wilms tumour with diffuse anaplasia. *PLoS One* 9:e109924, 2014. [48] Bardeesy, N.; Falkoff, D.; Petruzzi, M.J.; Nowak, N.; Zabel, B.; Adam, M.; Aguiar, M.C.; Grundy, P.; Shows, T.; Pelletier, J. Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nat Genet* 7(1): 91-7, 1994. [49] D'Angio, G.J. Pre- or post-operative treatment for Wilms tumor? Who, what, when, where, how, why—and which. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 41, n. 6, p. 545- 549, 2003. [50] Wegert, J.; Wittmann, S.; Leuschner, I.; Geissinger, E.; Graf, N.; Gessler, M. WT1 inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. *Genes Chromosomes Cancer* 48(12): 1102-11, 2009.

Upload de Documentos

Arquivo Anexos:

Tipo	Arquivo
Outros	Termo_de_Responsabilidade_e_Comprometimento.docx
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_12_a_17_anos.docx
Orçamento	Termo_de_Outorga_Projeto_Fapesp.pdf
Outros	Formulario.docx
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsavel_Legal.docx
Outros	Biobanco_CEP.pdf
Outros	Biobanco_CONEP.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_6_a_11_anos.docx
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_12_a_17_anos.docx
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_18_anos_ou_mais.docx
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_DO_TCLE.docx
Outros	Formulario.docx
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_6_a_11_anos.docx
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Formulario.docx

Data de Submissão do Projeto: 07/08/2019

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1409462.pdf

Versão do Projeto: 1

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Tumor_de_Wilms.docx
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_DO_TCLE.docx
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	
Outros	Biobanco_TCLE.pdf
Outros	Biobanco_CEP.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_18_anos_ou_mais.docx
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsavel_Legal.docx

Finalizar

Manter sigilo da integra do projeto de pesquisa: Sim

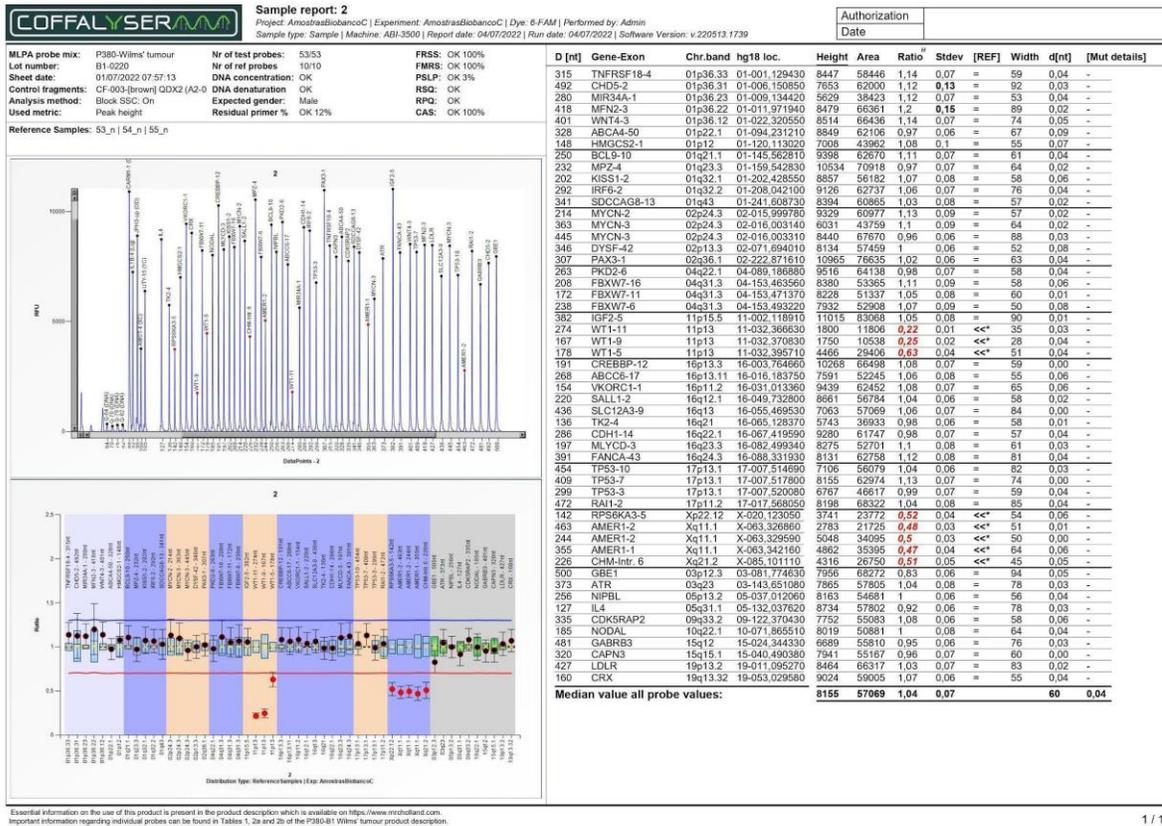
Prazo: Até a publicação dos resultados

Tabela 9 - Quantificação de DNA das amostras tumorais congeladas.

Amostra	Qubit (ng/ul)	Biodrop (A260/280)
247/17	156,0	1.835
269/17	51,3	1.857
322/17	165,0	1.854
328/17	453,0	1.798
517/18	140,0	1.821
047/20 H	225,0	1.844
249/20	740,0	1.783
348/20 T1	76,9	1.827
242/19	194,0	1.836
082/19	114,0	1.675
348/20 T2	162,0	1.717
202/18	257,0	1.842
045/19	474,0	1.825
484/19	116,0	1.825
348/20 T3	146,0	1.830
064/20 H	48,4	1.556
396/10	176,0	1.820
773/09	160,0	1.869
137/19	234,0	1.861
694/09	510,0	1.872
171/05	72,8	1.860
013/05	62,7	1.862
279/14	47,8	1.844
218/05	81,9	1.743
540/09	377,0	1.797
037/06	710,0	1.866
248/05	146,0	1.730
757/06	25,6	1.727
434/07	840,0	1.850
831/09	159,0	1.750
239/11	37,3	1.833
214/17	189,0	1.839
583/17	250,0	1.854
433/18	284,0	1.814

562/18	94,3	1.800
512/19	197,0	1.843
554/19	92,4	1.836
427/06	320,0	1.851
523/06	154,0	1.868
742/07	386,0	1.862
105/09	620,0	1.847
488/09 A	97,2	1.837
488/09 B	109,0	1.822
154/11	388,0	1.836
546/05	860,0	1.855
119/18	75,6	1.858
208/18	387,0	1.852
422/18	90,8	1.812
541/19	364,0	1.854

Quadro 6 - Painéis de MLPA de todos os pacientes analisados.



257/17

2

Analisada



Sample report: 3

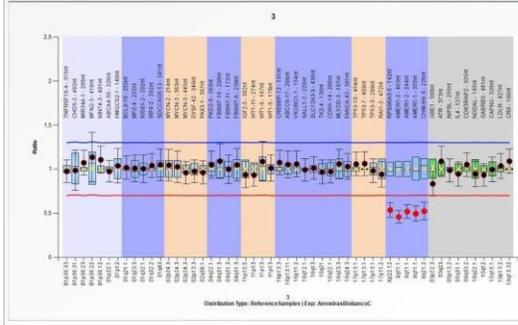
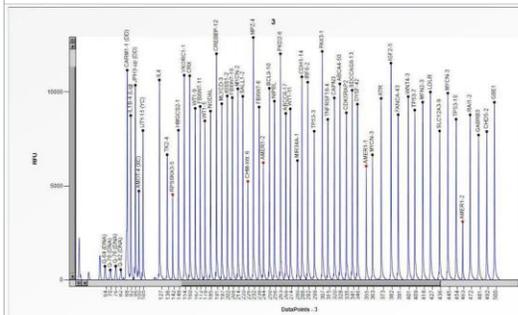
Project: AmnstrauBibancoC | Experiment: AmnstrauBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilm's tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC, On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 13%

FRS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 5%
 RSO: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	8544	61327	0.98	0.06	=	72	0.04	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	7896	67982	0.98	0.11	=	85	0.02	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6352	45529	1.07	0.07	=	51	0.02	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	9459	76721	1.14	0.14	=	76	0.04	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	9756	78269	1.11	0.08	=	73	0.04	-
328	ABCA4-50	01p22.1	01-094.231210	10432	75793	0.97	0.06	=	68	0.06	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	7867	51327	1.04	0.1	=	55	0.02	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	10201	70511	1.02	0.07	=	58	0.03	-
233	MZF4	01q23.3	01-159.542830	12905	90950	1.01	0.08	=	67	0.03	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	9790	63449	1	0.08	=	60	0.00	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	10523	77548	1.04	0.07	=	69	0.05	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	10095	74263	1.05	0.09	=	63	0.06	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	10173	69539	1.04	0.09	=	59	0.03	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	6655	51250	1.03	0.09	=	77	0.00	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	9938	84548	0.96	0.07	=	97	0.04	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	9352	68195	0.98	0.06	=	58	0.08	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	12161	89130	0.96	0.06	=	60	0.02	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	12035	84818	1.05	0.08	=	58	0.02	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	9701	64254	1.09	0.1	=	58	0.03	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	9230	60099	1	0.08	=	46	0.07	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	9201	61312	1.05	0.09	=	50	0.02	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	11536	90459	0.94	0.07	=	91	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	9103	64965	0.93	0.06	=	58	0.00	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	9129	59763	1.09	0.11	=	52	0.06	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	8465	56005	1.01	0.07	=	51	0.00	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	12037	81522	1.08	0.07	=	59	0.04	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	8864	64033	1.05	0.08	=	58	0.04	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	10893	75331	1.06	0.07	=	63	0.05	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	9771	66307	0.99	0.06	=	59	0.04	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	7926	67342	1.01	0.06	=	95	0.01	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	6662	45631	0.97	0.07	=	66	0.01	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	10809	77579	0.97	0.07	=	67	0.00	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	9376	62218	1.06	0.08	=	61	0.02	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	8796	71350	1.03	0.07	=	83	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	8551	72166	1.06	0.07	=	88	0.06	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	9038	75270	1.06	0.07	=	77	0.06	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	7913	57120	0.98	0.07	=	67	0.08	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017.568050	8786	76779	0.94	0.07	=	89	0.00	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	4541	29971	0.54	0.04	<<*	60	0.02	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	3105	24530	0.46	0.04	<<*	54	0.03	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	6241	43768	0.52	0.04	<<*	51	0.02	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	6960	44628	0.5	0.04	<<*	60	0.02	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	5247	34127	0.62	0.05	<<*	54	0.04	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	9454	86082	0.83	0.07	=	95	0.08	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	9661	73909	1.09	0.09	=	88	0.06	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	9512	66105	0.99	0.07	=	61	0.03	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	10640	73925	0.94	0.07	=	91	0.04	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	8895	65238	1.05	0.07	=	69	0.06	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	8984	59440	0.95	0.07	=	60	0.04	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	7714	66685	0.93	0.06	=	80	0.02	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	9687	69525	1	0.07	=	56	0.02	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	10000	83720	1.04	0.07	=	97	0.08	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	10860	72289	1.09	0.07	=	58	0.02	-

Median value all probe values: **9352 67982 1.01 0.07 61 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilm's tumour product description.

269/17	3	Analísada
--------	---	-----------



Sample report: 4

Project: AmnstrauBibancoC | Experiment: AmnstrauBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

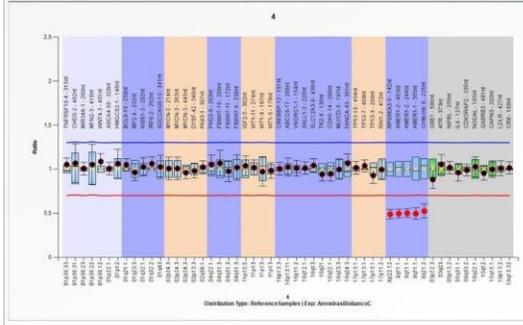
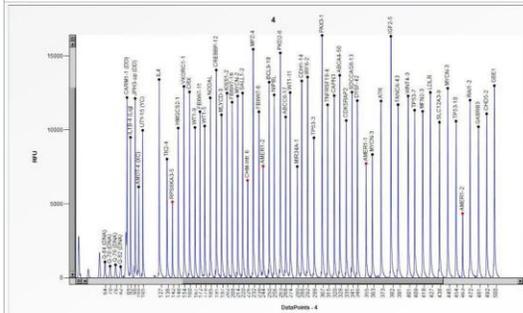
Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilm's tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-A)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK -1%
 R8Q: OK
 R9Q: OK
 CAS: OK 100%

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001,129430	11700	89181	1.05	0.04	=	71	0.00	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006,150850	11095	101782	1.07	0.11	=	88	0.02	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009,134420	7530	57418	1.01	0.04	=	52	0.03	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011,971940	11264	98224	1.05	0.12	=	82	0.01	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022,320550	12300	106529	1.09	0.04	=	84	0.03	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094,231210	13695	105404	1.01	0.03	=	69	0.01	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120,113020	10133	67528	1.06	0.08	=	55	0.00	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145,562810	13236	97137	1.05	0.03	=	59	0.02	-
232	MPZ-4	01q23.3	01-159,542830	15456	118866	0.96	0.05	=	87	0.01	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202,428550	12489	83416	1.02	0.05	=	45	0.02	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208,042100	13580	105218	1.06	0.04	=	56	0.01	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241,608730	12555	100435	1.03	0.07	=	83	0.00	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013,599780	12293	87014	1.01	0.06	=	57	0.04	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016,003140	8343	67852	1.01	0.06	=	68	0.06	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016,003310	12821	116467	0.96	0.04	=	96	0.02	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071,894010	11982	93358	0.98	0.04	=	56	0.08	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222,871610	16392	125543	1.02	0.04	=	64	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089,186880	15208	111528	1.05	0.06	=	56	0.02	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153,463560	11879	82956	1.07	0.07	=	62	0.00	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153,471370	11241	76136	0.98	0.06	=	48	0.02	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153,493220	11236	81499	1.02	0.07	=	49	0.03	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002,118910	18338	138062	1.04	0.06	=	86	0.00	-
274	WT1-11	11p13	11-032,366630	12530	84135	1.02	0.04	=	83	0.01	-
167	WT1-9	11p13	11-032,370830	10166	68895	0.97	0.08	=	51	0.01	-
178	WT1-5	11p13	11-032,395710	10270	69555	0.98	0.04	=	36	0.04	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003,764660	14052	100703	1.01	0.04	=	49	0.00	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016,183750	10880	85246	1.02	0.05	=	83	0.01	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031,013360	12942	94342	1.01	0.04	=	66	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049,732800	12495	89940	1.01	0.03	=	59	0.02	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055,469530	10525	93556	1.04	0.04	=	75	0.03	-
138	TN2-4	16q21	16-065,128370	8035	57936	0.94	0.04	=	68	0.05	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067,419590	13317	102970	0.95	0.04	=	69	0.01	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082,499340	11028	77763	1	0.06	=	61	0.05	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088,331930	11707	102607	1.07	0.05	=	85	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007,514890	10597	82274	1.02	0.04	=	80	0.05	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007,517800	11339	100202	1.04	0.03	=	82	0.05	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007,520080	9474	74908	0.93	0.04	=	70	0.02	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017,568050	12018	113848	1	0.06	=	94	0.01	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020,123050	5144	34553	0.49	0.03	<<*	55	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063,326860	4356	36418	0.5	0.02	<<*	51	0.02	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063,329590	7559	58299	0.5	0.02	<<*	55	0.05	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063,342160	7738	62830	0.5	0.03	<<*	62	0.04	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085,101110	6388	43829	0.82	0.04	<<*	43	0.05	-
500	GBE1	03p12.3	03-081,774630	12995	125661	0.88	0.05	=	95	0.00	-
373	ATR	03q23	03-143,651080	11958	97743	1.05	0.06	=	93	0.07	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037,012960	12374	92730	1.02	0.04	=	66	0.01	-
127	IL4	05q31.1	05-132,037620	13411	96573	0.96	0.05	=	87	0.03	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122,370430	10637	82524	0.99	0.03	=	69	0.04	-
185	NODAL	10q22.1	10-071,865510	12173	85087	1.03	0.06	=	83	0.04	-
481	GABRB3	15q12	15-024,344330	10217	94569	0.95	0.04	=	68	0.00	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040,490380	12327	90618	1	0.05	=	65	0.02	-
427	LDLR	19p13.2	19-011,095270	12540	110922	1.01	0.04	=	82	0.03	-
160	CRX	19q13.32	19-053,029580	12578	89125	1.01	0.03	=	58	0.02	-



Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilm's tumour product description.



Sample report: 5

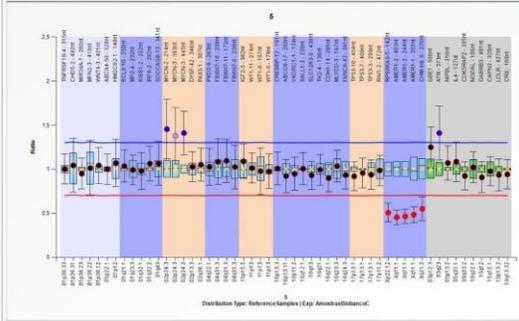
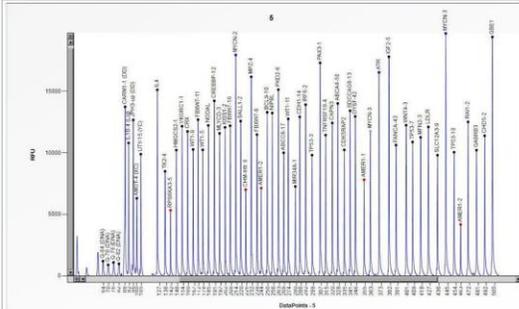
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK -3%
 RSO: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK? 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	11434	87321	1	0.08	=	73	0.04	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	11378	102749	1.04	0.15	=	82	0.04	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7259	54387	0.95	0.09	=	51	0.05	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	11252	98126	1.01	0.16	=	80	0.04	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	12238	105365	1.04	0.1	=	75	0.06	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	14001	106999	1	0.09	=	67	0.08	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	10214	68152	1.07	0.13	=	59	0.01	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	13278	94964	1.03	0.09	=	57	0.03	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	16165	120270	0.99	0.08	=	70	0.07	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	12062	81072	0.98	0.1	=	43	0.02	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	13903	108856	1.06	0.1	=	51	0.11	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	13409	104645	1.06	0.12	=	61	0.10	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	17937	127933	1.45	0.17	>>*	59	0.03	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	11758	95458	1.38	0.16	>*	68	0.09	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	19687	177506	1.41	0.12	>>*	104	0.03	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	12950	99355	1.03	0.09	=	60	0.05	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	12927	131866	1.05	0.09	=	61	0.06	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	15120	109463	1.03	0.1	=	59	0.06	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	12191	84401	1.08	0.13	=	58	0.00	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	12862	86232	1.1	0.12	=	44	0.00	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	11473	83137	1.03	0.12	=	49	0.00	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	17793	150063	1.09	0.1	=	99	0.02	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	12751	95289	1.01	0.08	=	62	0.11	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	10268	69550	0.98	0.13	=	52	0.07	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	10230	70016	0.97	0.1	=	45	0.05	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	14212	100159	1.01	0.09	=	63	0.03	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	9996	75016	0.92	0.09	=	56	0.06	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	12150	86923	0.95	0.09	=	62	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	12572	92279	1.01	0.09	=	61	0.01	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	9801	87479	0.93	0.08	=	84	0.07	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	8492	60352	0.99	0.09	=	65	0.01	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	12913	98386	0.9	0.08	=	67	0.05	-
197	MYL2-3	16q23.3	16-082.499340	11574	81877	1.03	0.09	=	63	0.02	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	10620	90838	0.93	0.08	=	78	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	10340	89190	0.92	0.08	=	76	0.02	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	10871	96135	0.96	0.08	=	81	0.07	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	9805	75263	0.94	0.08	=	69	0.05	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017.568050	12506	117019	0.99	0.09	=	86	0.01	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	5335	36285	0.51	0.05	<<*	52	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	4168	34287	0.45	0.04	<<*	47	0.01	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	7137	54656	0.46	0.04	<<*	55	0.02	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	7807	60153	0.46	0.04	<<*	54	0.01	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	7007	45114	0.55	0.07	<<*	41	0.03	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	19397	187456	1.25	0.12	=	109	0.03	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	16522	139920	1.41	0.15	>>*	92	0.08	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	13227	98566	1.07	0.1	=	69	0.10	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	15110	108970	1.08	0.11	=	89	0.01	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	10227	76911	0.92	0.08	=	59	0.09	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	12214	86560	1.02	0.09	=	63	0.01	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	10206	94374	0.91	0.09	=	79	0.01	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	12418	92172	0.98	0.08	=	57	0.12	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	12094	107385	0.93	0.09	=	75	0.08	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	11731	82775	0.94	0.08	=	58	0.01	-

Median value all probe values: 12094 92279 1 0.09 82 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.



Sample report: 6

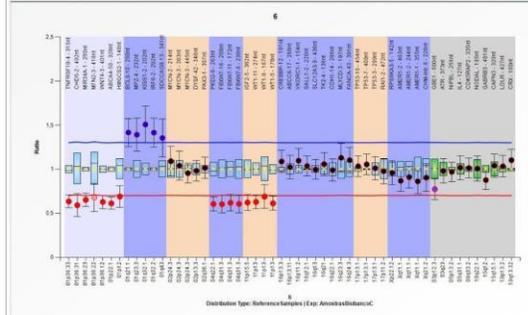
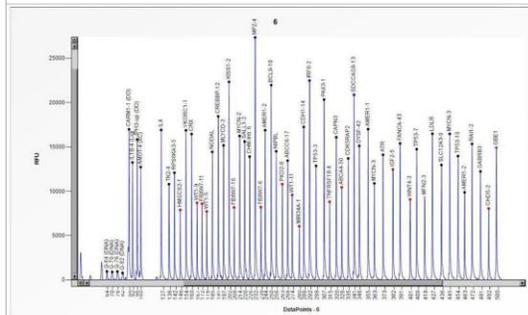
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC, On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRS: OK 100%
 FMS: OK 90%
 PSLP: OK 4%
 RSQ: OK
 RPQ: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	8813	68555	0.63	0.04	<<*	75	0.00	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	8940	74035	0.59	0.07	<<*	83	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6045	45460	0.65	0.04	<<*	52	0.05	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	9321	82490	0.68	0.08	<*	73	0.07	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	9077	78663	0.63	0.04	<<*	74	0.05	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	10444	82012	0.61	0.03	<<*	63	0.00	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	7883	55410	0.69	0.06	<<*	58	0.01	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	21967	165857	1.42	0.08	>>*	57	0.03	-
232	MPT4	01q23.3	01-159.542830	27343	209222	1.39	0.09	>>*	66	0.05	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	23237	161365	1.51	0.1	>>*	61	0.00	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	22482	182248	1.41	0.08	>>*	73	0.03	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	20869	174915	1.35	0.11	>>*	58	0.02	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	18236	118251	1.09	0.09	=	59	0.04	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	10884	90797	1.04	0.08	=	66	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	16469	147493	0.95	0.06	=	65	0.04	-
346	DYF-42	02p13.3	02-071.894010	15118	122578	0.98	0.06	=	65	0.00	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	20328	164498	1.01	0.06	=	72	0.05	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	10797	78245	0.6	0.04	<<*	58	0.02	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	8175	59797	0.6	0.05	<<*	62	0.04	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	8593	58301	0.62	0.05	<<*	47	0.04	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	8206	58967	0.61	0.05	<<*	41	0.05	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	12461	105260	0.62	0.04	<<*	87	0.03	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	9579	73093	0.63	0.04	<<*	62	0.03	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	8689	59204	0.69	0.07	<<*	50	0.04	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	7722	53991	0.61	0.04	<<*	43	0.02	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	18436	133612	1.09	0.06	=	46	0.07	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	13449	103049	1.02	0.07	=	57	0.00	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	16860	125763	1.1	0.07	=	64	0.04	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	15606	120365	1.04	0.06	=	58	0.03	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	12960	119215	1	0.06	=	92	0.05	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	10794	78549	1.06	0.06	=	64	0.00	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	17247	131183	0.99	0.06	=	66	0.02	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	15171	111003	1.13	0.08	=	62	0.02	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	15397	136012	1.1	0.07	=	91	0.01	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514890	13965	125767	1.03	0.06	=	67	0.05	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	14736	130028	1.05	0.06	=	78	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	12858	99992	1.01	0.06	=	66	0.07	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	15342	146304	0.98	0.07	=	93	0.01	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	12087	87028	0.96	0.07	=	67	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	9880	87274	0.87	0.06	=	64	0.03	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	16886	129939	0.91	0.06	=	66	0.04	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	17005	143323	0.86	0.07	=	65	0.02	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	13600	86932	0.9	0.06	=	55	0.06	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	14909	146919	0.77	0.06	<<*	99	0.01	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	14105	117439	0.98	0.07	=	91	0.06	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	14502	110150	0.97	0.06	=	65	0.01	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	16910	127282	1.02	0.07	=	93	0.05	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	13700	107013	1.01	0.06	=	69	0.01	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	14437	103489	1.01	0.07	=	62	0.06	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	12235	113118	0.88	0.05	=	72	0.02	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	16086	124743	1.04	0.07	=	66	0.06	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	16481	150713	1.03	0.06	=	99	0.03	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	16453	123897	1.1	0.06	=	60	0.02	-

Median value all probe values: 14105 113118 0.98 0.06 65 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrc Holland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

517/18

6

Analísada



Sample report: 7

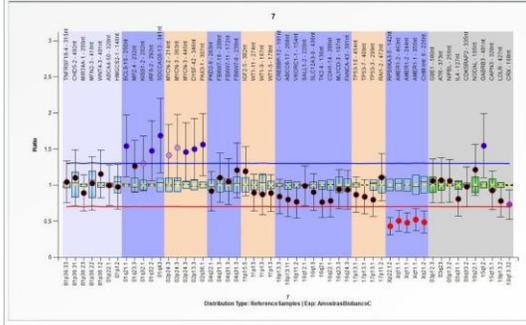
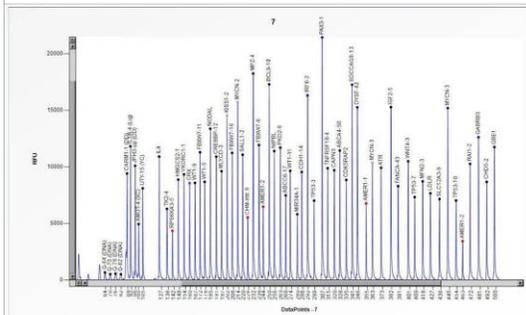
Project: AmnostaBibancoC | Experiment: AmnostaBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC, On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 11%

FRS: OK 100%
 FMS: OK 100%
 PSLP: OK 5%
 RQ: OK
 RPQ: Bad
 CAS: OK? 75%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSF18-4	01p36.33	01-001,129430	9673	74637	1.04	0.15	=	71	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006,150850	8661	76726	1.1	0.19	=	83	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009,134420	5807	41701	0.89	0.13	=	48	0.05	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011,971940	8710	74416	1.02	0.18	=	92	0.01	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022,320550	10483	90458	1.15	0.16	=	86	0.03	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094,231210	11429	86564	1	0.14	=	68	0.05	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120,113020	8858	59166	0.98	0.15	=	65	0.02	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145,562810	17284	123466	1.54	0.21	>>*	59	0.03	-
232	MZF4	01q23.3	01-159,542830	16244	133267	1.26	0.18	=	70	0.01	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202,428550	14522	96586	1.3	0.19	>*	45	0.00	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208,042100	16301	123033	1.48	0.21	>>*	51	0.04	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241,608730	17246	135174	1.69	0.26	>>*	63	0.02	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013,099780	15702	110340	1.41	0.21	>*	59	0.05	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016,003140	10342	80949	1.52	0.23	>*	78	0.03	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016,003310	15181	134208	1.46	0.2	>>*	102	0.02	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071,694010	15260	117383	1.5	0.21	>>*	60	0.05	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222,671610	21427	165365	1.56	0.22	>>*	67	0.02	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089,186880	11688	84346	0.92	0.14	=	60	0.05	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153,463560	11220	75944	1.1	0.17	=	61	0.04	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153,471370	11280	76976	1.05	0.16	=	46	0.03	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153,493220	11916	86103	1.21	0.19	=	49	0.00	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002,118910	15270	125566	1.19	0.17	=	97	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032,366630	9639	69491	0.89	0.13	=	56	0.04	-
167	WT1-9	11p13	11-032,370830	8573	58623	0.87	0.14	=	60	0.06	-
178	WT1-5	11p13	11-032,395710	8666	59456	0.89	0.13	=	46	0.05	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003,764660	10885	74564	0.84	0.12	=	45	0.04	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016,163750	7473	54687	0.8	0.12	=	57	0.01	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031,013360	9923	66306	0.77	0.11	=	62	0.04	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049,732800	11060	78395	0.99	0.14	=	56	0.01	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055,469530	7147	63118	0.9	0.13	=	91	0.02	-
136	TK2-4	16q21	16-065,128370	6276	44766	0.76	0.11	=	66	0.00	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067,419590	9538	68496	0.78	0.11	=	61	0.02	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082,499340	9606	67497	0.94	0.14	=	61	0.06	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088,331930	8288	70035	0.93	0.13	=	85	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007,514690	7011	59023	0.87	0.12	=	54	0.04	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007,517800	7320	62949	0.84	0.12	=	80	0.00	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007,520080	6999	51901	0.8	0.12	=	60	0.06	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017,568050	10254	83743	1.11	0.16	=	95	0.00	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020,123050	4242	30240	0.43	0.06	<<*	66	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063,326860	3422	27712	0.51	0.07	<<*	49	0.06	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063,329590	6470	47854	0.48	0.07	<<*	55	0.00	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063,342160	6754	51330	0.52	0.08	<<*	59	0.02	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085,101110	5512	35196	0.49	0.06	<<*	33	0.00	-
500	GBE1	03p12.3	03-081,774630	11739	109587	1.06	0.16	=	98	0.04	-
373	ATR	03q23	03-143,651080	9905	78923	1.07	0.16	=	74	0.09	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037,012960	11386	84748	1.06	0.15	=	67	0.02	-
127	IL4	05q31.1	05-132,037620	10892	78165	0.81	0.12	=	90	0.04	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122,370430	8833	66550	0.98	0.14	=	67	0.03	-
185	NODAL	10q22.1	10-071,865510	13356	91674	1.21	0.18	=	62	0.02	-
481	GABRB3	15q12	15-024,344330	12607	114241	1.55	0.22	>>*	80	0.04	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040,490380	9693	69126	0.93	0.13	=	58	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011,095270	7652	67807	0.78	0.11	=	90	0.07	-
160	CRX	19q13.32	19-053,029580	8552	58312	0.73	0.1	<<*	58	0.01	-

Median value all probe values: **9873 74637 0.98 0.14*** **62 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

047/20 H	7	Analizada também com qPCR
-----------------	----------	----------------------------------



Sample report: 8

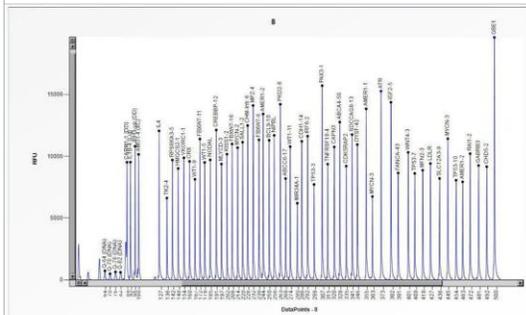
Project: AmnostaBibancoC | Experiment: AmnostaBibancoC | Dye: 5-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilm's tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC: On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 13%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 4%
 RBQ: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK? 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	9366	70096	0.98	0.08	=	67	0.03	-
492	MZF4	01q25.3	01-159.542850	14109	100616	1.03	0.09	=	55	0.08	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6204	46161	0.96	0.08	=	54	0.02	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	8873	76319	0.95	0.13	=	75	0.02	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	10316	88953	1.05	0.09	=	76	0.02	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	12768	97474	1.09	0.09	=	63	0.05	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	9014	60270	1.11	0.12	=	58	0.00	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	11295	80472	1.04	0.09	=	69	0.02	-
232	MZF4	01q25.3	01-159.542850	14109	100616	1.03	0.09	=	55	0.08	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	10167	67450	0.98	0.09	=	60	0.02	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	11631	90833	1.06	0.09	=	62	0.03	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	11754	93482	1.11	0.11	=	62	0.04	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	10697	73607	1.03	0.1	=	59	0.04	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	6746	54113	0.94	0.1	=	68	0.02	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	11424	102065	0.98	0.08	=	63	0.02	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.694010	10949	83243	1.03	0.09	=	56	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	15711	119737	1.13	0.1	=	66	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	14210	102482	1.14	0.1	=	57	0.01	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	10997	75948	1.16	0.12	=	58	0.01	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	11400	75795	1.16	0.11	=	49	0.02	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	11330	80362	1.2	0.13	=	53	0.03	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	14371	120989	1.05	0.1	=	88	0.02	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	10784	79062	1.02	0.09	=	60	0.02	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	8140	54839	0.91	0.11	=	52	0.01	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	9500	65833	1.07	0.1	=	55	0.04	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	12126	87133	1.02	0.09	=	63	0.00	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.163750	8199	61317	0.9	0.08	=	57	0.07	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	9875	70795	0.91	0.08	=	64	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	11142	79052	1.06	0.09	=	59	0.02	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	8206	72970	0.93	0.08	=	81	0.03	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	6624	45959	0.92	0.08	=	65	0.03	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	11210	84276	0.93	0.08	=	59	0.02	-
197	MYLDC-3	16q23.3	16-082.499340	9377	65168	0.99	0.09	=	60	0.05	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	8652	72637	0.91	0.08	=	75	0.05	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	8061	69606	0.88	0.07	=	65	0.05	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	8615	74259	0.9	0.08	=	77	0.03	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	7720	58822	0.88	0.08	=	68	0.00	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	10212	93701	0.96	0.09	=	81	0.01	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	9698	66841	1.09	0.1	=	67	0.03	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	7933	68554	1.03	0.1	=	64	0.01	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	13423	99536	1.04	0.09	=	56	0.05	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	13841	116935	1.02	0.1	=	61	0.00	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	12458	84647	1.16	0.13	=	58	0.06	-
500	GBE1	03p12.3	03-061.774630	19616	187096	1.51	0.16	>>*	107	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	15270	124578	1.55	0.15	>>*	103	0.03	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	11693	85121	1.12	0.1	=	61	0.00	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	12058	88092	1.02	0.09	=	91	0.06	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	9208	69985	0.99	0.08	=	58	0.00	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	9708	67461	0.96	0.09	=	61	0.04	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	9255	85311	0.98	0.09	=	68	0.02	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	10756	78138	1.01	0.09	=	66	0.05	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	9413	82808	0.87	0.07	=	83	0.04	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	9591	67459	0.91	0.08	=	62	0.02	-

Median value all probe values: 10316 79052 1.02 0.09 63 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilm's tumour product description.



Sample report: 9

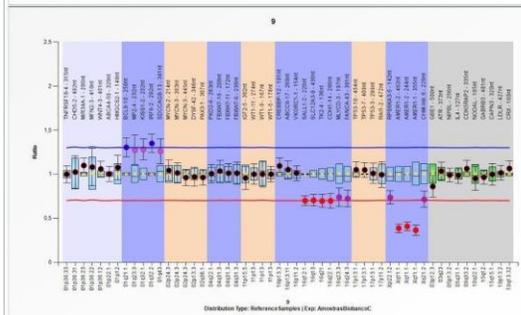
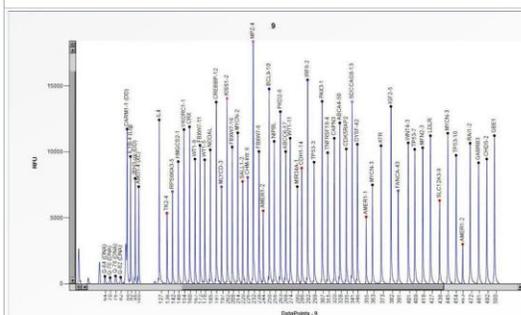
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 3%
 RSG: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRFSP18-4	01p36.33	01-001.129430	9940	75259	1	0.05	=	73	0.06	-
492	MZF4	01q25.3	01-159.542850	18373	134492	7.27	0.08	>>	67	0.07	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7373	54375	1.1	0.04	=	53	0.06	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	10318	88206	1.08	0.11	=	84	0.04	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	10690	90595	1.08	0.04	=	79	0.05	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	12198	95158	1	0.04	=	70	0.03	-
148	HMGC2-1	01p12	01-120.113020	9268	60785	1.08	0.07	=	55	0.00	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	14770	107862	7.3	0.05	>>	60	0.07	-
232	MZF4	01q25.3	01-159.542850	18373	134492	7.27	0.08	>>	67	0.07	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	14055	96464	7.28	0.06	>>	62	0.02	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	15458	119329	7.35	0.05	>>	70	0.04	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	13803	108205	7.26	0.07	>>	62	0.06	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	11450	80907	1.04	0.06	=	59	0.02	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	7502	58608	1.01	0.06	=	69	0.03	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	11420	100241	0.96	0.05	=	68	0.08	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.894010	10580	80629	0.97	0.05	=	56	0.02	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	13834	105463	0.96	0.04	=	64	0.03	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	13053	94639	1.01	0.05	=	57	0.00	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	10372	71045	1.03	0.06	=	63	0.02	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	10498	70218	1.01	0.05	=	48	0.01	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	10032	71380	1.01	0.06	=	50	0.04	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	13443	110484	0.96	0.07	=	87	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	11039	81157	1	0.06	=	60	0.00	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	9456	63881	1	0.07	=	50	0.03	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	9406	65875	1	0.04	=	60	0.02	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	13776	95895	1.09	0.04	=	48	0.03	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.183750	10029	75778	1.05	0.05	=	58	0.01	-
154	VRCRC1-1	16p11.2	16-031.013380	11694	82559	1.01	0.04	=	59	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	7762	54881	0.7	0.03	<<	53	0.07	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	6318	57271	0.7	0.03	<<	93	0.01	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	5360	37254	0.7	0.04	<<	57	0.03	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	8780	66883	0.7	0.04	<<	59	0.04	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	7358	50943	0.74	0.05	<<	61	0.02	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	7062	59282	0.72	0.05	<<	81	0.03	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514890	9739	85006	1.05	0.04	=	78	0.08	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	10195	87493	1.05	0.04	=	82	0.05	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	9222	70437	1.01	0.06	=	72	0.08	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	10655	98573	0.99	0.07	=	96	0.01	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	6997	47530	0.74	0.04	<<	69	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326880	3012	24506	0.39	0.02	<<	45	0.02	-
244	AMER1-1	Xq11.1	X-063.329590	5541	40522	0.47	0.03	<<	51	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	5078	39851	0.36	0.03	<<	64	0.03	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	8071	54640	0.71	0.05	<<	49	0.03	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	11232	105159	0.86	0.06	=	93	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	10471	84461	1.03	0.05	=	88	0.00	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012060	10802	81239	0.99	0.04	=	62	0.06	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	12429	89311	0.99	0.04	=	100	0.00	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	10226	77662	1.06	0.05	=	60	0.04	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	10156	72388	0.95	0.07	=	62	0.04	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	9178	84209	0.96	0.04	=	92	0.01	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	11033	80896	1	0.06	=	59	0.06	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	11227	97675	1.02	0.04	=	93	0.08	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	11903	82465	1.06	0.04	=	62	0.00	-

Median value all probe values: **10318 80907 1 0.05 62 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcolland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

348/20 T1

9

Analizada também com qPCR



Sample report: 10

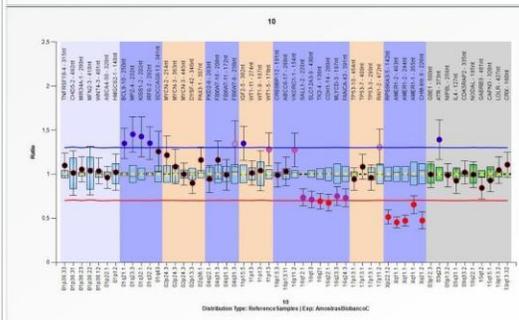
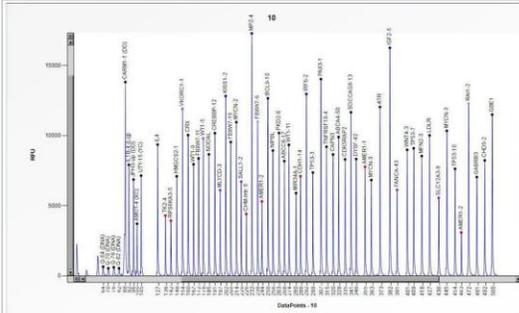
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC, On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 10%
 R8Q: OK
 R9Q: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	9206	68801	1.1	0.07	=	71	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	8231	66703	1.01	0.13	=	70	0.15	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	5908	43047	1.05	0.07	=	59	0.05	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	8547	69490	1.04	0.14	=	88	0.03	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	8867	71477	1.03	0.07	=	77	0.03	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	9888	74348	0.96	0.06	=	67	0.02	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	7099	47983	1.02	0.1	=	54	0.02	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	12660	91238	1.35	0.09	>>*	64	0.01	-
233	MPTZ4	01q23.3	01-159.542830	17285	121412	1.45	0.1	>>*	67	0.03	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	12821	86951	1.43	0.11	>>*	61	0.01	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	12965	93756	1.35	0.09	>>*	52	0.01	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	11658	88402	1.26	0.11	=	60	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	10959	75313	1.22	0.11	=	53	0.02	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	6832	51795	1.08	0.1	=	66	0.05	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	10344	85192	1	0.06	=	69	0.13	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.694010	8333	62860	0.9	0.06	=	52	0.05	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	14029	103126	1.16	0.07	=	66	0.04	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	10188	73449	0.94	0.08	=	65	0.04	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	9542	63499	1.16	0.11	=	45	0.00	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	8375	55380	0.99	0.09	=	45	0.00	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	10993	77350	1.34	0.13	>*	55	0.01	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	18255	128180	1.35	0.1	>>*	82	0.11	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	9340	67176	1.01	0.07	=	53	0.01	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	7961	53144	1.04	0.11	=	56	0.02	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	9804	67053	1.28	0.09	>>	51	0.06	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	10173	69883	0.99	0.07	=	47	0.02	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	8185	60107	1.03	0.08	=	56	0.05	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	11910	84370	1.27	0.09	>>	63	0.05	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	6721	45917	0.74	0.05	<<	47	0.00	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	5558	46142	0.77	0.05	<<	69	0.17	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	4305	29734	0.69	0.04	<<*	57	0.00	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	7104	51476	0.67	0.05	<<*	63	0.04	-
197	MYLCD-3	16q23.3	16-082.499340	6120	42068	0.75	0.05	<<	55	0.02	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	6135	49323	0.73	0.05	<<	65	0.05	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	7833	61823	0.94	0.06	=	62	0.12	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	9097	73163	1.08	0.07	=	61	0.06	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	7368	55633	0.96	0.07	=	69	0.05	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	12277	104250	1.37	0.1	>*	89	0.09	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	3941	25841	0.51	0.04	<<*	43	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326880	3096	24090	0.45	0.03	<<*	48	0.00	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	5309	37996	0.47	0.03	<<*	50	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	7776	59087	0.65	0.05	<<*	57	0.02	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	4414	29559	0.47	0.05	<<*	50	0.07	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	11497	99330	1	0.07	=	107	0.08	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	12040	92147	1.39	0.11	>>*	83	0.06	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	8934	63465	0.99	0.07	=	60	0.00	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	9360	64937	0.93	0.07	=	78	0.02	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	8309	61836	1.02	0.06	=	56	0.01	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	8666	59190	1	0.07	=	67	0.00	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	7045	58341	0.84	0.06	=	65	0.11	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	8658	63250	0.93	0.06	=	58	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	10016	83071	1.05	0.08	=	87	0.07	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	10038	69871	1.11	0.07	=	56	0.03	-

Median value all probe values: **8934 64937 1.01 0.07 61 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.



Sample report: 11

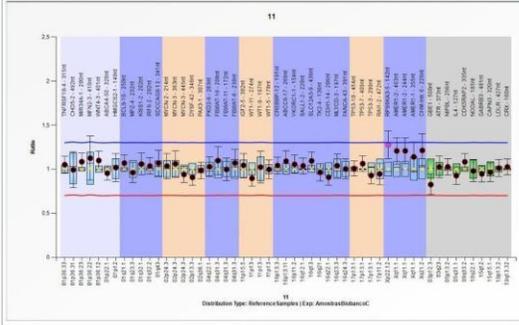
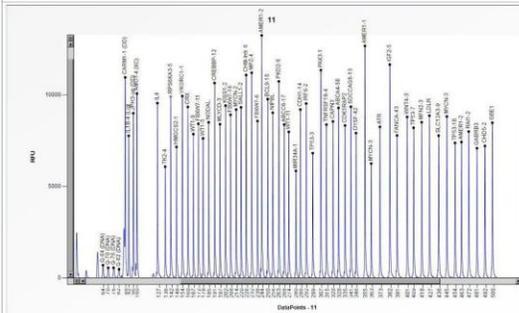
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-9)
 Analysis method: Block SSC, On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 2%
 R8Q: OK
 R9Q: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRSFP18-4	01p36.33	01-001.129430	8371	65286	1.05	0.05	=	71	0.04	-
492	CHDS-2	01q36.31	01-006.150850	7208	61620	0.99	0.1	=	75	0.06	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	5847	44088	1.08	0.05	=	58	0.03	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	8504	71146	1.12	0.12	=	88	0.04	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	8791	74106	1.1	0.05	=	78	0.01	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	9284	72366	0.95	0.04	=	71	0.02	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	7153	49711	1.02	0.08	=	57	0.09	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	9764	71549	1.07	0.05	=	59	0.06	-
232	MZF4	01q32.3	01-159.542830	11205	82478	0.96	0.06	=	52	0.05	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	9409	66963	1.06	0.06	=	61	0.07	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	9522	71746	1.04	0.05	=	50	0.07	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	9345	73791	1.07	0.07	=	58	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	9194	67098	1.03	0.07	=	53	0.06	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	6246	48594	1.06	0.07	=	56	0.05	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	8815	75246	0.94	0.05	=	67	0.14	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.694010	7911	60887	0.91	0.04	=	55	0.01	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	11347	87218	0.99	0.05	=	65	0.02	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	10736	78453	1.03	0.06	=	65	0.04	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	8907	61569	1.1	0.08	=	60	0.00	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	8417	57223	1.1	0.06	=	48	0.01	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	8567	60995	1.07	0.08	=	54	0.02	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	11652	96216	1.04	0.07	=	99	0.11	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	7976	58239	0.9	0.05	=	53	0.00	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	7854	53945	1.02	0.09	=	62	0.02	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	7620	52316	1.1	0.05	=	52	0.01	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	10645	75085	1.04	0.05	=	50	0.02	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.183750	8373	61640	1.09	0.06	=	55	0.00	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	9931	71137	1.06	0.05	=	65	0.04	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	9316	65303	1.04	0.04	=	53	0.00	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	7769	68478	1.09	0.05	=	96	0.08	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	6074	43141	0.96	0.05	=	62	0.07	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	9194	68665	0.91	0.05	=	62	0.01	-
197	MYLC2-3	16q23.3	16-082.499340	8392	58061	1.04	0.07	=	58	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	7781	66331	1.1	0.06	=	74	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	7371	61835	1.01	0.04	=	65	0.13	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	8199	68732	1.06	0.05	=	59	0.10	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	6811	51596	0.93	0.05	=	68	0.01	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	7993	70882	0.95	0.06	=	84	0.03	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	9903	69327	1.28	0.08	=	66	0.00	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	7422	61567	1.21	0.07	=	69	0.12	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	13243	96516	1.21	0.07	=	55	0.00	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	12667	101328	1.14	0.08	=	71	0.06	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	11060	76529	1.21	0.09	=	60	0.02	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	8471	76569	0.83	0.06	=	92	0.10	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	8250	65680	1.02	0.06	=	79	0.06	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	9020	65345	1.03	0.05	=	57	0.03	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	9548	67758	0.93	0.05	=	83	0.07	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	8323	65217	1.08	0.05	=	66	0.02	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	8497	59568	0.98	0.06	=	66	0.02	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	7083	61243	0.95	0.05	=	78	0.01	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	8545	65045	0.97	0.05	=	57	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	8860	75973	1.01	0.05	=	102	0.02	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	9336	65868	1.03	0.04	=	61	0.01	-

Median value all probe values: 8545 66331 1.03 0.05 82 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

082/19

11

Analísada



Sample report: 12

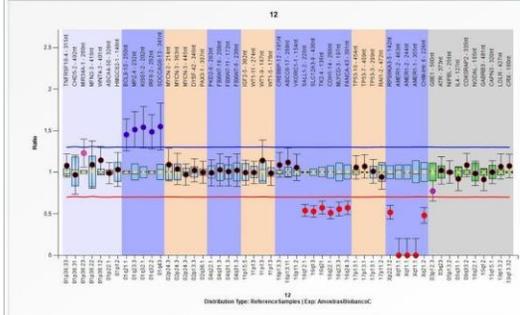
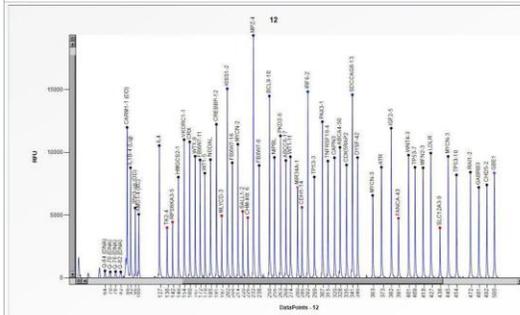
Project: AmnstrauBibancoC | Experiment: AmnstrauBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC, On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 50/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 14%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 0%
 RSO: OK
 RPQ: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	9299	71693	1.08	0.07	=	65	0.04	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	7401	63361	0.97	0.12	=	79	0.04	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7210	54313	7.23	0.08	>>	60	0.04	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	8766	74404	1.09	0.14	=	90	0.05	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	9776	81121	1.14	0.08	=	74	0.01	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	10368	81671	0.99	0.06	=	67	0.05	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	8022	54096	1.03	0.1	=	56	0.00	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	14476	103961	7.45	0.09	>>*	64	0.02	-
232	MPTZ4	01q23.3	01-159.542830	19301	136570	7.57	0.11	>>*	60	0.07	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	15061	105250	7.54	0.12	>>*	63	0.00	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	14824	110276	7.49	0.1	>>*	58	0.00	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	14574	113900	7.55	0.14	>>*	62	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	10637	78620	1.09	0.1	=	50	0.03	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	6565	52531	1.04	0.09	=	78	0.05	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	9672	83766	0.97	0.06	=	74	0.04	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	9580	71158	1.02	0.07	=	51	0.01	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	12430	94995	1	0.07	=	65	0.04	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	11311	82370	0.99	0.08	=	64	0.02	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	9165	61905	1.03	0.1	=	45	0.08	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	9392	64344	1.01	0.09	=	48	0.05	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	8951	65714	1.02	0.1	=	68	0.02	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	11915	97433	1	0.08	=	96	0.04	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	9644	70716	1	0.07	=	55	0.00	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	9681	63874	1.14	0.12	=	36	0.01	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	8336	58481	0.99	0.07	=	51	0.07	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	12224	84045	1.09	0.07	=	54	0.05	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	9343	70809	1.12	0.09	=	57	0.00	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	11004	76983	1.06	0.08	=	60	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	5303	37019	0.54	0.04	<<*	41	0.10	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	3982	35662	0.63	0.03	<<*	86	0.06	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	3999	28359	0.57	0.04	<<*	65	0.05	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	5615	40716	0.87	0.04	<<*	48	0.00	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	4947	34571	0.56	0.04	<<*	55	0.02	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	4747	40441	0.57	0.04	<<*	75	0.03	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	8198	70586	1.06	0.07	=	72	0.11	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	8803	73260	1.07	0.07	=	64	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	8032	62063	1.01	0.07	=	77	0.06	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	8417	76446	0.94	0.07	=	100	0.17	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	4247	38516	0.52	0.04	<<*	69	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	0	0	0	0	<<***	0	0.00	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	0	0	0	0	<<***	0	0.00	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	0	0	0	0	<<***	0	0.00	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.191110	4800	32190	0.48	0.05	<<*	42	0.04	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	8353	74956	0.77	0.06	<<*	88	0.00	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	8816	70949	1.02	0.08	=	85	0.03	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	9589	69472	1	0.07	=	53	0.01	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	10533	73883	0.92	0.07	=	81	0.03	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	8990	68589	1.08	0.07	=	65	0.03	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	9413	67715	0.98	0.07	=	70	0.01	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	7208	62995	0.91	0.07	=	89	0.07	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	9564	72529	1	0.07	=	58	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	9932	85647	1.07	0.08	=	98	0.03	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	10628	75200	1.08	0.07	=	62	0.00	-

Median value all probe values: **9321 70879 1.02 0.07 84 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

348/20 T2

12

Analísada



Sample report: 13

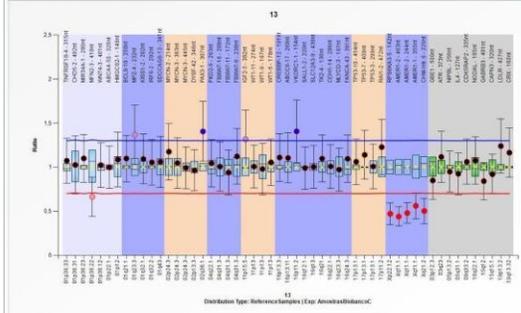
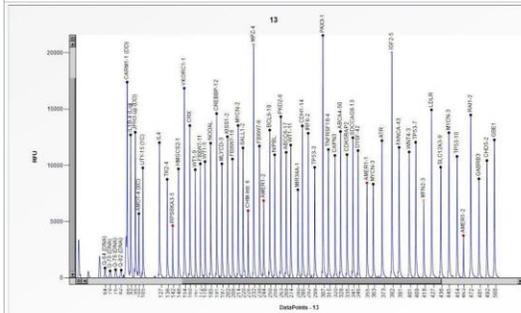
Project: AmnstrauBibancoC | Experiment: AmnstrauBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC, On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 13%
 RSQ: OK
 RPO: Warning
 CAS: OK? 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	11404	91775	1.07	0.13	=	70	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	10423	90591	1.03	0.17	=	85	0.10	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7830	59946	1.1	0.13	=	52	0.06	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	6892	59250	0.66	0.11	<*	83	0.06	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	11190	96655	1.02	0.13	=	80	0.03	-
328	ABCA4-50	01p22.1	01-094.231210	13003	103420	1	0.12	=	70	0.02	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	9686	68299	1.09	0.16	=	55	0.04	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	13128	99215	1.1	0.13	=	63	0.03	-
232	MPT2-4	01q23.3	01-159.542830	20734	153113	1.37	0.17	>*	65	0.02	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	12546	89697	1.09	0.14	=	62	0.02	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	12848	98319	1.05	0.13	=	48	0.00	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	12451	100505	1.06	0.15	=	63	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	13535	99300	1.15	0.16	=	59	0.02	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	8331	67595	1.05	0.14	=	66	0.06	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	12898	112018	0.99	0.12	=	65	0.16	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.694010	11308	87935	0.96	0.12	=	53	0.01	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	21538	170941	1.4	0.17	>>*	66	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	14324	109974	1.04	0.14	=	58	0.09	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	10562	77030	1.01	0.14	=	62	0.08	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	10141	71240	0.94	0.13	=	45	0.02	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	11709	88368	1.12	0.16	=	56	0.05	-
382	IGFBP2-5	11p15.5	11-002.118910	20019	170061	1.32	0.16	>*	97	0.12	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	11802	89783	1.01	0.12	=	59	0.04	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	9614	67489	0.98	0.16	=	34	0.05	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	10331	75366	1.05	0.13	=	61	0.02	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	14597	104672	1.11	0.14	=	49	0.01	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.163750	11153	86762	1.1	0.14	=	58	0.05	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	16847	122196	1.41	0.18	>>*	64	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	11543	86099	0.99	0.12	=	59	0.07	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	9840	87890	1	0.12	=	83	0.08	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	8754	64498	1.1	0.13	=	61	0.05	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	13503	103692	1.01	0.12	=	69	0.01	-
197	MYL2-3	16q23.3	16-082.499340	10137	73629	0.97	0.12	=	56	0.05	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	11595	101640	1.1	0.13	=	80	0.03	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	10791	93748	1.06	0.13	=	84	0.07	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	12048	105452	1.14	0.14	=	83	0.11	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	9816	76517	1.01	0.13	=	63	0.01	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	14471	132534	1.23	0.16	=	90	0.02	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	4838	33395	0.47	0.06	<<*	57	0.03	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	3762	30469	0.44	0.05	<<*	47	0.08	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	6866	53554	0.48	0.06	<<*	55	0.07	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	8440	69198	0.56	0.07	<<*	64	0.07	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	5869	42033	0.5	0.07	<<*	48	0.01	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	12258	113521	0.85	0.11	=	94	0.00	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	12197	101917	1.12	0.15	=	88	0.07	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012060	10932	83889	0.95	0.12	=	58	0.09	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	12022	88308	0.92	0.12	=	90	0.05	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	10946	87880	1.06	0.13	=	68	0.03	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	11964	88570	1.07	0.13	=	66	0.03	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	8803	77627	0.84	0.11	=	75	0.08	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	10874	84075	0.92	0.11	=	58	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	14929	131463	1.24	0.15	=	98	0.03	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	13529	98810	1.16	0.14	=	56	0.03	-

Median value all probe values: 11404 88570 1.05 0.13* 63 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

202/18

13

Analísada



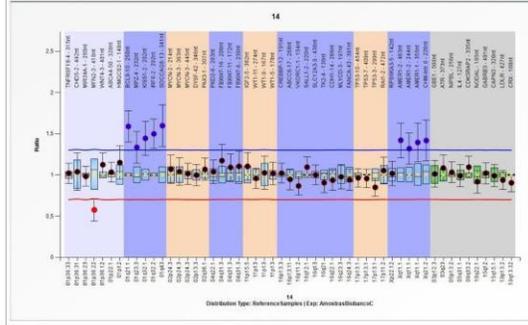
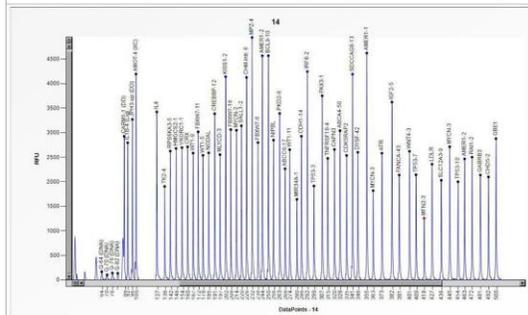
Sample report: 14
 Project: Amnstras/BobancoC | Experiment: Amnstras/BobancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 15%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK -6%
 RSO: OK
 RPQ: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	2476	20630	1.02	0.06	=	61	0.03	-
492	CHD5-2	01q36.31	01-006.150850	2998	20963	1.04	0.11	=	77	0.02	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	1641	13337	0.98	0.06	=	55	0.01	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	1257	11912	0.58	0.07	<<*	73	0.02	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	2621	24935	1.12	0.07	=	76	0.01	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	3040	26207	1.03	0.06	=	69	0.01	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	2678	18546	1.15	0.1	=	59	0.04	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	4567	34993	1.59	0.09	>>*	60	0.03	-
232	MPZ4	01q32.3	01-159.542830	4940	38075	1.33	0.1	>>*	56	0.05	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	4140	30440	1.44	0.1	>>*	62	0.01	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	4245	34138	1.5	0.09	>>*	69	0.03	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	4191	36614	1.6	0.13	>>*	69	0.03	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	3049	23869	1.07	0.09	=	62	0.01	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	1819	16153	1.04	0.08	=	57	0.06	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	2713	26368	1.02	0.06	=	71	0.14	-
346	DYF-42	02p13.3	02-071.694010	2601	22350	1	0.06	=	61	0.05	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	3752	31439	1.07	0.07	=	77	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	3393	26501	1.04	0.07	=	65	0.07	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	3063	22295	1.17	0.1	=	57	0.07	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	3017	21093	1.09	0.08	=	56	0.04	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	2799	21089	1.1	0.09	=	47	0.07	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	3624	32786	1.1	0.08	=	83	0.04	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	2653	20770	0.96	0.06	=	55	0.00	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	2585	17913	1.03	0.1	=	53	0.03	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	2538	17746	1.02	0.07	=	51	0.03	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	3385	24467	1.02	0.06	=	63	0.03	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.163750	2285	17667	0.95	0.06	=	56	0.02	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	2694	19141	0.87	0.06	=	61	0.00	-
220	SALL-2	16q12.1	16-049.732800	3141	23051	1.09	0.06	=	54	0.04	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	2030	19561	1	0.06	=	84	0.01	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	1903	13531	0.9	0.06	=	57	0.06	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	2927	22630	0.94	0.06	=	50	0.05	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	2552	18553	0.98	0.07	=	51	0.06	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	2137	20292	0.94	0.06	=	75	0.03	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	2000	16723	0.96	0.06	=	53	0.10	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	2142	20296	0.96	0.06	=	71	0.09	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	1913	16532	0.85	0.05	=	65	0.06	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	2501	24659	1.05	0.08	=	64	0.15	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	2625	18466	1.02	0.08	=	66	0.02	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	2465	22797	1.42	0.1	>>*	65	0.16	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	4566	35447	1.32	0.09	>>*	54	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	4621	40357	1.39	0.12	>>*	77	0.03	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	4129	29914	1.42	0.12	>>*	50	0.05	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	2878	29690	1.01	0.08	=	90	0.10	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	2581	23995	1.08	0.08	=	83	0.01	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012060	2848	21770	1.03	0.06	=	50	0.01	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	3424	23911	0.99	0.07	=	80	0.08	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	2535	21363	1.09	0.07	=	60	0.04	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	2588	18642	0.92	0.07	=	61	0.01	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	2137	21183	1.02	0.06	=	81	0.02	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	2658	22455	0.99	0.07	=	63	0.02	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	2358	22770	0.94	0.06	=	84	0.00	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	2712	20045	0.9	0.05	=	62	0.05	-

Median value all probe values: **2658 22295 1.03 0.07 62 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

045/19

14

Analísada



Sample report: 15

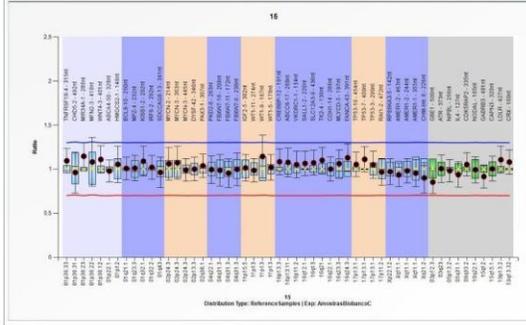
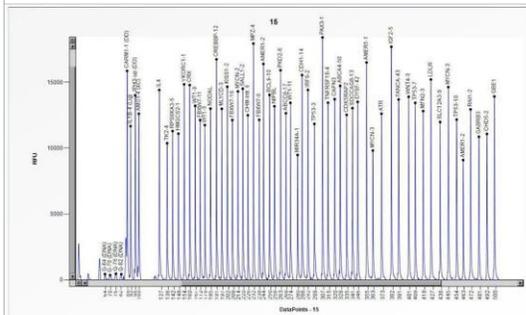
Project: AmnstrauBibancoC | Experiment: AmnstrauBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 3%
 R8Q: OK
 R9Q: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	13452	112301	1.09	0.07	=	72	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	11983	100048	0.96	0.12	=	83	0.03	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	9482	77392	1.15	0.08	=	54	0.06	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	12824	114550	1.08	0.14	=	79	0.03	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	13905	124824	1.11	0.08	=	78	0.00	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	14733	125046	0.98	0.06	=	69	0.07	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	11103	82894	1.05	0.1	=	61	0.02	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	14050	108737	1.01	0.06	=	58	0.02	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	17942	140213	1.01	0.07	=	57	0.01	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	14666	110321	1.09	0.08	=	61	0.00	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	14425	115459	1.02	0.07	=	49	0.00	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	13043	112045	0.96	0.09	=	57	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.599780	14312	110367	1.06	0.09	=	60	0.01	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	9822	84480	1.07	0.09	=	76	0.07	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	14840	132413	0.99	0.06	=	65	0.03	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	13518	111124	1.1	0.07	=	55	0.01	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	18410	148983	1.04	0.07	=	68	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	15912	125003	1.1	0.08	=	65	0.09	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	12135	90357	0.99	0.09	=	61	0.07	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	12132	90089	0.95	0.08	=	48	0.03	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	12153	92968	1	0.09	=	51	0.05	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	17699	156802	1.01	0.07	=	87	0.02	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	13442	105385	0.99	0.07	=	62	0.04	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	13216	84062	1.14	0.12	=	38	0.00	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	11750	85163	1.02	0.07	=	34	0.03	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	16747	126183	1.08	0.07	=	45	0.02	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.163750	12653	102214	1.08	0.08	=	58	0.05	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	14851	115484	1.05	0.08	=	63	0.05	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	14517	110368	1.06	0.07	=	59	0.07	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	11987	111449	1.07	0.07	=	96	0.02	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	10378	79511	1.1	0.07	=	59	0.03	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	15549	127953	1.1	0.07	=	70	0.01	-
197	MYL2-3	16q23.3	16-082.499340	12989	97655	1.06	0.08	=	56	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	13700	121803	1.13	0.08	=	80	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	12172	108949	1.05	0.07	=	67	0.13	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	13439	118023	1.11	0.07	=	53	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	11843	99268	1.05	0.08	=	77	0.02	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	12945	123695	0.97	0.08	=	94	0.16	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	11300	84338	0.97	0.07	=	66	0.00	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	9097	79136	0.94	0.07	=	59	0.15	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	16396	128491	0.98	0.07	=	55	0.07	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	16503	142256	0.95	0.08	=	66	0.05	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	12500	80778	0.9	0.09	=	54	0.09	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	13927	130605	0.85	0.07	=	94	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	12615	107455	1.01	0.08	=	76	0.07	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012060	13184	104493	0.98	0.06	=	57	0.09	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	14420	112010	0.94	0.07	=	96	0.07	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	12530	104244	1.05	0.07	=	75	0.03	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	13004	98477	0.99	0.07	=	83	0.03	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	10866	98488	0.92	0.07	=	71	0.11	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	13719	110948	1.1	0.07	=	65	0.06	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	15214	137581	1.11	0.08	=	95	0.03	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	14793	112383	1.08	0.07	=	59	0.01	-

Median value all probe values: **13439 110368 1.01 0.07 63 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcolland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

484/19

15

Analísada



Sample report: 17

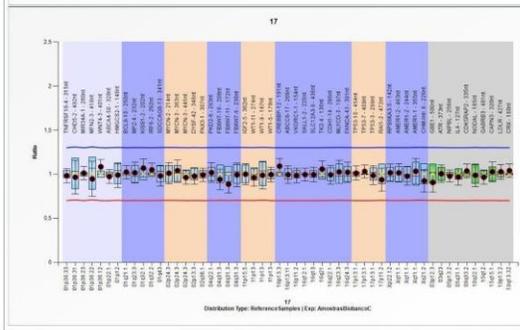
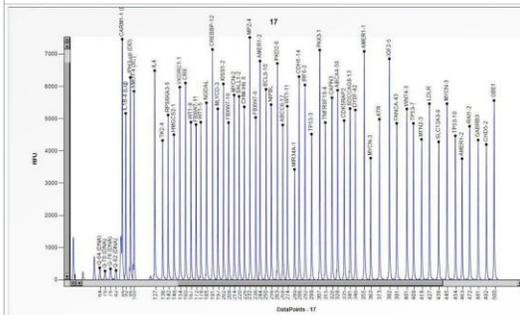
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 13%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK -4%
 RSO: OK
 RPQ: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSP18-4	01p36.33	01-001.129430	4879	38507	0.98	0.04	=	66	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	4200	38436	0.97	0.09	=	61	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	3427	26530	1.01	0.04	=	53	0.07	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	4358	38254	0.95	0.1	=	93	0.04	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	5302	47028	1.08	0.04	=	79	0.04	-
328	APCA4-50	01p22.1	01-094.231210	5893	48049	0.97	0.04	=	69	0.08	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	4503	31177	0.99	0.07	=	60	0.00	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	5912	43294	1.02	0.04	=	75	0.07	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	7519	56026	1.02	0.06	=	64	0.07	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	6077	42878	1.07	0.05	=	51	0.01	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	6045	46649	1.05	0.04	=	53	0.02	-
241	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	5312	43756	0.98	0.06	=	69	0.02	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	5732	41906	1.01	0.06	=	55	0.07	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	3777	31447	1.04	0.06	=	64	0.07	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	5484	49125	0.96	0.04	=	78	0.01	-
346	DYF-42	02p13.3	02-071.894010	5270	42169	0.98	0.05	=	55	0.07	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	7127	56501	0.99	0.04	=	61	0.04	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	6713	50860	1.02	0.06	=	66	0.01	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	4878	34442	0.94	0.06	=	56	0.01	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	4813	32838	0.89	0.05	=	48	0.02	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	5037	36452	0.99	0.07	=	57	0.04	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	6857	58706	1	0.06	=	92	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	5386	40742	0.96	0.05	=	56	0.01	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	4892	33568	0.99	0.08	=	58	0.03	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	4891	33683	1	0.04	=	53	0.02	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	7146	50841	1.09	0.04	=	64	0.03	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	4805	36646	0.99	0.05	=	50	0.00	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	5978	42858	0.98	0.04	=	64	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	5690	40635	0.99	0.04	=	49	0.06	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	4283	39505	0.99	0.04	=	92	0.01	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	4325	30219	1.06	0.05	=	61	0.03	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	6304	48116	0.99	0.05	=	60	0.05	-
197	MYL2-3	16q23.3	16-082.499340	5304	37963	1.03	0.06	=	56	0.02	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	4855	42834	1.02	0.06	=	86	0.04	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	4468	40015	1.01	0.04	=	67	0.02	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	4853	42478	1.03	0.04	=	88	0.05	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	4520	35872	0.99	0.05	=	70	0.06	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017.568050	4784	44742	0.94	0.06	=	77	0.04	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	5115	35159	1.02	0.05	=	63	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	3761	33071	1.01	0.05	=	57	0.04	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	6787	51222	0.98	0.05	=	54	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	7087	59220	1.03	0.07	=	77	0.01	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	5367	37753	0.92	0.06	=	50	0.02	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	5563	53108	0.91	0.06	=	79	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	4983	41853	1	0.05	=	103	0.03	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	5435	40402	0.98	0.04	=	55	0.07	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	6491	46149	0.97	0.05	=	76	0.08	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	4941	39721	1.04	0.04	=	59	0.00	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	5493	39761	0.99	0.06	=	70	0.04	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	4338	39761	0.97	0.04	=	72	0.04	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	5850	44834	1.03	0.06	=	54	0.02	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	5484	48980	1.03	0.04	=	93	0.00	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	6105	42843	1.04	0.04	=	64	0.00	-

Median value all probe values: **5304 41853 0.99 0.05 84 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

064/20 H

17

Analísada



Sample report: 18

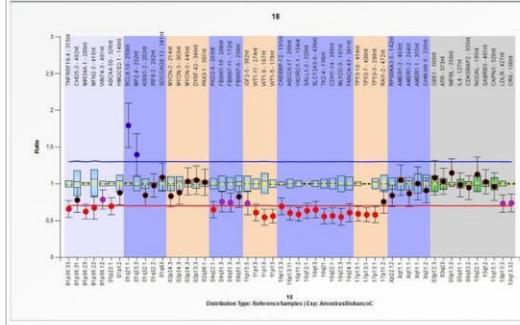
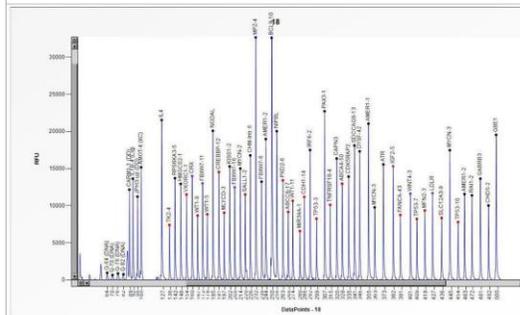
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-3)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 85%
 PSLP: Warning -19%
 RSQ: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK 75%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRFSP18-4	01p36.33	01-001.129430	10098	82787	0.66	0.06	<<*	72	0.01	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	10014	90383	0.76	0.08	=	85	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6575	52435	0.62	0.05	<<*	52	0.00	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	9339	81923	0.67	0.08	<<*	89	0.03	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	11611	101010	0.79	0.06	<<	63	0.02	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	13949	107441	0.7	0.06	<<*	60	0.06	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	12930	96264	0.88	0.08	=	61	0.00	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	32587	434975	1.79	0.15	>>*	65	0.20	-
233	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	32645	283581	1.4	0.14	>>*	61	0.09	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	15279	112714	0.84	0.07	=	61	0.00	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	17484	137411	0.98	0.08	=	46	0.06	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	18093	151647	1.09	0.1	=	59	0.05	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	14992	115874	0.83	0.07	=	60	0.04	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	9769	82350	0.88	0.08	=	60	0.06	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	17457	158837	1.03	0.09	=	105	0.01	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.694010	17306	136548	1.05	0.1	=	53	0.00	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	22715	184767	1.02	0.09	=	67	0.05	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	13404	103880	0.65	0.05	<<*	67	0.03	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	12458	90979	0.76	0.07	<<	44	0.04	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	12996	97227	0.74	0.06	<<	43	0.07	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	13224	125356	0.82	0.07	=	49	0.00	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	15299	131848	0.74	0.08	<<	96	0.04	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	10650	81556	0.67	0.06	<<*	50	0.01	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	8667	62546	0.54	0.05	<<*	43	0.06	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	8843	66623	0.56	0.05	<<*	51	0.06	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	14524	108856	0.69	0.06	<<*	45	0.05	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.163750	9148	70776	0.8	0.05	<<*	40	0.04	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	11491	86624	0.59	0.05	<<*	53	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	11501	90675	0.63	0.05	<<*	51	0.00	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	8336	76445	0.65	0.06	<<*	98	0.04	-
136	TK2-4	16q21	16-065.128370	7394	56505	0.56	0.05	<<*	57	0.02	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	11173	89531	0.57	0.05	<<*	65	0.01	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	9041	68758	0.55	0.06	<<*	60	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	8741	76508	0.67	0.06	<<*	70	0.01	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	7786	68443	0.59	0.05	<<*	53	0.04	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	8218	71070	0.58	0.05	<<*	54	0.02	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	8242	65430	0.58	0.05	<<*	63	0.03	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	11383	105635	0.76	0.08	=	85	0.02	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	13691	101571	0.84	0.08	=	65	0.09	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	11552	101071	1.05	0.1	=	80	0.03	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	18964	147513	0.87	0.09	=	53	0.00	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	21031	184031	1	0.11	=	83	0.04	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	16756	121993	0.91	0.08	=	58	0.01	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	19524	186468	1.08	0.12	=	99	0.02	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	15558	130954	1.03	0.09	=	75	0.02	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	20023	156918	1.15	0.09	=	44	0.06	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	21522	168121	0.99	0.08	=	91	0.00	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	13901	114948	0.95	0.08	=	72	0.06	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.866510	20071	152066	1.13	0.12	=	76	0.03	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	13629	123005	1.03	0.08	=	68	0.00	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	16339	130625	0.96	0.09	=	66	0.01	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	11664	104349	0.73	0.06	<<	87	0.01	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	13969	106396	0.74	0.06	<<	58	0.02	-

Median value all probe values: **12996 104349 0.78 0.07 61 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

396/10

18

Analizada também com pPCR



Sample report: 19

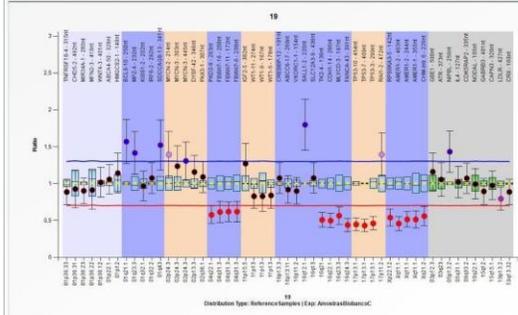
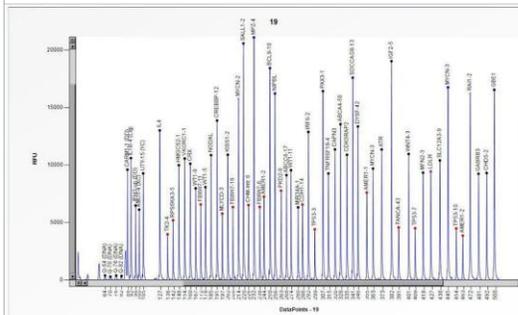
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 11%
 RQJ: OK
 RPO: Warning
 CAS: OK* 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	9256	73021	0.89	0.09	=	71	0.06	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	9294	82187	0.93	0.13	=	76	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6309	47436	0.9	0.09	=	57	0.00	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	9326	79640	0.91	0.13	=	93	0.00	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	10951	92366	1.02	0.1	=	67	0.00	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	13542	106362	1.06	0.1	=	63	0.00	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	9977	70093	1.14	0.14	=	60	0.07	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	18415	136775	1.57	0.15	>>*	62	0.06	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	21085	153411	1.42	0.16	>>*	70	0.05	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	10878	74223	0.97	0.1	=	48	0.01	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	12871	95356	1.07	0.1	=	52	0.02	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	17581	137902	1.52	0.17	>>*	61	0.04	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	15741	112204	1.39	0.16	>*	62	0.03	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	9681	76240	1.24	0.14	=	78	0.03	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	16739	144363	1.31	0.13	>>*	62	0.01	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.694010	13344	101842	1.16	0.11	=	53	0.01	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	16416	125351	1.09	0.11	=	70	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	7760	57216	0.58	0.06	<<*	63	0.04	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	6330	43278	0.61	0.07	<<*	28	0.08	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	6560	44544	0.62	0.07	<<*	46	0.05	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	6339	47010	0.62	0.07	<<*	52	0.01	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	19022	155639	1.27	0.14	=	97	0.02	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	9540	70590	0.83	0.08	=	52	0.02	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	7965	55388	0.83	0.1	=	61	0.11	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	8065	56065	0.84	0.09	=	59	0.06	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	13859	97839	1.07	0.1	=	53	0.01	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.163750	9106	68254	0.92	0.09	=	56	0.01	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	10554	76606	0.9	0.09	=	59	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	20556	148520	1.0	0.17	>>*	59	0.00	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	10392	90910	1.07	0.1	=	86	0.06	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	3970	28152	0.51	0.05	<<*	60	0.03	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	6550	48229	0.5	0.05	<<*	61	0.04	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	5767	40541	0.56	0.06	<<*	61	0.05	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	4561	38457	0.44	0.04	<<*	61	0.05	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	4472	37626	0.45	0.04	<<*	59	0.03	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	4488	37447	0.43	0.04	<<*	55	0.02	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	4397	35880	0.46	0.05	<<*	59	0.03	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017.568050	16204	147984	1.39	0.16	>*	95	0.03	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	5189	36254	0.54	0.06	<<*	63	0.03	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	3854	32017	0.46	0.05	<<*	56	0.03	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	7230	53578	0.51	0.05	<<*	54	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	7593	59145	0.51	0.06	<<*	55	0.01	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	6501	43979	0.56	0.07	<<*	39	0.03	-
500	GBE1	03p12.3	03-061.774630	16527	153001	1.16	0.13	=	102	0.02	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	11342	89414	1.05	0.11	=	75	0.02	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012060	16205	116288	1.43	0.14	>>*	60	0.04	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	12997	93748	1.02	0.1	=	75	0.03	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	10875	83401	1.07	0.1	=	69	0.03	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	10846	77128	0.99	0.1	=	66	0.06	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	9226	81170	0.89	0.09	=	65	0.03	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	11347	84078	0.98	0.1	=	57	0.02	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	9426	82471	0.79	0.08	<<	101	0.06	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	10101	73432	0.89	0.08	=	60	0.00	-

Median value all probe values: **9681 76606 0.82 0.1*** **61 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

773/09

19

Analísada também com pPCR



Sample report: 21

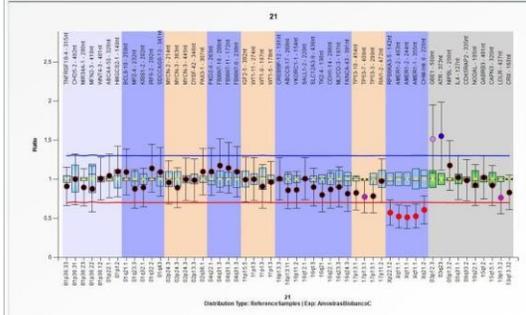
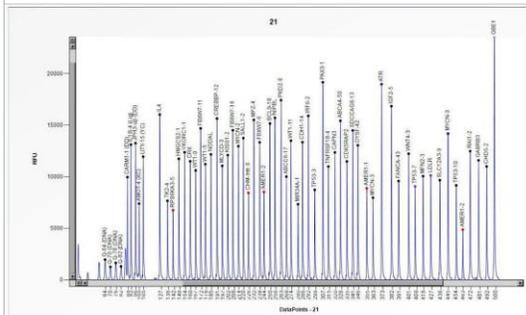
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 8%
 RSQ: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK? 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRSF18-4	15p36.33	01-001.129430	10989	90768	0.91	0.12	=	61	0.02	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.158950	11002	102367	1	0.16	=	84	0.00	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7336	59559	0.9	0.12	=	53	0.01	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	10059	90626	0.88	0.15	=	83	0.05	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	12234	109709	1.01	0.14	=	71	0.06	-
328	APC-A-50	01q22.1	01-094.231210	15429	127695	1.04	0.14	=	63	0.02	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	11742	85274	1.1	0.16	=	58	0.00	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	15163	120490	1.09	0.15	=	61	0.04	-
233	MZF4	01q23.3	01-159.542830	15516	120707	0.88	0.12	=	54	0.04	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	12097	89235	0.89	0.12	=	59	0.01	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	15909	125033	1.14	0.15	=	49	0.01	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	14493	122969	1.09	0.16	=	62	0.02	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	12968	98211	0.96	0.14	=	48	0.02	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	7972	65868	0.89	0.13	=	67	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	14181	126979	1	0.14	=	57	0.04	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.694010	13058	106719	0.99	0.13	=	53	0.05	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	19166	155407	1.1	0.15	=	73	0.00	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	17428	136960	1.1	0.15	=	58	0.02	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	14511	109033	1.17	0.17	=	65	0.01	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	14699	109956	1.14	0.16	=	56	0.03	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	13336	103503	1.1	0.16	=	53	0.02	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	16846	147802	0.99	0.14	=	96	0.02	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	13499	104500	1	0.14	=	53	0.03	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	10617	77296	0.91	0.14	=	53	0.00	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	11221	83700	0.96	0.13	=	55	0.04	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	15650	116710	1.01	0.13	=	59	0.01	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.163750	10017	79943	0.86	0.12	=	56	0.02	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	12377	92852	0.86	0.12	=	61	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	13748	103869	1.01	0.13	=	64	0.01	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	9669	91109	0.9	0.12	=	92	0.01	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	7667	57853	0.8	0.11	=	62	0.04	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	13553	108644	0.87	0.12	=	61	0.03	-
197	MYL2-3	16q23.3	16-082.499340	11062	83483	0.9	0.13	=	58	0.04	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	9586	84960	0.81	0.11	=	73	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	9153	82778	0.83	0.11	=	69	0.05	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	9061	80875	0.77	0.1	<<	83	0.04	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	8732	71175	0.76	0.11	=	61	0.02	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	12483	120901	0.98	0.14	=	85	0.04	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	6758	49411	0.57	0.08	<<<	64	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	4873	42625	0.52	0.07	<<<	50	0.05	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	8529	68481	0.57	0.07	<<<	54	0.00	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	8880	76409	0.53	0.08	<<<	61	0.05	-
226	CHM1mir_6	Xq21.2	X-085.101110	8436	69555	0.61	0.09	<<<	49	0.02	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	23511	231556	1.57	0.22	>>	104	0.01	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	18979	162899	1.55	0.22	>>>	86	0.02	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	15712	123070	1.18	0.16	=	61	0.02	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	16037	120556	1.02	0.14	=	81	0.00	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	11490	93597	0.98	0.13	=	58	0.05	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	12172	92530	0.92	0.13	=	68	0.04	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	11590	109580	1.02	0.14	=	78	0.03	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	12361	97966	0.92	0.13	=	55	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	10131	93473	0.76	0.1	<<	76	0.01	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	11500	85886	0.83	0.11	=	58	0.01	-

Median value all probe values: 12172 97896 0.96 0.13* 61 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrc Holland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

694/09	21	Analísada
--------	----	-----------



Sample report: 22

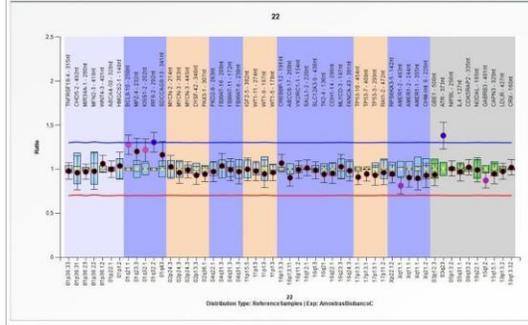
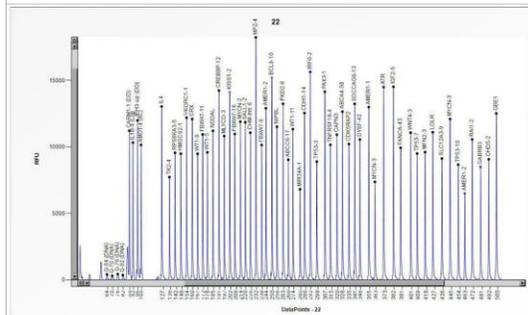
Project: Amnras/BobancoC | Experiment: Amnras/BobancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software Version: v.220513.1739

Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-9)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 3%
 RSG: OK
 RPQ: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	10167	79090	0.98	0.05	=	89	0.02	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	9074	80371	0.96	0.1	=	87	0.08	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6824	52271	0.97	0.04	=	51	0.00	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	9618	81436	0.98	0.1	=	82	0.05	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	11077	93736	1.06	0.05	=	75	0.04	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	12663	99076	1	0.05	=	70	0.02	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	9499	65926	1.04	0.08	=	62	0.01	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	15210	111236	1.28	0.06	>>	61	0.01	-
232	MZF4	01q23.3	01-159.542830	18247	133643	1.2	0.08	=	66	0.00	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	14120	100725	1.22	0.06	>>	63	0.01	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	15650	116178	1.31	0.06	>>*	48	0.02	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	13248	106468	1.16	0.08	=	59	0.07	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	11905	85756	1.03	0.06	=	43	0.01	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	7378	57643	0.96	0.06	=	59	0.05	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	12110	107136	0.99	0.05	=	95	0.05	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.894010	10564	80609	0.93	0.05	=	55	0.05	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	14158	107944	0.94	0.04	=	66	0.00	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	13252	97108	0.97	0.06	=	65	0.05	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	10981	77073	1.04	0.07	=	64	0.02	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	10948	75221	0.99	0.06	=	47	0.00	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	10153	74208	0.97	0.07	=	52	0.07	-
382	IGFBP2-5	11p15.5	11-002.118910	14535	120548	1	0.06	=	91	0.03	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	11346	83494	0.98	0.06	=	54	0.01	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	9487	66760	0.95	0.08	=	50	0.07	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	9601	67894	0.96	0.05	=	64	0.00	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	14246	100352	1.07	0.05	=	48	0.02	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.183750	9043	69074	0.9	0.05	=	58	0.00	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013380	12205	87496	0.99	0.05	=	61	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	11865	85750	1.01	0.04	=	65	0.03	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	9134	80375	0.99	0.05	=	97	0.01	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	7735	56153	0.94	0.05	=	58	0.05	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	12566	94687	0.95	0.06	=	63	0.05	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	10827	75762	1.03	0.07	=	57	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	9943	83964	0.98	0.06	=	82	0.01	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514890	8671	75974	0.91	0.04	=	81	0.02	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	9507	79975	0.95	0.04	=	75	0.02	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	8902	68399	0.93	0.06	=	64	0.06	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	10569	97825	0.96	0.07	=	92	0.01	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	9571	68717	0.94	0.05	=	68	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326880	6506	54897	0.81	0.05	<<	63	0.01	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	12922	94206	0.9	0.05	=	52	0.05	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	13003	104303	0.9	0.07	=	66	0.03	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	11077	76560	0.93	0.07	=	49	0.01	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	12530	117897	0.94	0.06	=	96	0.01	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	14507	117502	1.38	0.08	>>*	83	0.01	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012060	11529	83843	1.01	0.04	=	57	0.04	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	13047	94145	0.97	0.05	=	83	0.03	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	10230	78964	1.02	0.04	=	63	0.05	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	11218	79791	0.99	0.07	=	66	0.01	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	8487	76019	0.87	0.04	<<	72	0.00	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	10930	82244	0.95	0.06	=	57	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	11110	94993	0.97	0.05	=	95	0.01	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	12105	86453	1.02	0.04	=	59	0.02	-

Median value all probe values: 11077 83494 0.98 0.06 84 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

171/05	22	Analisaada também com pPCR
---------------	-----------	----------------------------



Sample report: 23

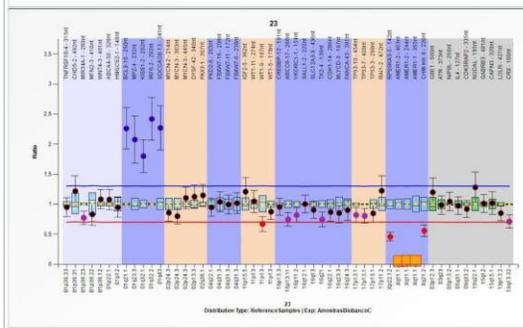
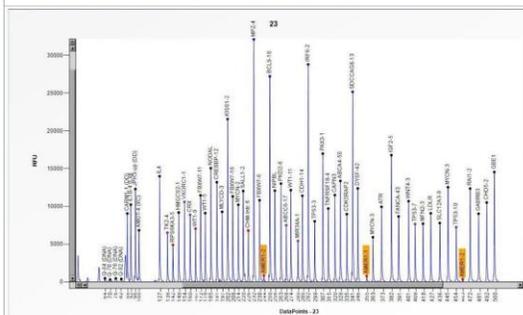
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-1)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 50/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 13%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 85%
 PSLP: OK 14%
 RSO: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK 75%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001,129430	9708	76320	0.95	0.08	=	71	0.07	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006,150850	10502	92425	1.22	0.13	=	96	0.02	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009,134420	5427	45606	0.77	0.06	<<	50	0.03	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011,971940	7711	65856	0.83	0.09	=	90	0.06	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022,320550	10696	90206	1.08	0.08	=	75	0.06	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094,231210	13360	106376	1.08	0.08	=	62	0.02	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120,113020	9189	64812	0.95	0.08	=	58	0.01	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145,562810	27213	197943	2.26	0.17	>>	64	0.00	-
232	MPTP4	01q23.3	01-159,542830	32104	233738	2.06	0.2	>>	56	0.02	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202,428550	21561	153768	1.8	0.14	>>	63	0.02	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208,042100	28799	219515	2.42	0.18	>>	56	0.09	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241,608730	25161	201861	2.27	0.18	>>	68	0.08	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015,099780	10213	73532	0.86	0.07	=	47	0.05	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016,003140	5917	46533	0.8	0.06	=	78	0.02	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016,003310	12531	109129	1.1	0.09	=	71	0.03	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071,694010	12379	94122	1.13	0.1	=	51	0.05	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222,671610	16984	129881	1.15	0.09	=	67	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089,186880	13013	96500	0.95	0.08	=	68	0.01	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153,463560	11328	80884	1.04	0.09	=	64	0.00	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153,471370	11457	80566	0.99	0.08	=	45	0.03	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153,493220	10811	83637	1.02	0.09	=	64	0.01	-
382	IGFBP2-5	11p15.5	11-002,118910	16784	139710	1.21	0.12	=	92	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032,366630	12152	88998	1.05	0.09	=	51	0.03	-
167	WT1-9	11p13	11-032,370830	7055	47646	0.67	0.06	<<	32	0.01	-
178	WT1-5	11p13	11-032,395710	9110	64968	0.88	0.07	=	42	0.04	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003,764660	13198	91490	0.95	0.07	=	46	0.00	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016,163750	7506	57688	0.75	0.06	<<	37	0.04	-
164	VRCORC1-1	16p11.2	16-031,013360	10593	76071	0.82	0.06	<<	67	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049,732800	12035	90147	1	0.07	=	53	0.01	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055,469530	7799	69658	0.9	0.07	=	86	0.01	-
136	TN2-4	16q21	16-065,128370	6515	47203	0.75	0.06	<<	59	0.04	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067,419590	11461	84470	0.87	0.08	=	60	0.01	-
197	MYLCD-3	16q23.3	16-082,499340	9276	66695	0.85	0.08	=	52	0.04	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088,331930	8667	74098	0.9	0.08	=	91	0.03	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007,514690	7241	62977	0.82	0.06	<<	69	0.03	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007,517800	7657	63846	0.81	0.06	<<	56	0.04	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007,520080	8027	61974	0.85	0.07	=	67	0.01	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017,568050	12362	114767	1.22	0.12	=	93	0.00	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020,123050	4908	33620	0.46	0.04	<<	47	0.00	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063,326860	361	2925	5%		<<	29	0.02	-
244	AMER1-1	Xq11.1	X-063,329590	849	7167	6%		<<	33	0.05	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063,342160	782	7376	6%		<<	53	0.04	-
226	CHM1intr_6	Xq21.2	X-085,101110	6794	47674	6.56	0.05	<<	49	0.05	-
500	GBE1	03p12.3	03-061,774630	14549	135094	1.2	0.12	=	95	0.01	-
373	ATR	03q23	03-143,651080	9942	80053	0.99	0.08	=	81	0.01	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037,01260	12078	89279	1.04	0.08	=	51	0.02	-
127	IL4	05q31.1	05-132,037620	13993	101403	0.98	0.07	=	76	0.00	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122,370430	8976	70116	0.92	0.07	=	66	0.06	-
185	NODAL	10q22.1	10-071,865510	15059	110923	1.28	0.13	=	71	0.04	-
481	GABRB3	15q12	15-024,344330	9029	80638	1.01	0.07	=	66	0.07	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040,490380	11501	85591	1.02	0.09	=	56	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011,095270	9090	78730	0.85	0.06	=	97	0.11	-
160	CRX	19q13.32	19-053,029580	8884	64100	0.71	0.05	<<	56	0.02	-

Median value all probe values: 10502 80566 0.95 0.08 63 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrc Holland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

013/05

23

Analisaada também com pPCR



Sample report: 24

Project: AmnstrauBibancoC | Experiment: AmnstrauBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

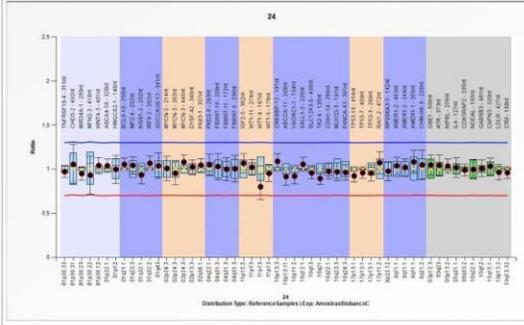
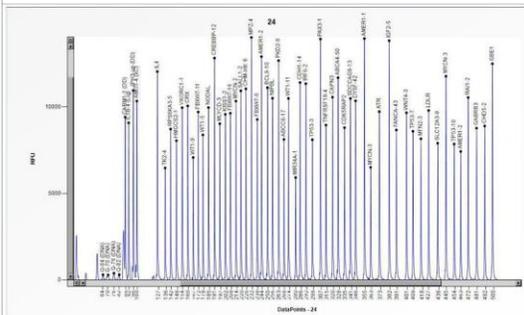
Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 12%

FRS: OK 100%
 FMS: OK 100%
 PSLP: OK 2%
 RQ: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%

Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFR5P18-4	01p36.33	01-001.129430	8939	67269	0.97	0.03	=	62	0.03	-
492	MIR24-2	01q35.31	01-006.150850	8885	76878	1.05	0.11	=	70	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	5910	44571	0.95	0.04	=	54	0.00	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	8151	67337	0.93	0.11	=	80	0.06	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	9651	79858	1.04	0.05	=	66	0.07	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	11675	90972	1.04	0.04	=	71	0.04	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	8040	55214	1	0.08	=	59	0.07	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	11101	80232	1.05	0.04	=	61	0.04	-
232	MIR24-2	01q35.31	01-006.150850	8885	76878	1.05	0.11	=	70	0.01	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	9561	66648	0.93	0.05	=	61	0.02	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	11326	83351	1.07	0.04	=	51	0.07	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	10477	84419	1.04	0.07	=	60	0.03	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	10320	73411	1.01	0.07	=	59	0.07	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	6499	50858	0.95	0.07	=	56	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	11759	100548	1.08	0.04	=	66	0.06	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.694010	10335	80739	1.03	0.04	=	58	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	13907	103828	1.05	0.04	=	70	0.03	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	12659	92021	1.05	0.06	=	64	0.05	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	9623	67342	1.03	0.07	=	57	0.11	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	9696	65754	1	0.07	=	49	0.07	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	9265	67365	1	0.08	=	54	0.02	-
382	IGFBP2-5	11p15.5	11-002.118910	13808	112404	1.07	0.05	=	93	0.03	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	10480	76300	1.02	0.04	=	52	0.04	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	7065	47801	0.8	0.07	=	32	0.11	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	8371	58335	0.95	0.05	=	58	0.09	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	12805	89111	1.09	0.04	=	58	0.07	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.183750	8109	60525	0.92	0.05	=	57	0.03	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	9943	76938	0.92	0.04	=	56	0.09	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	10917	77105	1.06	0.04	=	59	0.06	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	7890	68083	0.96	0.03	=	85	0.01	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	6465	45963	0.89	0.03	=	60	0.04	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	11394	83918	0.98	0.04	=	64	0.06	-
197	MYL2-3	16q23.3	16-082.499340	9017	63621	0.97	0.05	=	55	0.04	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	8655	72000	0.96	0.04	=	73	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	7845	66012	0.92	0.04	=	69	0.01	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	8580	70053	0.96	0.03	=	62	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	8095	60823	0.96	0.05	=	64	0.02	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	10530	96258	1.07	0.06	=	106	0.08	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	8712	59038	0.98	0.05	=	51	0.02	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	7414	61426	1.04	0.05	=	58	0.05	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	12893	93334	1.02	0.05	=	53	0.05	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	13932	111408	1.08	0.07	=	75	0.01	-
226	CHM1mir_6	Xq21.2	X-085.101110	11031	76307	1.05	0.08	=	58	0.11	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	12480	113083	1.05	0.06	=	103	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	9715	76640	1.04	0.06	=	68	0.01	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	10488	75423	1.03	0.04	=	44	0.03	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	12028	85021	1.02	0.06	=	68	0.01	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	8790	69951	0.99	0.03	=	67	0.01	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	9949	70360	1	0.05	=	63	0.10	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	8762	77072	1.01	0.05	=	78	0.02	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	10550	78945	1.03	0.05	=	56	0.02	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	9779	81912	0.96	0.04	=	64	0.06	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	10046	71912	0.96	0.03	=	59	0.09	-

Median value all probe values: 9779 75423 1.01 0.05 80 0.04

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>. Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

279/14

24

Analísada



Sample report: 26

Project: AmnstrauBioBancoC | Experiment: AmnstrauBioBancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization
Date

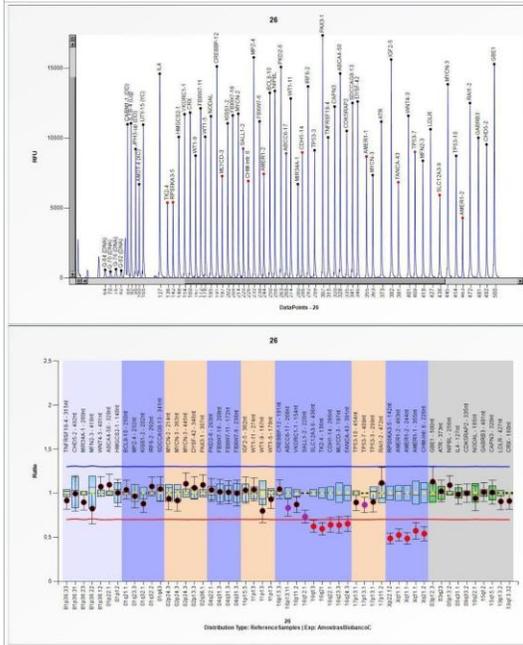
MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC, On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK -1%
 R8Q: OK
 R9Q: OK
 CAS: OK 100%

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRFSP18-4	01p36.33	01-001.129430	10042	75270	0.92	0.05	=	69	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.156850	9543	80107	0.99	0.1	=	63	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6705	48253	0.9	0.05	=	54	0.05	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	8375	68835	0.82	0.09	=	85	0.02	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	11591	94830	1.07	0.06	=	79	0.03	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	14613	111241	1.1	0.06	=	70	0.07	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	10082	67955	1	0.08	=	54	0.00	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	13233	92121	1.04	0.05	=	58	0.00	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	15765	110717	0.97	0.07	=	54	0.02	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	11051	75444	0.88	0.05	=	58	0.02	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	13687	100133	1.08	0.05	=	48	0.08	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	12507	95341	1.05	0.07	=	65	0.03	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.599780	11734	80816	0.94	0.06	=	48	0.05	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	7345	56205	0.92	0.06	=	58	0.07	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	13845	116152	1.11	0.06	=	64	0.05	-
346	DYF-42	02p13.3	02-071.694010	12609	91174	1.06	0.06	=	47	0.02	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	17337	128991	1.09	0.06	=	60	0.06	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	15080	107024	1.04	0.06	=	57	0.02	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	11621	77971	1.02	0.07	=	45	0.00	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	12123	82432	1.01	0.07	=	43	0.03	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	11193	79437	1	0.07	=	53	0.02	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	15612	126614	1.03	0.07	=	93	0.05	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	12825	90882	1.04	0.07	=	45	0.02	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	8740	57607	0.8	0.07	=	36	0.00	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	10095	71773	0.93	0.05	=	58	0.04	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	15120	102889	1.05	0.05	=	44	0.00	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	8900	64250	0.83	0.05	<<	59	0.03	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	11702	81950	0.87	0.05	=	53	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	9242	63854	0.73	0.04	<<	47	0.02	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	5919	49689	0.62	0.03	<<*	83	0.03	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	5379	37529	0.6	0.03	<<*	60	0.04	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	8968	63418	0.64	0.04	<<*	51	0.00	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	7278	50541	0.64	0.05	<<*	52	0.04	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	6841	54162	0.65	0.04	<<*	65	0.04	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	8723	72470	0.89	0.05	=	62	0.03	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	9009	74038	0.87	0.04	<<	55	0.02	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	9121	67105	0.9	0.06	=	54	0.00	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	12502	109389	1.12	0.09	=	89	0.01	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	5409	36412	0.49	0.03	<<*	45	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	4292	34710	0.53	0.03	<<*	46	0.02	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	7434	54156	0.49	0.03	<<*	53	0.04	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	8679	65932	0.57	0.05	<<*	62	0.02	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	6925	47427	0.64	0.04	<<*	51	0.05	-
500	GBE1	03p12.3	03-061.774630	15266	137458	1.13	0.08	=	96	0.01	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	11170	84926	1.02	0.06	=	77	0.03	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	13368	95846	1.09	0.05	=	57	0.02	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	14596	102376	0.99	0.06	=	71	0.00	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	10507	77713	1	0.05	=	51	0.00	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	11557	81249	0.94	0.07	=	66	0.05	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	10022	85838	1.01	0.05	=	77	0.03	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	12248	89306	1.01	0.07	=	55	0.08	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	10628	88261	0.91	0.05	=	96	0.04	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	11821	81900	0.91	0.05	=	56	0.02	-

Median value all probe values: 11051 80107 0.94 0.05 57 0.02



Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcolland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

218/05

26

Analísada



Sample report: 27

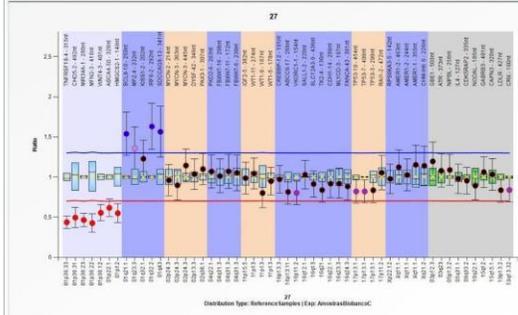
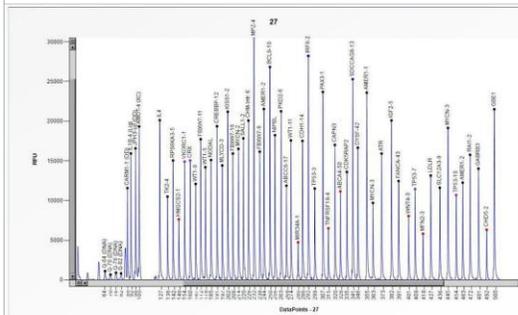
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC, On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 90%
 PSLP: OK 3%
 RSO: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK? 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSP18-4	01p36.33	01-001.129430	6499	57371	0.44	0.04	<<*	66	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.158950	6317	58507	0.49	0.06	<<*	70	0.04	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	4741	41764	0.47	0.04	<<*	49	0.02	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	5810	52697	0.43	0.06	<<*	81	0.05	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	8051	72648	0.55	0.05	<<*	66	0.07	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	11159	94614	0.62	0.05	<<*	60	0.02	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	7643	58959	0.55	0.06	<<*	56	0.03	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	26831	212629	1.54	0.13	>>*	60	0.02	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	30449	244616	1.36	0.13	>*	54	0.02	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	21198	163532	1.23	0.12	=	62	0.01	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	28231	233627	1.63	0.14	>>*	56	0.01	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	25300	227856	1.56	0.16	>>*	60	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	18516	128375	0.96	0.1	=	47	0.04	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	9704	84831	0.9	0.09	=	66	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	19151	177726	1.14	0.1	=	63	0.02	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.694010	16664	142208	1.04	0.1	=	59	0.06	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	23691	201024	1.1	0.1	=	71	0.00	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	21252	172225	1.07	0.1	=	64	0.00	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	15924	127268	1.01	0.1	=	64	0.01	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	17333	136334	1.07	0.11	=	46	0.01	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	16163	129861	1.05	0.11	=	51	0.02	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	20102	178573	0.99	0.1	=	90	0.03	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	17582	142363	1.04	0.1	=	56	0.04	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	12100	89825	0.8	0.09	=	35	0.03	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	14204	109147	0.95	0.09	=	37	0.01	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	19368	151304	0.97	0.09	=	46	0.02	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.163750	11871	96995	0.81	0.08	=	46	0.04	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	14911	118148	0.8	0.07	<<	65	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	17837	144224	1.03	0.09	=	63	0.01	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	11610	110190	0.91	0.08	=	79	0.01	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	10496	82580	0.84	0.08	=	61	0.05	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	17516	144574	0.92	0.09	=	62	0.02	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	14429	113356	0.92	0.09	=	56	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	12462	114938	0.88	0.08	=	78	0.05	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	10695	96279	0.82	0.07	<<	62	0.02	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	11450	104639	0.82	0.07	<<	66	0.04	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	11514	94843	0.84	0.08	=	63	0.02	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	15762	154313	1.05	0.11	=	87	0.00	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	15052	116992	0.98	0.09	=	66	0.08	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	12260	11501	1.12	0.11	=	75	0.02	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	21541	178107	1.03	0.1	=	56	0.05	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	23604	214209	1.15	0.12	=	85	0.04	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	20076	153429	1.14	0.12	=	57	0.05	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	21506	219002	1.2	0.12	=	115	0.06	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	15919	140976	1.08	0.1	=	85	0.04	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	18239	146371	1.09	0.1	=	49	0.01	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	20130	163842	0.98	0.09	=	90	0.10	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	13613	116301	0.95	0.08	=	70	0.05	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	15110	121368	0.89	0.09	=	67	0.02	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	14027	132334	1.06	0.1	=	66	0.01	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	17012	141062	1.03	0.1	=	58	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	13153	123435	0.84	0.07	=	78	0.00	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	15043	118630	0.84	0.07	<<	58	0.01	-

Median value all probe values: 15762 128875 0.98 0.09 63 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

540/09

27

Analísada



Sample report: 28

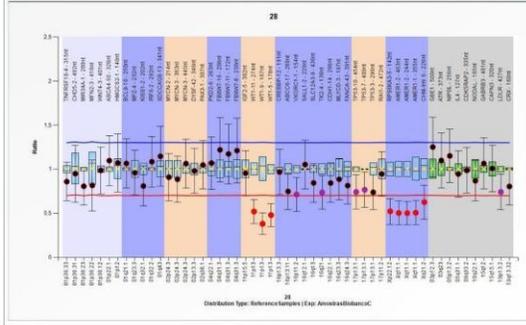
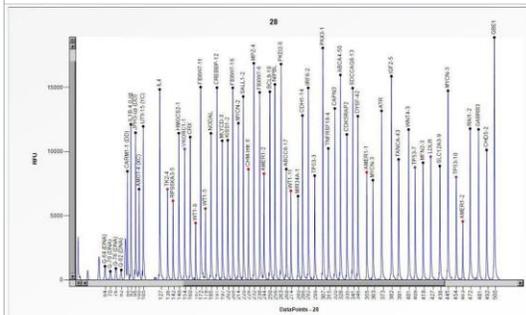
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-9)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 7%
 RBQ: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK? 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRFSP18-4	01p36.33	01-001.129430	10253	82256	0.86	0.11	=	68	0.00	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	10131	91548	0.95	0.16	=	78	0.00	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6535	51021	0.81	0.11	=	54	0.02	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	9136	79984	0.82	0.14	=	91	0.09	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	11721	102185	0.99	0.13	=	77	0.06	-
328	ABCA4-50	01p22.1	01-094.231210	15977	125498	1.1	0.14	=	65	0.01	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	11444	82788	1.07	0.16	=	61	0.02	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	14675	111642	1.07	0.14	=	65	0.00	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	16891	126264	0.96	0.13	=	58	0.01	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	10890	75502	0.81	0.11	=	46	0.05	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	14976	118417	1.08	0.14	=	58	0.05	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	14956	119347	1.15	0.17	=	63	0.02	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	12222	89302	0.91	0.13	=	46	0.08	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	7776	61843	0.89	0.13	=	64	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	14754	131913	1.06	0.14	=	70	0.06	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.894010	12763	98334	0.98	0.13	=	50	0.02	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	18986	142453	1.05	0.14	=	67	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	16826	128790	1.07	0.15	=	65	0.07	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	14980	107059	1.22	0.18	=	48	0.05	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	15035	112303	1.17	0.17	=	63	0.04	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	14620	109994	1.21	0.18	=	59	0.03	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	15879	135660	0.95	0.13	=	92	0.06	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	6952	52554	0.82	0.07	<<*	47	0.02	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	4436	30886	0.38	0.06	<<*	35	0.00	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	5559	40587	0.48	0.07	<<*	51	0.01	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	14994	108023	0.97	0.13	=	49	0.01	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.183750	8641	67513	0.75	0.1	=	58	0.01	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013380	10212	77384	0.74	0.1	<<*	59	0.05	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	14297	105093	1.05	0.14	=	50	0.00	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	8877	80710	0.84	0.11	=	98	0.06	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	7078	51479	0.74	0.1	<<*	61	0.00	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	12817	101250	0.84	0.11	=	60	0.05	-
197	MYLC2-3	16q23.3	16-082.499340	10849	79354	0.89	0.12	=	58	0.04	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	9397	81218	0.81	0.11	=	76	0.06	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514890	8019	70869	0.74	0.1	<<*	71	0.03	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	8773	76282	0.77	0.1	<<*	55	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	8127	63016	0.74	0.1	=	59	0.00	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	11793	110971	0.95	0.13	=	88	0.04	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	6171	43536	0.52	0.07	<<*	54	0.02	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326880	4563	38761	0.5	0.07	<<*	48	0.09	-
244	AMER1-1	Xq11.1	X-063.329590	8288	64706	0.5	0.07	<<*	55	0.08	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	8395	68234	0.81	0.07	<<*	61	0.04	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	8637	59982	0.63	0.1	<<*	49	0.03	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	18907	181813	1.25	0.17	=	105	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	13184	106289	1.1	0.16	=	79	0.01	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	15247	115568	1.15	0.15	=	60	0.00	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	14850	110614	0.94	0.13	=	87	0.02	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	11339	90173	0.99	0.13	=	58	0.06	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	11430	85258	0.87	0.11	=	65	0.01	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	11735	108883	1.06	0.14	=	80	0.08	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	13364	101282	1.01	0.13	=	55	0.01	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	9609	85654	0.74	0.1	<<*	93	0.10	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	11138	81723	0.8	0.1	=	61	0.03	-

Median value all probe values: 11430 89302 0.91 0.13* 61 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

037/06	28	Analísada também com pPCR
---------------	-----------	----------------------------------



Sample report: 30

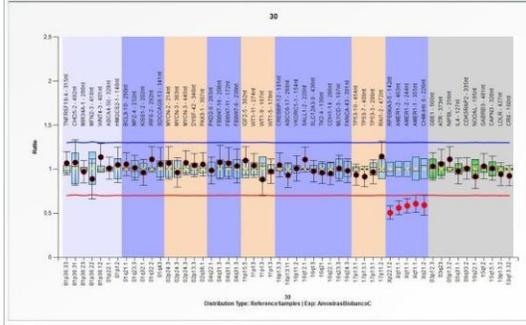
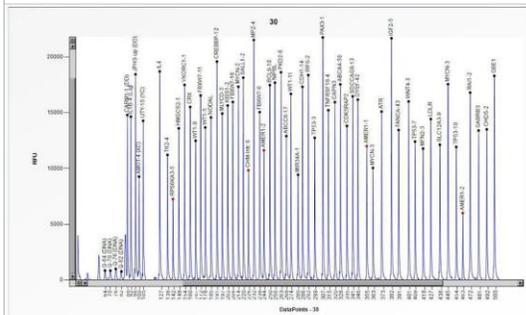
Project: AmnstrasBioBancoC | Experiment: AmnstrasBioBancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilm's tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 2%
 RSO: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	15210	126410	1.07	0.07	=	73	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	13489	125794	1.08	0.13	=	83	0.04	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	9423	77469	0.97	0.06	=	61	0.01	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	11772	105278	0.89	0.11	=	75	0.00	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	15992	142356	1.14	0.08	=	81	0.00	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	17527	146264	1.01	0.06	=	64	0.05	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	13589	99782	1.05	0.1	=	63	0.00	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	17481	135505	1.06	0.07	=	60	0.06	-
232	MZF4	01q23.3	01-159.542830	21495	166764	1.01	0.07	=	56	0.05	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	15630	114198	0.96	0.07	=	47	0.01	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	18355	146629	1.11	0.07	=	49	0.01	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	16451	135285	1.06	0.09	=	57	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	17310	130259	1.07	0.09	=	48	0.03	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	10035	83478	0.96	0.08	=	67	0.00	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	17547	158208	1.07	0.07	=	60	0.00	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.894010	16152	130345	1.04	0.07	=	61	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	21732	176518	1.05	0.07	=	67	0.03	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	18608	145666	0.99	0.08	=	60	0.03	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	15946	118199	1.08	0.1	=	46	0.01	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	16531	123296	1.07	0.09	=	47	0.03	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	15037	116816	1.04	0.1	=	54	0.01	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	21658	187813	1.1	0.08	=	97	0.04	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	16673	131105	1.04	0.07	=	61	0.03	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	12476	89486	0.88	0.09	=	33	0.00	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	13662	106375	0.97	0.07	=	62	0.05	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	19567	143053	1.05	0.07	=	45	0.00	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.183750	12890	104521	0.93	0.07	=	57	0.01	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	17477	132383	1.01	0.07	=	60	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	18125	136868	1.11	0.07	=	61	0.00	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	12114	114236	0.98	0.06	=	91	0.06	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	11199	85358	0.96	0.06	=	59	0.06	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	17302	135545	0.95	0.06	=	69	0.03	-
197	MYL2-3	16q23.3	16-082.499340	14910	114541	1.01	0.07	=	55	0.04	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	13434	121167	0.98	0.07	=	82	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	11918	105752	0.94	0.06	=	53	0.01	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	12397	108649	0.91	0.06	=	53	0.02	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	12732	102300	0.97	0.07	=	68	0.01	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	16787	164020	1.14	0.09	=	87	0.00	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	7251	53135	0.51	0.04	<<*	56	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326880	5989	51707	0.56	0.04	<<*	55	0.01	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	11620	90952	0.58	0.04	<<*	55	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	11993	101961	0.61	0.05	<<*	64	0.04	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	8626	71219	0.89	0.06	<<*	49	0.03	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	18283	178605	1.03	0.08	=	96	0.04	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	15087	128670	1.06	0.08	=	86	0.05	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	17872	138231	1.11	0.07	=	64	0.03	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	16866	143302	0.98	0.07	=	97	0.00	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	13799	112279	1.01	0.06	=	61	0.02	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	14560	112442	0.92	0.07	=	64	0.05	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	13389	123911	1.03	0.07	=	76	0.01	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	15934	125045	1.01	0.07	=	57	0.02	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	14419	132174	0.94	0.06	=	79	0.05	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	15492	116488	0.92	0.06	=	58	0.01	-

Median value all probe values: 15210 123911 1.01 0.07 61 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilm's tumour product description.

757/06

30

Analísada



Sample report: 31

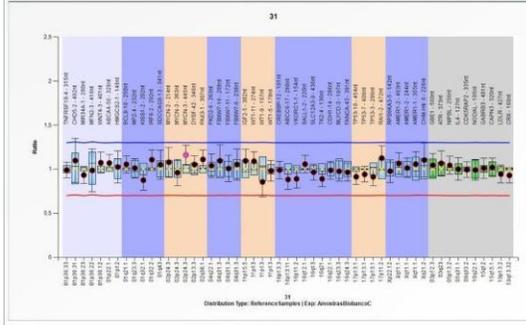
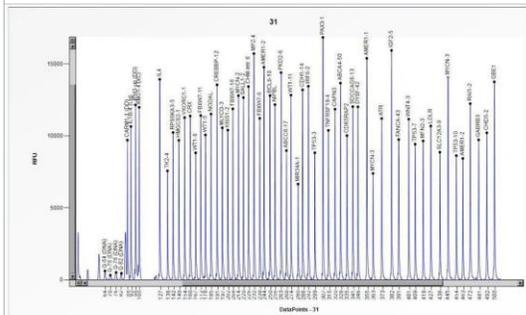
Project: AmnstrauBibancoC | Experiment: AmnstrauBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK -3%
 RSO: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%

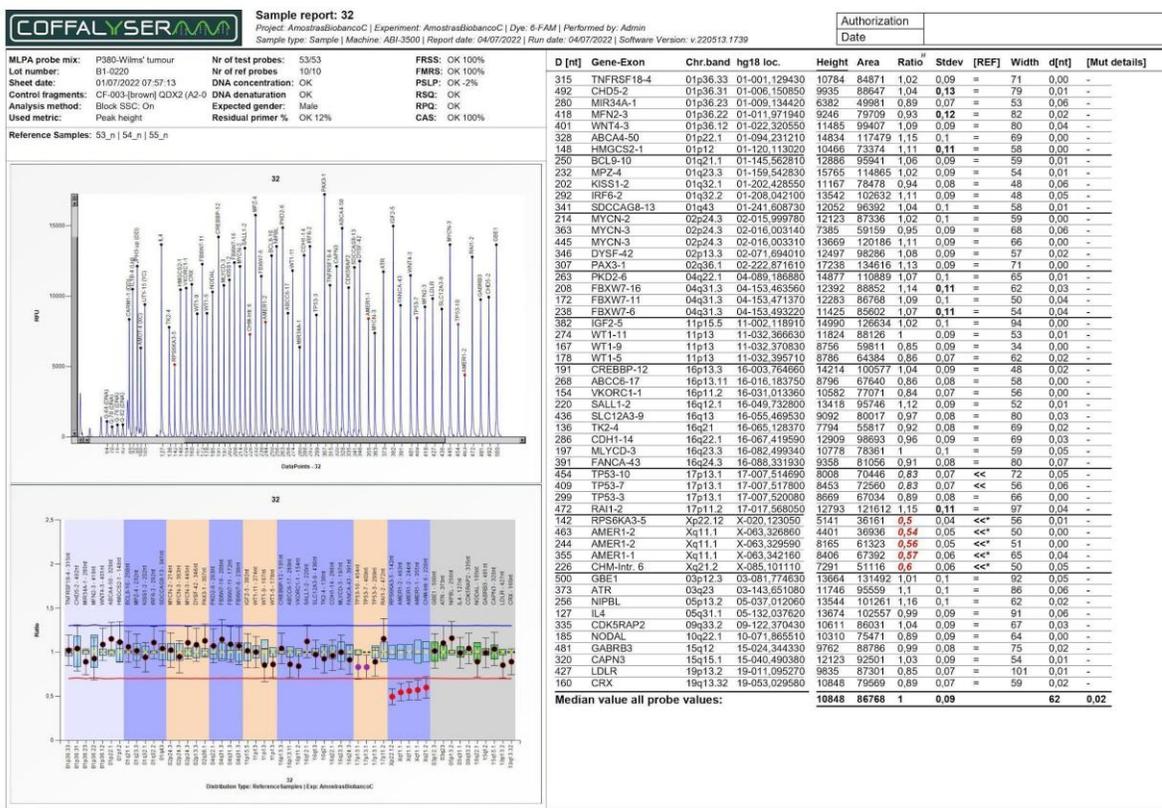


D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	10387	80906	0.99	0.04	=	72	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	10217	88641	1.1	0.12	=	66	0.09	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6657	50465	0.93	0.05	=	57	0.07	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	9657	80187	0.99	0.12	=	73	0.05	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	11169	91670	1.07	0.06	=	66	0.07	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	13675	107934	1.07	0.05	=	64	0.06	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	9700	68051	1.02	0.09	=	62	0.00	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	12803	95001	1.05	0.05	=	59	0.03	-
232	MZF4	01q23.3	01-159.542830	15722	115892	1.01	0.05	=	53	0.09	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	10408	71918	0.88	0.06	=	45	0.01	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	13456	101688	1.11	0.06	=	47	0.09	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	12036	95173	1.05	0.08	=	58	0.00	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	12802	91240	1.08	0.08	=	49	0.04	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	7396	58951	0.96	0.07	=	54	0.00	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	14067	120565	1.16	0.05	>>	67	0.03	-
346	DYF-42	02p13.3	02-071.894010	12023	92307	1.05	0.05	=	55	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	16846	129115	1.11	0.05	=	62	0.06	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	14402	108205	1.04	0.07	=	66	0.10	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	11885	83941	1.1	0.09	=	48	0.09	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	11423	80124	1.01	0.07	=	44	0.03	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	11224	81385	1.05	0.09	=	53	0.04	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	15943	129189	1.09	0.06	=	83	0.03	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	12833	94020	1.09	0.05	=	52	0.05	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	8827	62168	0.86	0.08	=	53	0.02	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	10073	74501	0.98	0.06	=	65	0.01	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	13554	99113	0.99	0.05	=	61	0.03	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	8984	68995	0.88	0.06	=	57	0.06	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	11280	82145	0.89	0.05	=	62	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	12667	91297	1.06	0.05	=	55	0.02	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	8873	76398	0.97	0.04	=	88	0.00	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	7571	54402	0.89	0.04	=	63	0.04	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	13204	98609	0.99	0.05	=	69	0.02	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	10569	75794	0.98	0.06	=	55	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	9751	82266	0.96	0.05	=	78	0.05	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	8831	72735	0.91	0.04	=	51	0.04	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	9430	76574	0.94	0.04	=	58	0.04	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	8836	68315	0.91	0.05	=	73	0.01	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	12447	111636	1.13	0.07	=	92	0.03	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	10240	70835	0.98	0.06	=	59	0.00	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	8438	70639	1.06	0.06	=	63	0.04	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	14780	108952	1.01	0.05	=	54	0.06	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	15396	121310	1.06	0.07	=	63	0.04	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	13432	92756	1.1	0.1	=	50	0.06	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	13760	126779	1.05	0.07	=	86	0.01	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	11213	87705	1.07	0.07	=	80	0.04	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012060	12179	89498	1.04	0.05	=	46	0.09	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	13935	99785	1	0.06	=	68	0.01	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	10028	77778	0.99	0.05	=	65	0.02	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	11526	83055	0.99	0.06	=	63	0.00	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	9729	85498	1.01	0.06	=	65	0.03	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	11860	88414	1.02	0.05	=	57	0.02	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	10894	90326	0.94	0.05	=	85	0.01	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	11391	82555	1.03	0.04	=	59	0.00	-

Median value all probe values: 11391 87705 1.01 0.06 82 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

434/07	31	Analísada
--------	----	-----------



Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.



Sample report: 34

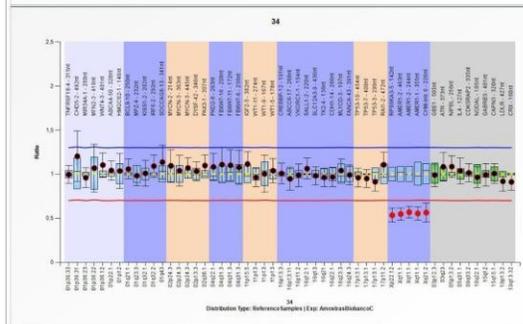
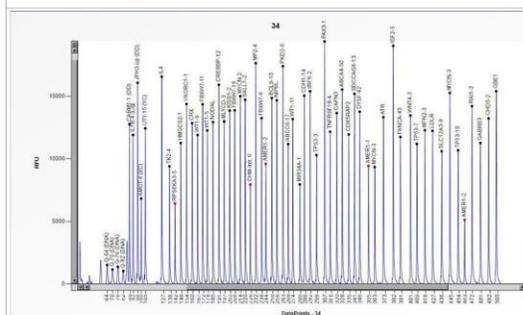
Project: AmnstrauBibancoC | Experiment: AmnstrauBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilm's tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-3)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 12%

FRRS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK -3%
 RBO: OK
 RPQ: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	12165	98019	1	0.05	=	72	0.04	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	13228	118415	1.2	0.14	=	86	0.02	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7950	63741	0.96	0.06	=	56	0.01	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	12281	106240	1.07	0.14	=	89	0.01	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	13462	115505	1.1	0.07	=	76	0.02	-
328	ABCA4-50	01p22.1	01-094.231210	15531	124174	1.04	0.05	=	68	0.03	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	11260	79539	1.04	0.1	=	58	0.01	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	14864	111849	1.06	0.06	=	58	0.04	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	17842	128927	0.98	0.06	=	59	0.02	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	13846	97205	1.01	0.07	=	48	0.06	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	15400	118486	1.09	0.06	=	50	0.05	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	15193	121317	1.14	0.1	=	57	0.02	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	15000	108242	1.09	0.09	=	49	0.01	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	9340	74762	1.04	0.09	=	77	0.03	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	15266	137714	1.07	0.06	=	100	0.05	-
346	DYF-42	02p13.3	02-071.694010	13763	107704	1.03	0.05	=	53	0.02	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	19380	155410	1.1	0.06	=	72	0.07	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	17402	129991	1.08	0.08	=	63	0.03	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	13879	99771	1.11	0.1	=	48	0.03	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	14358	102707	1.1	0.09	=	55	0.04	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	13255	100834	1.08	0.1	=	56	0.03	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	19028	160262	1.12	0.07	=	89	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	13176	99540	0.96	0.05	=	53	0.04	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	11905	85209	1	0.1	=	54	0.08	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	12263	87755	1.04	0.07	=	49	0.01	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	15913	115619	1.01	0.06	=	65	0.02	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	11174	85458	0.95	0.07	=	56	0.03	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	14375	105336	0.99	0.06	=	58	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	14717	108236	1.06	0.06	=	66	0.02	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	10606	95296	0.98	0.05	=	85	0.04	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	9400	69188	0.96	0.05	=	66	0.03	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	15043	119787	0.97	0.05	=	69	0.05	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	12992	92772	1.04	0.06	=	55	0.05	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	11743	101725	0.99	0.06	=	79	0.00	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	10663	95329	0.96	0.05	=	79	0.02	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	11185	96091	0.95	0.05	=	60	0.08	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	10288	82859	0.91	0.05	=	76	0.08	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	14203	133668	1.11	0.07	=	96	0.05	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	6420	45266	0.53	0.04	<<*	55	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	5115	43155	0.55	0.03	<<*	55	0.01	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	9601	73026	0.57	0.03	<<*	57	0.03	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	9430	76674	0.55	0.04	<<*	66	0.05	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	7944	56155	0.56	0.05	<<*	50	0.06	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	15405	147084	0.99	0.07	=	93	0.00	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	13328	109005	1.08	0.08	=	81	0.02	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	14677	111562	1.09	0.06	=	60	0.05	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	16563	125282	1.04	0.07	=	103	0.02	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	11943	93401	1.01	0.05	=	60	0.01	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	12932	93627	0.96	0.06	=	66	0.09	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	11257	102666	0.99	0.06	=	77	0.00	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	13657	103113	1.01	0.06	=	58	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	12331	108068	0.92	0.06	=	92	0.09	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	12851	93761	0.91	0.05	=	57	0.01	-

Median value all probe values: 13228 102066 1.01 0.06 80 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilm's tumour product description.

239/11

34

Analísada



Sample report: 35

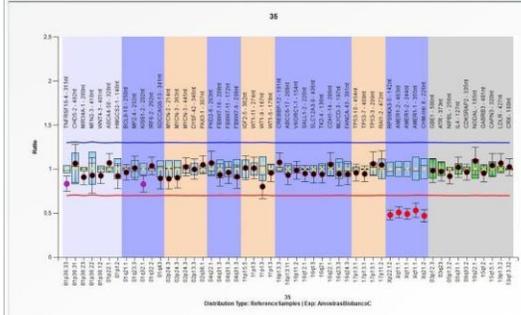
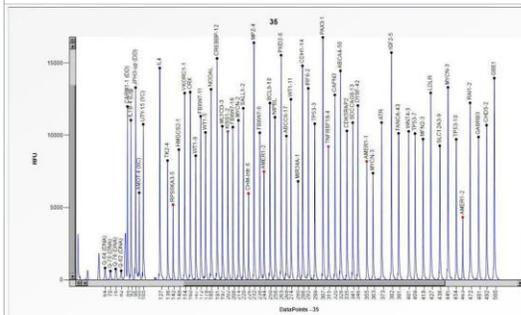
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 7%
 RSQ: OK
 RPQ: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFR5P18-4	01p36.33	01-001.129430	9223	71391	0.83	0.04	<<	64	0.00	-
492	CHDS-2	01p36.31	01-006.158950	10700	95594	1.07	0.11	=	83	0.02	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6818	52216	0.91	0.04	=	54	0.01	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	9742	83627	0.93	0.1	=	89	0.01	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	10273	87042	0.93	0.05	=	66	0.06	-
328	ABCA4-50	01p22.1	01-094.231210	14461	114462	1.07	0.05	=	65	0.01	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	9016	62985	0.92	0.07	=	57	0.03	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	12235	85601	0.96	0.05	=	57	0.01	-
232	MPTZ-4	01q23.3	01-159.542830	16408	119737	1.01	0.07	=	61	0.01	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	10266	72214	0.83	0.05	<<	47	0.07	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	13249	101404	1.04	0.05	=	55	0.06	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	10877	86140	0.9	0.06	=	57	0.02	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.599780	11038	77809	0.89	0.06	=	46	0.00	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	7383	58101	0.9	0.06	=	67	0.03	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	13316	116496	1.02	0.05	=	63	0.03	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.894010	12059	93739	1	0.06	=	53	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	16772	127250	1.05	0.05	=	67	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	15540	115842	1.07	0.07	=	61	0.04	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	10569	74665	0.94	0.06	=	64	0.03	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	11318	78335	0.96	0.06	=	47	0.01	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	10176	74511	0.91	0.07	=	55	0.02	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	15720	129531	1.01	0.07	=	90	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	12490	92616	1.01	0.06	=	59	0.03	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	8584	59132	0.8	0.07	=	33	0.05	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	10202	71317	0.96	0.05	=	43	0.05	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	15322	109012	1.08	0.05	=	63	0.04	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.183750	9954	77144	0.93	0.05	=	58	0.02	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	12923	93125	0.99	0.05	=	65	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	11870	85538	0.95	0.05	=	58	0.00	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	9279	82600	0.94	0.05	=	88	0.03	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	8254	59838	0.94	0.06	=	66	0.06	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	14809	112700	1.05	0.07	=	63	0.05	-
197	MYLCD-3	16q23.3	16-082.499340	10631	77906	0.95	0.07	=	58	0.06	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	10136	86126	0.94	0.06	=	80	0.01	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	9723	84623	0.96	0.05	=	73	0.04	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	10121	85528	0.95	0.04	=	57	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	10797	83218	1.06	0.07	=	69	0.00	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	12244	112695	1.05	0.08	=	87	0.02	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	5199	36143	0.48	0.03	<<	54	0.02	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	4335	36122	0.51	0.03	<<	49	0.01	-
244	AMER1-1	Xq11.1	X-063.329590	7492	56436	0.49	0.03	<<	55	0.02	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	8203	64684	0.53	0.04	<<	71	0.01	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	5979	40355	0.47	0.04	<<	43	0.03	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	13954	130321	0.98	0.07	=	104	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	10881	87236	0.97	0.06	=	86	0.04	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	11252	83003	0.92	0.04	=	61	0.01	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	14653	106052	1.02	0.06	=	82	0.03	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	10304	79655	0.97	0.05	=	66	0.04	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	13185	94184	1.09	0.08	=	67	0.02	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	9886	88231	0.95	0.05	=	69	0.04	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	12796	96341	1.04	0.07	=	56	0.07	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	12939	110551	1.07	0.05	=	93	0.01	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	12990	92992	1.02	0.05	=	57	0.01	-

Median value all probe values: **10797 85538 0.96 0.05 63 0.02**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

214/17

35

Analísada



Sample report: 36

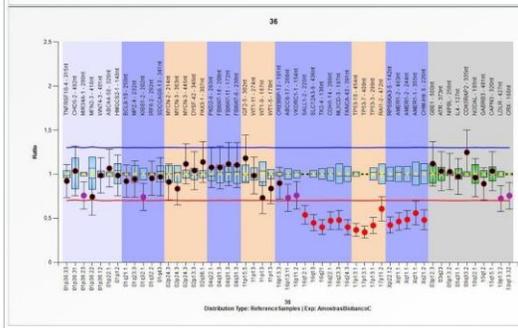
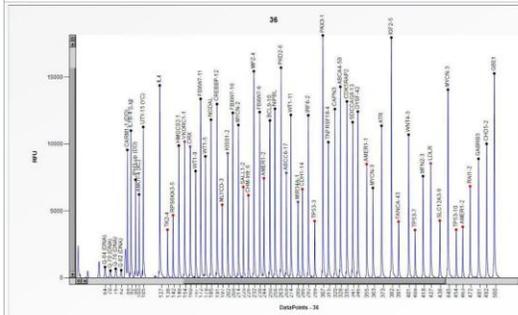
Project: Amnstras/BobancoC | Experiment: Amnstras/BobancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilm's tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 14%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 0%
 RSO: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK? 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	10145	76671	0.92	0.09	=	61	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.158850	10020	87347	1.04	0.14	=	98	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	5679	42061	0.76	0.08	<<	54	0.05	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	7602	63483	0.74	0.1	=	91	0.02	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	10702	89197	0.99	0.1	=	79	0.05	-
328	APCA4-50	01p22.1	01-094.231210	14263	109240	1.07	0.11	=	72	0.05	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	9885	67271	0.99	0.12	=	58	0.07	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	11763	86735	0.92	0.09	=	59	0.01	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	15442	111316	0.94	0.1	=	69	0.07	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	9311	62096	0.74	0.08	<<	58	0.03	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	12151	90444	0.95	0.1	=	54	0.05	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	11636	90646	0.97	0.11	=	54	0.06	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	11425	76227	0.91	0.1	=	48	0.03	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	6724	51502	0.84	0.09	=	66	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	14068	123150	1.12	0.11	=	98	0.00	-
346	DYF-42	02p13.3	02-071.694010	12430	95052	1.04	0.11	=	54	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	18119	138795	1.14	0.12	=	67	0.03	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	15711	114742	1.08	0.12	=	66	0.06	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	12336	82910	1.08	0.12	=	61	0.04	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	13378	91269	1.12	0.12	=	46	0.03	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	12395	85591	1.1	0.13	=	56	0.05	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	17958	147679	1.18	0.13	=	91	0.02	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	12180	88754	0.98	0.1	=	57	0.07	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	7988	53666	0.73	0.09	=	35	0.06	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	9085	62905	0.84	0.09	=	46	0.01	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	12993	91469	0.9	0.09	=	61	0.02	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	7848	58203	0.73	0.08	<<	53	0.05	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	10185	73475	0.76	0.08	<<	63	0.00	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	6798	46684	0.54	0.05	<<<	45	0.04	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	4276	37600	0.45	0.05	<<<	87	0.03	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	3599	25196	0.4	0.04	<<<	60	0.01	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	6637	48182	0.47	0.05	<<<	54	0.03	-
197	MYL2-3	16q23.3	16-082.499340	5471	37813	0.48	0.05	<<<	52	0.02	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	4210	34675	0.4	0.04	<<<	70	0.00	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	3502	31097	0.37	0.04	<<<	66	0.05	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	3574	30872	0.34	0.03	<<<	51	0.02	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	4250	32002	0.42	0.04	<<<	52	0.10	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	6849	62174	0.61	0.07	<<<	96	0.03	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	4836	32798	0.42	0.04	<<<	61	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	3815	31276	0.46	0.05	<<<	53	0.00	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	7449	55424	0.48	0.05	<<<	56	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	8503	66523	0.56	0.07	<<<	66	0.00	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	6170	42457	0.48	0.06	<<<	56	0.01	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	15277	144812	1.12	0.13	=	106	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	11366	89194	1.03	0.11	=	83	0.00	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	12639	93144	1.03	0.1	=	62	0.02	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	14381	104314	0.97	0.1	=	103	0.01	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	13188	101047	1.25	0.13	=	71	0.02	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	11824	82963	0.96	0.11	=	69	0.02	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	8901	77871	0.89	0.09	=	69	0.02	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	12618	92154	1.03	0.11	=	56	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	8557	73000	0.72	0.07	<<	83	0.01	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	9808	66310	0.76	0.08	<<	56	0.01	-

Median value all probe values: 10020 76671 0.9 0.09 = 61 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilm's tumour product description.

583/17

36

Analísada



Sample report: 37

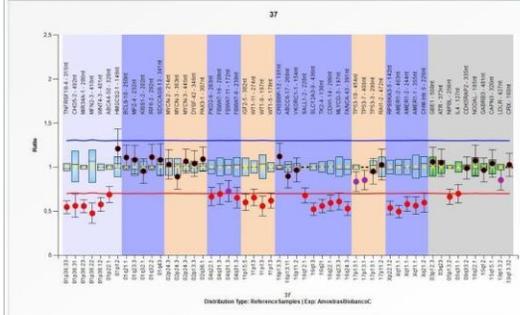
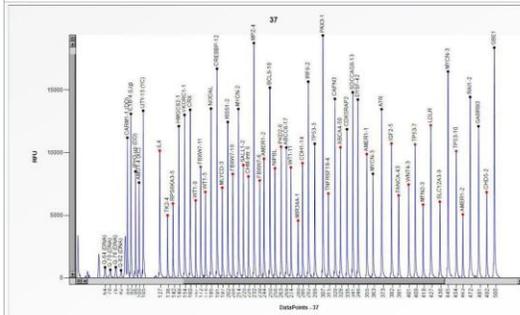
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 11%
 RSQ: OK
 RPQ: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	6737	53683	0.55	0.04	<<*	60	0.00	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.158950	6940	60204	0.56	0.07	<<*	71	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	4574	34455	0.56	0.04	<<*	52	0.02	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	5851	50181	0.48	0.06	<<*	77	0.03	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	7447	62832	0.56	0.04	<<*	67	0.01	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	10421	81129	0.69	0.05	<<*	62	0.00	-
148	HMGC2-1	01p12	01-120.113020	12110	83447	1.21	0.11	=	55	0.03	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	15178	111674	1.11	0.07	=	61	0.00	-
233	MZF4	01q23.3	01-159.542830	18738	137964	1.08	0.08	=	65	0.00	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	12435	89297	0.95	0.07	=	61	0.07	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	15658	120351	1.11	0.07	=	49	0.05	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	14810	117058	1.08	0.09	=	57	0.02	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	13481	99878	1.03	0.08	=	61	0.00	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	8307	67003	0.89	0.07	=	70	0.04	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	16468	143058	1.07	0.07	=	61	0.03	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.694010	14228	109496	1.04	0.07	=	57	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	19348	150210	1.09	0.07	=	73	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	10461	79532	0.66	0.05	<<*	66	0.07	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	8290	59333	0.7	0.06	<<*	47	0.03	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	8861	61862	0.73	0.06	<<*	47	0.01	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	7772	57071	0.65	0.06	<<*	53	0.03	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	10726	89679	0.6	0.05	<<*	95	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	8813	67541	0.65	0.05	<<*	62	0.02	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	6178	41315	0.56	0.06	<<*	31	0.05	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	6863	47067	0.62	0.04	<<*	31	0.05	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	16687	119505	1.12	0.08	=	61	0.04	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.183750	10404	80707	0.9	0.07	=	58	0.01	-
154	VIKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	13007	94138	0.97	0.07	=	61	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	9001	66858	0.68	0.04	<<*	58	0.01	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	6079	54152	0.52	0.04	<<*	87	0.02	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	4993	35892	0.56	0.04	<<*	58	0.06	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	9158	68622	0.59	0.04	<<*	57	0.05	-
197	MYLC2-3	16q23.3	16-082.499340	7198	51533	0.61	0.05	<<*	53	0.06	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	6589	55904	0.53	0.04	<<*	79	0.00	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	10113	87130	0.84	0.06	<<	69	0.01	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	10649	92124	0.85	0.05	<<	84	0.05	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	10704	81539	0.95	0.07	=	74	0.00	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	14433	133754	1.03	0.09	=	86	0.03	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	5932	42288	0.54	0.04	<<*	63	0.02	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	5068	43255	0.5	0.04	<<*	56	0.07	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	9509	71526	0.58	0.04	<<*	54	0.08	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	9878	81111	0.56	0.05	<<*	67	0.02	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	8989	56113	0.6	0.05	<<*	49	0.04	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	18370	174159	1.06	0.08	=	108	0.04	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	13461	109410	1.05	0.08	=	88	0.03	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012060	8753	65369	0.66	0.04	<<*	60	0.00	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	10152	73890	0.7	0.05	<<*	69	0.03	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	11862	93476	0.99	0.06	=	70	0.03	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	13508	96639	1.07	0.09	=	66	0.02	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	12099	118679	0.97	0.07	=	80	0.01	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	14282	107687	1.04	0.08	=	56	0.01	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	12178	106763	0.85	0.06	<<	80	0.04	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	13416	96412	1.03	0.07	=	58	0.01	-

Median value all probe values: 10404 81111 0.73 0.06 61 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

433/18

37

Analísada



Sample report: 39

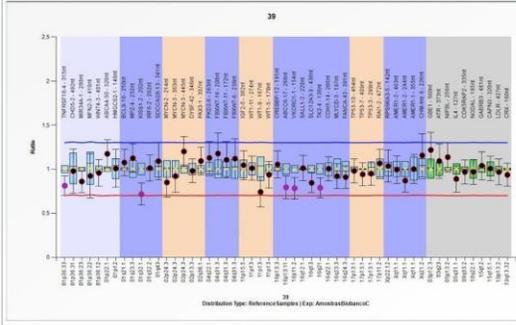
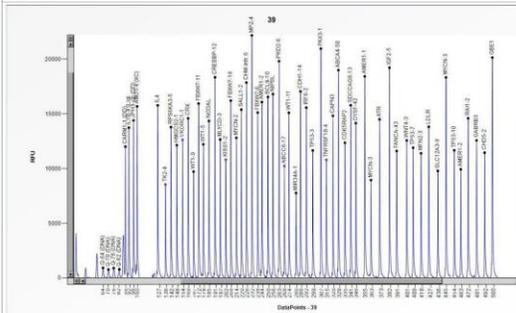
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 0%
 RSQ: OK
 RPQ: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	10791	90761	0.81	0.05	<<	71	0.00	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	11452	108615	0.98	0.12	=	77	0.02	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7771	63739	0.86	0.06	=	53	0.02	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	11395	103809	0.92	0.13	=	82	0.01	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	12576	119649	0.96	0.07	=	81	0.06	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	19000	166939	1.17	0.06	=	67	0.00	-
148	HMGC2-1	01p12	01-120.113020	12136	91865	1.01	0.11	=	60	0.03	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	16553	129700	1.08	0.07	=	59	0.00	-
233	MZF4	01q23.3	01-159.542830	22178	173566	1.12	0.08	=	58	0.00	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	10818	81120	0.72	0.06	<<	57	0.07	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	15575	129146	1.01	0.07	=	50	0.04	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	15798	134610	1.09	0.11	=	62	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.599780	12811	100941	0.85	0.08	=	59	0.00	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	8944	77651	0.92	0.09	=	62	0.04	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	18335	168776	1.2	0.09	=	63	0.03	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.894010	14187	116262	0.98	0.07	=	54	0.02	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	20972	172515	1.09	0.08	=	66	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	19825	159935	1.13	0.09	=	63	0.02	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	16210	120389	1.18	0.12	=	47	0.03	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	15949	121214	1.11	0.1	=	57	0.01	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	15120	118509	1.12	0.11	=	52	0.03	-
382	IGFBP-5	11p15.5	11-002.118910	19221	169388	1.04	0.08	=	87	0.00	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	15104	120392	1.01	0.07	=	53	0.02	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	9723	71460	0.74	0.09	=	36	0.04	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	12222	96300	0.94	0.08	=	53	0.04	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	18350	139799	1.05	0.08	=	61	0.04	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.163750	10235	83055	0.79	0.06	<<	57	0.01	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	12630	96687	0.76	0.06	<<	63	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	15390	119042	1.01	0.07	=	59	0.01	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	9785	91481	0.85	0.06	=	89	0.04	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	8545	66373	0.79	0.06	<<	60	0.04	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	17057	142601	1.01	0.07	=	70	0.05	-
197	MYL2-3	16q23.3	16-082.499340	12661	99307	0.92	0.07	=	62	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	11605	103706	0.91	0.06	=	77	0.01	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	11662	106487	0.98	0.07	=	55	0.04	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	11902	108856	0.94	0.07	=	79	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	11649	95610	0.95	0.07	=	76	0.00	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	14802	142665	1.07	0.08	=	94	0.02	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	13795	104357	1.03	0.09	=	63	0.02	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	9928	89461	0.99	0.08	=	65	0.01	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	16087	131665	0.87	0.06	=	55	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	16432	159453	1	0.08	=	66	0.03	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	17666	134070	1.16	0.12	=	56	0.04	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	20152	200809	1.22	0.1	=	97	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	14503	126069	1.09	0.1	=	94	0.04	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	16818	132210	1.14	0.08	=	61	0.00	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	15782	125821	0.89	0.07	=	93	0.03	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	12362	102015	0.97	0.07	=	58	0.03	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	14357	110530	0.97	0.07	=	64	0.02	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	12575	117679	1.04	0.08	=	66	0.04	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	14830	116133	1.01	0.07	=	55	0.01	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	13822	128252	0.97	0.07	=	94	0.00	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	14595	111493	0.94	0.06	=	57	0.01	-

Median value all probe values: 14357 116262 0.99 0.08 82 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

512/19

39

Analísada



Sample report: 40

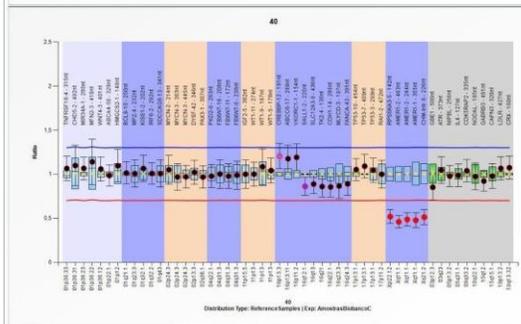
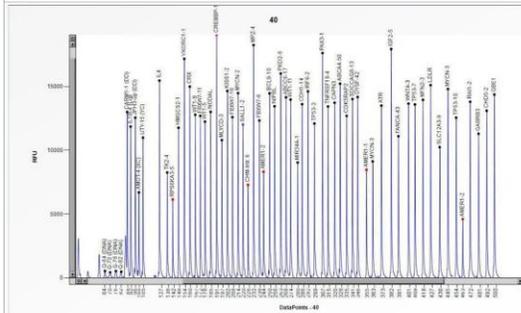
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 7%
 RSQ: OK
 RPQ: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSP18-4	01p36.33	01-001.129430	13434	109544	1.06	0.07	=	71	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	13098	125755	1.1	0.12	=	84	0.04	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	9041	73999	1.07	0.06	=	54	0.05	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	13953	128462	1.14	0.13	=	81	0.06	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.220550	13662	124613	1.06	0.07	=	78	0.02	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	15221	127956	0.98	0.06	=	70	0.06	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	11767	86970	1.09	0.09	=	55	0.04	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	14462	112876	1.01	0.06	=	62	0.03	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	16248	141623	1.01	0.08	=	64	0.02	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	14651	109558	1.06	0.07	=	62	0.03	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	14617	117928	1.01	0.06	=	51	0.05	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	14015	118597	1.01	0.08	=	61	0.00	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	14481	109668	1.05	0.08	=	59	0.01	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	9129	78235	0.97	0.08	=	67	0.06	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	14806	137718	0.97	0.06	=	65	0.05	-
346	DYF-42	02p13.3	02-071.694010	14175	115996	1.02	0.07	=	57	0.02	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	17819	143518	0.97	0.06	=	65	0.03	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	16016	128844	0.98	0.06	=	57	0.02	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	12598	94234	1	0.08	=	62	0.03	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	12696	92865	0.98	0.07	=	47	0.00	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	12335	97320	0.99	0.08	=	53	0.01	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	17934	160984	1	0.08	=	91	0.05	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	13975	110757	1	0.07	=	61	0.01	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	12786	94709	1.08	0.1	=	51	0.04	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	12246	84765	1.04	0.07	=	61	0.04	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	19005	148086	1.2	0.07	>>	64	0.04	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.163750	14150	117183	1.17	0.08	=	65	0.06	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	17168	132424	1.19	0.08	=	64	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	12020	91501	0.86	0.05	<<	56	0.00	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	10244	97667	0.89	0.05	=	93	0.01	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	8255	63148	0.86	0.06	=	65	0.05	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	13617	112149	0.85	0.06	=	71	0.03	-
197	MYL2-3	16q23.3	16-082.499340	10799	82950	0.87	0.07	=	55	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	11104	102258	0.89	0.06	=	78	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	12559	114427	1.05	0.06	=	61	0.01	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	13588	120259	1.09	0.07	=	52	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	12095	99285	1.04	0.07	=	78	0.01	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	13806	136296	1	0.08	=	93	0.05	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	6145	46159	0.52	0.04	<<<	66	0.08	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	4607	40331	0.46	0.04	<<<	52	0.03	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	8323	68138	0.49	0.04	<<<	54	0.04	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	8478	72681	0.48	0.04	<<<	61	0.02	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	7287	53525	0.51	0.04	<<<	56	0.06	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	14368	143209	0.85	0.07	=	95	0.00	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	13502	117251	1.05	0.08	=	87	0.02	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	13449	107918	0.98	0.06	=	66	0.03	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	15463	120127	0.99	0.06	=	96	0.00	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	12696	105267	1.04	0.06	=	67	0.04	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	13013	100076	0.97	0.08	=	64	0.03	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	11296	109634	0.92	0.06	=	80	0.03	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	13730	110236	0.98	0.07	=	66	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	15108	141567	1.07	0.07	=	98	0.04	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	14993	114859	1.07	0.06	=	57	0.00	-

Median value all probe values: **13502 110236 1 0.07 84 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

554/19

40

Analísada



Sample report: 41

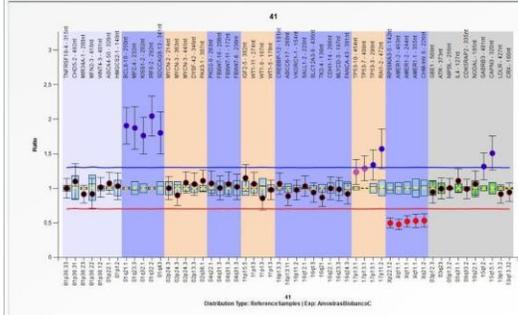
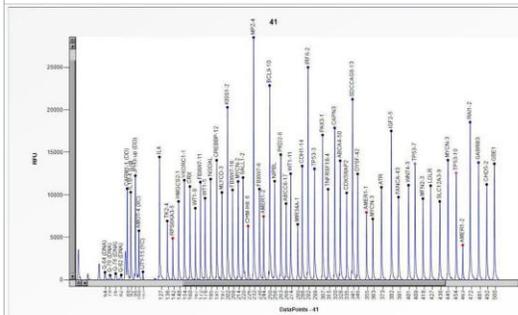
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 90%
 PSLP: OK -4%
 RQ: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK? 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRFSP18-4	01p36.33	01-001.129430	10665	88427	1	0.07	=	72	0.00	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	11223	105831	1.1	0.13	=	67	0.04	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6538	55499	0.92	0.06	=	55	0.02	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	9559	88797	0.92	0.11	=	89	0.00	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	11138	101670	1.01	0.07	=	69	0.07	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	14010	119490	1.07	0.08	=	69	0.01	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	9226	69182	1.03	0.1	=	65	0.02	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	22861	184708	1.91	0.13	>>*	64	0.03	-
232	MZF4	01q23.3	01-159.542830	28518	227489	1.87	0.16	>>*	66	0.05	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	20301	154273	1.76	0.13	>>*	62	0.05	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	25002	207838	2.05	0.14	>>*	76	0.02	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	21241	184527	1.8	0.16	>>*	60	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	11575	89108	1	0.08	=	60	0.03	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	7182	60743	0.9	0.08	=	67	0.03	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	14090	132512	1.08	0.08	=	64	0.02	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.694010	12465	103703	1.06	0.08	=	59	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	17039	142468	1.11	0.08	=	69	0.03	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	14736	119013	1.07	0.09	=	65	0.02	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	10585	80435	1.01	0.09	=	60	0.02	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	11497	86980	1.06	0.09	=	56	0.02	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	10684	87169	1.02	0.09	=	52	0.05	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	17515	156301	1.15	0.1	=	90	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	12490	99303	1.06	0.08	=	59	0.02	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	8435	61035	0.86	0.09	=	39	0.04	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	9615	74392	0.98	0.07	=	54	0.02	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	14070	106948	1.07	0.08	=	49	0.03	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.163750	8974	75230	0.89	0.07	=	59	0.03	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	11225	91468	0.98	0.07	=	64	0.04	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	12038	95992	1.03	0.07	=	61	0.01	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	9231	89221	0.94	0.07	=	98	0.04	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	6928	53716	0.87	0.06	=	62	0.01	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	13911	109887	1	0.08	=	62	0.03	-
197	MYLC2-3	16q23.3	16-082.499340	10291	79077	0.99	0.08	=	57	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	9740	90094	0.92	0.08	=	77	0.05	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	12594	117617	1.24	0.09	>>	71	0.01	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	13659	125845	1.29	0.09	>>	81	0.02	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	13068	107933	1.34	0.11	>>*	68	0.01	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	18552	187248	1.57	0.14	>>*	100	0.00	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	4901	36240	0.5	0.04	<<*	60	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	4093	35501	0.48	0.04	<<*	50	0.00	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	7472	60023	0.52	0.04	<<*	55	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	7954	67674	0.53	0.05	<<*	65	0.02	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	6337	45194	0.53	0.05	<<*	50	0.02	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	13667	137172	0.94	0.08	=	92	0.04	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	10903	93456	0.99	0.08	=	79	0.02	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	11606	94583	1	0.07	=	62	0.04	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	14453	112969	1.11	0.09	=	100	0.02	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	10234	86519	0.99	0.07	=	67	0.00	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	11854	90889	1.06	0.09	=	65	0.03	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	13800	133592	1.32	0.1	>>*	77	0.02	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	17871	147342	1.51	0.12	>>*	67	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	11079	104424	0.92	0.07	=	104	0.06	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	10978	84274	0.94	0.07	=	60	0.02	-

Median value all probe values: 11575 94583 1.01 0.08 65 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcolland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

427/06

41

Analísada



Sample report: 43

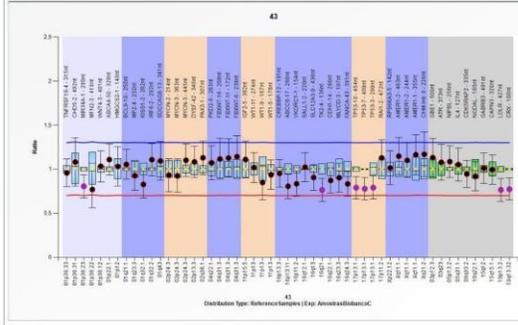
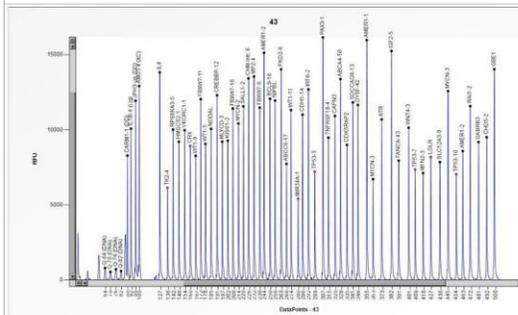
Project: AmnstrauBibancoC | Experiment: AmnstrauBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC, On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 2%
 RSO: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	9469	74466	0.96	0.08	=	72	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	9496	84342	1.08	0.14	=	84	0.00	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	5415	41498	0.87	0.07	<<	53	0.02	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	7113	60744	0.77	0.1	=	75	0.00	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.220550	10131	88007	1.03	0.09	=	85	0.01	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	13370	104294	1.11	0.09	=	69	0.04	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	9196	63697	1.03	0.11	=	56	0.01	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	12059	87917	1.05	0.09	=	59	0.03	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	13545	100660	0.93	0.08	=	57	0.05	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	9270	65196	0.83	0.08	=	60	0.03	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	12681	97346	1.11	0.09	=	51	0.03	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	11819	95542	1.09	0.11	=	65	0.03	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	10417	74410	0.93	0.09	=	43	0.02	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	6709	52940	0.92	0.09	=	46	0.00	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	12575	110843	1.1	0.09	=	61	0.05	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	11848	90014	1.08	0.09	=	55	0.02	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	16143	123664	1.13	0.09	=	65	0.03	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	14020	104195	1.07	0.1	=	66	0.00	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	11405	80241	1.12	0.12	=	62	0.04	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	12037	82894	1.13	0.11	=	46	0.00	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	11465	82922	1.14	0.12	=	52	0.02	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	18234	126132	1.11	0.1	=	93	0.03	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	11306	83443	1.02	0.08	=	54	0.01	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	8260	55753	0.85	0.1	=	48	0.03	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	9054	66003	0.94	0.08	=	65	0.05	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	12287	88778	0.95	0.08	=	65	0.03	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	7729	57819	0.81	0.07	=	57	0.01	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	9983	71972	0.83	0.07	=	62	0.04	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	11552	84608	1.02	0.08	=	65	0.02	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	7840	69965	0.91	0.07	=	89	0.05	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	6130	44721	0.76	0.07	<<	59	0.01	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	11003	84055	0.87	0.07	=	62	0.05	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	9204	65577	0.9	0.08	=	63	0.04	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	7936	67869	0.83	0.07	=	76	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514890	7035	60569	0.79	0.06	<<	70	0.01	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	7341	62270	0.78	0.06	<<	73	0.02	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	7210	55367	0.79	0.07	<<	73	0.01	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	11571	106935	1.13	0.1	=	90	0.03	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	10002	70835	1.01	0.1	=	68	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	8573	73654	1.15	0.11	=	70	0.02	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	15119	112136	1.1	0.1	=	58	0.03	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	15962	129286	1.16	0.11	=	72	0.01	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	13418	92496	1.17	0.13	=	57	0.01	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	14029	132272	1.13	0.11	=	103	0.04	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	10885	85000	1.08	0.1	=	69	0.00	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	11940	87111	1.09	0.09	=	59	0.03	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	13817	100854	1.05	0.09	=	72	0.02	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	8988	68358	0.94	0.08	=	55	0.02	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	10054	71789	0.92	0.08	=	60	0.02	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	9176	82242	1.01	0.09	=	66	0.02	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	10917	80839	1	0.08	=	56	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	8179	70802	0.77	0.06	<<	83	0.01	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	8924	65109	0.77	0.06	<<	58	0.02	-

Median value all probe values: 10417 82242 1.01 0.09 63 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

742/07

43

Analísada



Sample report: 44

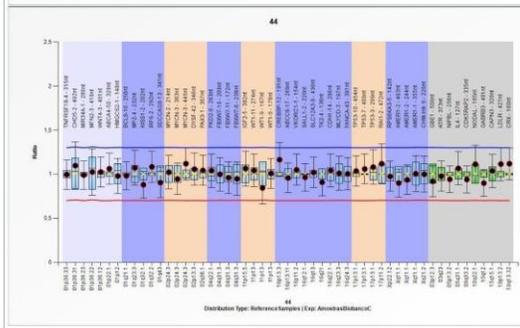
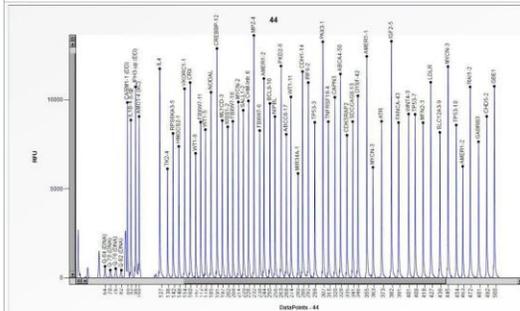
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 13%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK -10%
 R8Q: OK
 R9Q: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	8772	66910	1	0.08	=	69	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	9071	78916	1.1	0.13	=	78	0.03	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	5866	43937	0.99	0.08	=	59	0.06	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	8715	72837	1.02	0.13	=	78	0.02	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	9203	77284	1.02	0.08	=	71	0.02	-
328	ABCA4-50	01p22.1	01-094.231210	11451	89790	1.06	0.09	=	60	0.01	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	7387	50312	0.98	0.1	=	60	0.01	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	9798	72304	0.98	0.08	=	73	0.05	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	13616	96893	1.07	0.1	=	58	0.03	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	8483	56963	0.85	0.08	=	61	0.04	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	10970	83034	1.08	0.09	=	59	0.00	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	8778	68861	0.9	0.09	=	62	0.05	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	9876	67654	1.02	0.1	=	48	0.01	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	6210	48959	0.95	0.09	=	59	0.02	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	11865	100705	1.12	0.09	=	70	0.03	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	10224	77286	1.06	0.09	=	54	0.01	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	13256	99155	1.04	0.09	=	66	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	11900	88264	1.04	0.1	=	66	0.03	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	8795	59409	1	0.1	=	57	0.01	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	8749	59818	0.96	0.09	=	45	0.03	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	8273	58410	0.95	0.09	=	56	0.04	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	13289	108540	1.06	0.1	=	91	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	10162	74567	1.04	0.09	=	60	0.03	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	6991	47148	0.84	0.09	=	38	0.04	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	8329	57869	1.01	0.08	=	53	0.01	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	12880	91010	1.16	0.1	=	60	0.05	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	8063	61169	0.96	0.08	=	60	0.03	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	10620	76040	1.05	0.09	=	67	0.04	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	9414	66555	0.96	0.08	=	53	0.00	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	8168	71100	1.02	0.09	=	90	0.01	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	6128	42340	0.91	0.08	=	62	0.00	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	11592	88942	1.04	0.09	=	62	0.04	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	8837	62001	1.01	0.1	=	55	0.05	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	8727	74391	1	0.09	=	66	0.05	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	8583	72332	1.04	0.09	=	77	0.00	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	9180	76623	1.06	0.09	=	80	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	8736	67756	1.08	0.1	=	88	0.03	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017.568050	10727	97441	1.12	0.11	=	100	0.05	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	8114	58432	0.97	0.08	=	67	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	6268	52469	0.9	0.08	=	54	0.06	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	11195	82426	0.94	0.08	=	55	0.03	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	12442	99559	1	0.1	=	75	0.02	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	9938	66857	1	0.1	=	65	0.01	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	10762	99032	0.92	0.09	=	99	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	8795	68874	0.98	0.09	=	84	0.01	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	9058	65613	0.94	0.08	=	57	0.03	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	11748	83843	1.07	0.09	=	89	0.01	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	8011	61439	0.94	0.08	=	61	0.02	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	10426	72539	1.11	0.11	=	83	0.06	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	7646	67778	0.9	0.08	=	68	0.05	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	10142	75272	1.04	0.09	=	59	0.05	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	10990	93435	1.11	0.09	=	74	0.00	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	10965	76548	1.12	0.09	=	61	0.02	-

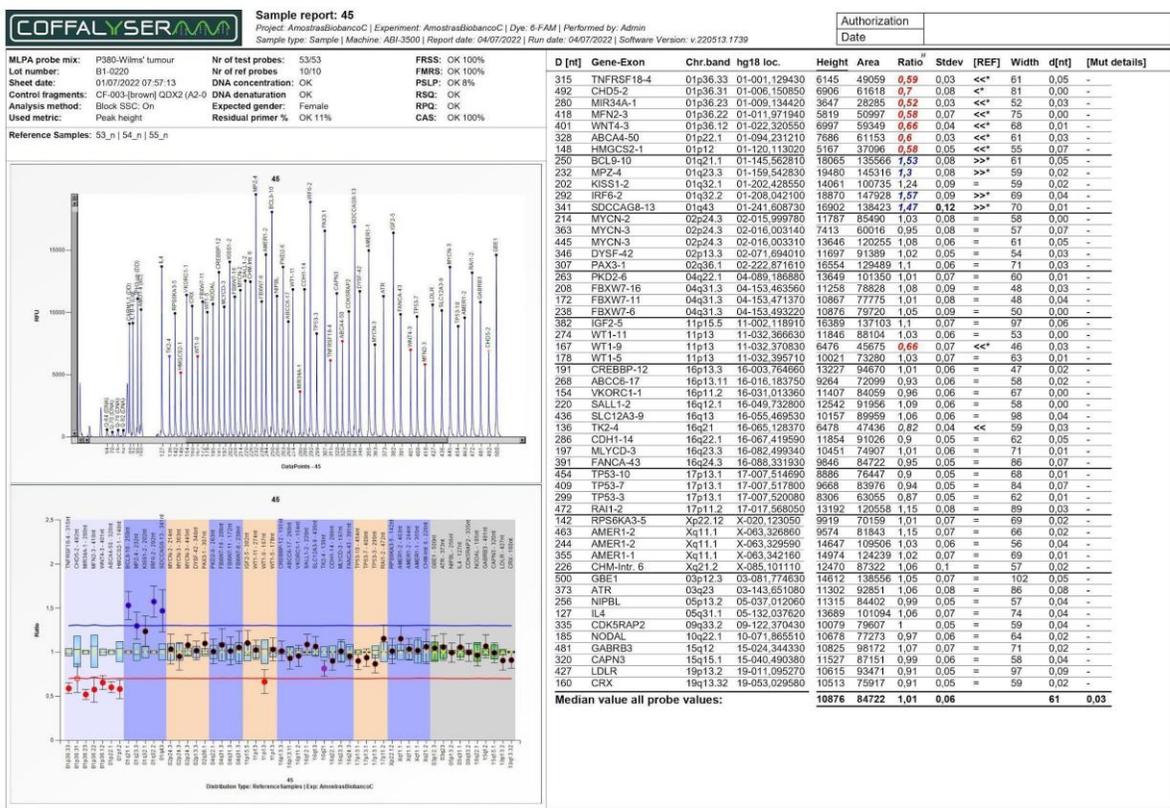
Median value all probe values: **9180 72332 1.01 0.09 62 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

105/09

44

Analísada



488/09 A	45	Analisaada também com pPCR
-----------------	-----------	----------------------------



Sample report: 47

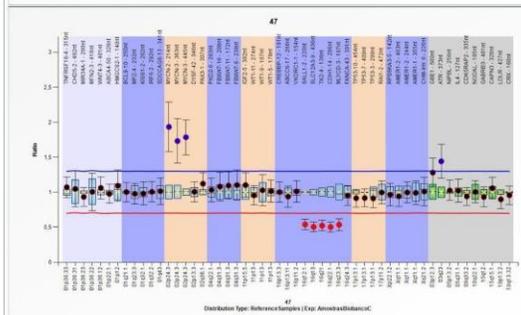
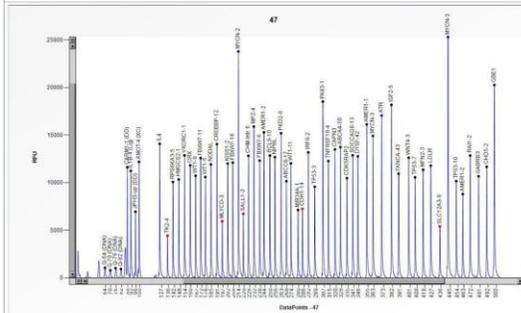
Project: AmnstrauBibancoC | Experiment: AmnstrauBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 90%
 PSLP: OK 2%
 RSO: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK? 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	12279	96217	1.07	0.07	=	78	0.05	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.158850	11671	108111	1.05	0.13	=	81	0.02	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7146	55737	0.93	0.07	=	53	0.01	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	11360	101629	1.01	0.13	=	79	0.05	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	12628	110827	1.06	0.08	=	83	0.05	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	13746	108111	0.98	0.07	=	62	0.03	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	10348	73950	1.09	0.11	=	65	0.01	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	12856	97101	1	0.07	=	61	0.00	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	15900	120730	0.98	0.07	=	60	0.00	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	12020	85596	0.98	0.08	=	42	0.02	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	13187	102872	1.01	0.07	=	48	0.03	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	12874	105503	1.02	0.09	=	64	0.00	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	23763	176406	1.13	0.18	>>>	62	0.00	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	14920	128321	1.73	0.16	>>>	78	0.04	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	25307	232220	1.79	0.12	>>>	101	0.02	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	12775	103142	1.01	0.07	=	61	0.02	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	18529	145339	1.12	0.08	=	65	0.06	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	15198	116850	1.03	0.08	=	62	0.06	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	12118	83744	1.08	0.1	=	39	0.03	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	12596	92837	1.1	0.1	=	56	0.01	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	12321	91506	1.1	0.11	=	51	0.03	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	18183	156589	1.1	0.09	=	95	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	12044	91083	0.96	0.07	=	65	0.07	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	10732	75310	1.03	0.11	=	53	0.04	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	10598	77521	1.02	0.08	=	57	0.05	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	14058	106153	1	0.07	=	63	0.06	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	10163	81722	0.94	0.08	=	59	0.08	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	12873	95605	1.01	0.08	=	65	0.04	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	6740	50343	0.54	0.04	<<<	53	0.01	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	5407	50035	0.51	0.03	<<<	80	0.01	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	4427	33363	0.52	0.04	<<<	59	0.08	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	7250	57362	0.5	0.04	<<<	68	0.04	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	5962	43280	0.54	0.04	<<<	52	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	10953	96630	0.95	0.07	=	78	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	10167	92801	0.92	0.06	=	72	0.06	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	10561	93991	0.92	0.06	=	60	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	9569	77500	0.91	0.07	=	79	0.08	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017.568050	12857	122967	1	0.08	=	87	0.05	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	10388	74872	0.97	0.08	=	69	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	8814	76992	0.94	0.07	=	63	0.00	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	15299	120252	1	0.07	=	56	0.08	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	16129	134350	0.99	0.08	=	63	0.03	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	12823	89650	1.01	0.1	=	61	0.04	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	20275	198694	1.28	0.1	=	104	0.00	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	17065	143254	1.44	0.12	>>>	86	0.05	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	12676	96634	1.03	0.07	=	59	0.00	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	14091	109007	1.02	0.08	=	97	0.07	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	10479	83431	0.94	0.06	=	60	0.05	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	11932	88982	1.01	0.08	=	67	0.07	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	10669	98073	0.93	0.07	=	68	0.00	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	13499	103668	1.06	0.08	=	66	0.05	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	11792	107527	0.9	0.07	=	76	0.04	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	11827	88540	0.96	0.07	=	59	0.01	-

Median value all probe values: 12279 96630 1.01 0.08 84 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

154/11

47

Analísada



Sample report: 48

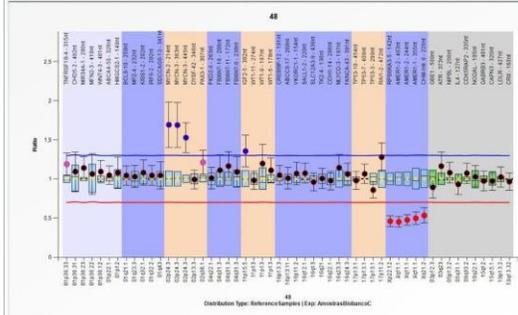
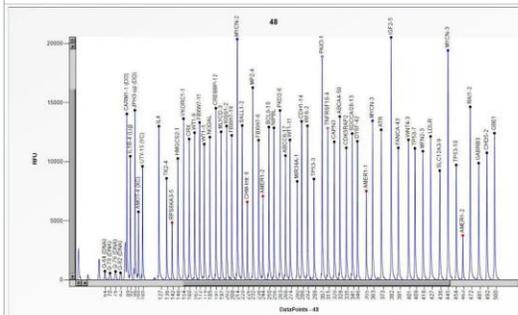
Project: Amnstras/BobancoC | Experiment: Amnstras/BobancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 10%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 4%
 RSO: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSP18-4	01p36.33	01-001.129430	12840	108039	1.19	0.07	>>	77	0.09	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	10753	110305	1.11	0.12	=	93	0.07	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	8339	68089	1.14	0.07	=	55	0.03	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	10892	104935	1.07	0.13	=	80	0.02	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	11859	113648	1.09	0.07	=	82	0.06	-
328	APCA4-50	01p22.1	01-094.231210	13819	118116	1.05	0.06	=	71	0.00	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	10274	73640	1.08	0.1	=	57	0.02	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	12932	100604	1.05	0.06	=	63	0.00	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	16268	124748	1.03	0.07	=	62	0.03	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	13023	93859	1.08	0.08	=	47	0.04	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	13035	106759	1.05	0.06	=	54	0.01	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	12382	106474	1.05	0.09	=	85	0.05	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	20375	153160	1.69	0.14	>>*	60	0.00	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	13460	116476	1.69	0.14	>>*	68	0.03	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	19414	191272	1.53	0.1	>>*	68	0.00	-
346	DYF-42	02p13.3	02-071.894010	11729	98483	0.99	0.06	=	61	0.02	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	18904	157828	1.21	0.08	>>	66	0.07	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	14332	111977	1.01	0.07	=	63	0.03	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	12229	90923	1.11	0.1	=	62	0.01	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	13321	97390	1.17	0.09	=	47	0.00	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	11824	91500	1.09	0.1	=	55	0.03	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	20516	189176	1.36	0.1	>>*	92	0.03	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	11843	93676	0.98	0.06	=	59	0.02	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	12456	88881	1.2	0.12	=	53	0.03	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	11495	82665	1.11	0.08	=	36	0.03	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	14530	108166	1.05	0.06	=	50	0.01	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	10515	85392	1.01	0.07	=	59	0.07	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	13645	104763	1.07	0.07	=	62	0.05	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	13064	99032	1.07	0.06	=	57	0.03	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	9243	92507	0.96	0.05	=	91	0.03	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	8590	64270	1.01	0.07	=	59	0.03	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	13418	111529	0.98	0.06	=	72	0.02	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	12530	93187	1.14	0.08	=	70	0.02	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	11176	104446	1.06	0.07	=	81	0.00	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	9727	84539	0.98	0.06	=	73	0.01	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	11135	105088	1.07	0.06	=	80	0.00	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	8541	70977	0.86	0.05	=	73	0.04	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017.568050	14640	154010	1.28	0.09	=	100	0.00	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	4845	35290	0.46	0.04	<<*	64	0.05	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	3769	35845	0.45	0.03	<<*	51	0.02	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	7089	56514	0.48	0.03	<<*	57	0.06	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	7516	63954	0.5	0.04	<<*	55	0.04	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	6951	46030	0.83	0.05	<<*	47	0.03	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	12411	132718	0.89	0.07	=	98	0.01	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	12697	110475	1.16	0.09	=	90	0.00	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	12865	100987	1.08	0.07	=	61	0.05	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	13005	98528	0.93	0.07	=	93	0.03	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	11176	94527	1.07	0.06	=	76	0.01	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	12077	81366	1.03	0.07	=	71	0.01	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	9880	100777	0.98	0.06	=	76	0.00	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	11685	95415	0.98	0.06	=	59	0.08	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	12138	120496	1.03	0.06	=	102	0.00	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	11923	90085	0.97	0.06	=	61	0.02	-

Median value all probe values: 12138 99032 1.05 0.07 63 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

546/05

48

Analísada



Sample report: 49

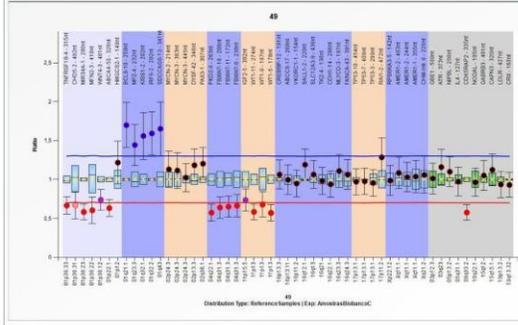
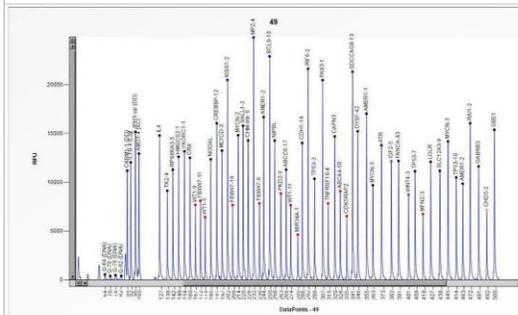
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC, On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 90%
 PSLP: OK 2%
 RBQ: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK? 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001,129430	7838	65471	0.67	0.06	<<*	72	0.00	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006,150850	7169	86232	0.67	0.09	<*	79	0.04	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009,134420	4643	37575	0.58	0.05	<<*	53	0.04	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011,971940	6747	59937	0.6	0.08	<<*	75	0.03	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022,320550	8741	78216	0.74	0.07	<<	71	0.01	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094,231210	9095	76198	0.63	0.05	<<*	69	0.00	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120,113020	12622	92478	1.22	0.14	=	68	0.02	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145,562810	22912	177424	1.7	0.15	>>*	63	0.04	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159,542830	24846	193157	1.44	0.13	>>*	61	0.02	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202,428550	20484	155606	1.56	0.15	>>*	63	0.04	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208,042100	21641	173616	1.59	0.14	>>*	53	0.00	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241,608730	21330	186595	1.65	0.17	>>*	64	0.02	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015,099780	14830	113870	1.13	0.12	=	59	0.00	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016,003140	9699	82040	1.12	0.12	=	53	0.03	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016,003310	14196	128902	1.02	0.09	=	64	0.01	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071,694010	15230	125197	1.18	0.1	=	65	0.01	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222,671610	29470	169054	1.2	0.1	=	68	0.04	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089,186880	8863	69546	0.57	0.05	<<*	59	0.04	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153,463560	7665	57546	0.64	0.07	<<*	56	0.01	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153,471370	8109	58919	0.65	0.07	<<*	47	0.01	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153,493220	7841	59669	0.66	0.07	<<*	48	0.03	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002,118910	12157	104942	0.74	0.07	<<	90	0.00	-
274	WT1-11	11p13	11-032,366630	7665	62340	0.68	0.05	<<*	60	0.02	-
167	WT1-9	11p13	11-032,370830	7689	55546	0.68	0.08	<<*	55	0.01	-
178	WT1-5	11p13	11-032,395710	6438	47153	0.57	0.05	<<*	33	0.03	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003,764660	16057	120403	1.06	0.09	=	46	0.02	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016,163750	11299	91311	1	0.09	=	57	0.02	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031,013360	13177	102335	0.95	0.09	=	63	0.06	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049,732800	15790	123299	1.19	0.1	=	60	0.03	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055,469530	11174	103375	1.07	0.09	=	93	0.03	-
138	TN2-4	16q21	16-065,128370	9138	69666	0.98	0.09	=	67	0.00	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067,419590	14039	113970	0.94	0.08	=	68	0.04	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082,499340	13249	98587	1.11	0.11	=	64	0.00	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088,331930	12195	109956	1.06	0.1	=	79	0.01	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007,514690	10502	93751	0.97	0.08	=	63	0.03	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007,517800	11141	98852	0.98	0.08	=	84	0.03	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007,520080	10367	82787	0.96	0.09	=	72	0.01	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017,568050	16055	154772	1.29	0.12	=	99	0.05	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020,123050	11303	85566	0.99	0.1	=	70	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063,326860	9857	87865	1.09	0.1	=	64	0.03	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063,329590	16685	131261	1.03	0.09	=	55	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063,342160	17043	146615	1.04	0.1	=	72	0.02	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085,101110	14290	105265	1.06	0.12	=	61	0.03	-
500	GBE1	03p12.3	03-081,774630	15378	151402	1.01	0.1	=	104	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143,651080	13797	116838	1.16	0.11	=	90	0.04	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037,012960	14279	112448	1.1	0.1	=	59	0.02	-
127	IL4	05q31.1	05-132,037620	14793	115878	0.97	0.09	=	99	0.01	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122,370430	6540	53668	0.58	0.05	<<*	62	0.07	-
185	NODAL	10q22.1	10-071,865510	12358	93891	0.97	0.09	=	65	0.05	-
481	GABRB3	15q12	15-024,344330	11636	106261	1.05	0.1	=	65	0.01	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040,490380	14703	118387	1.13	0.1	=	66	0.05	-
427	LDLR	19p13.2	19-011,095270	12102	111437	0.94	0.08	=	97	0.09	-
160	CRX	19q13.32	19-053,029580	12509	95565	0.93	0.08	=	63	0.01	-

Median value all probe values: **12195 102335 1 0.09 64 0.02**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

119/18

49

Analísada



Sample report: 51

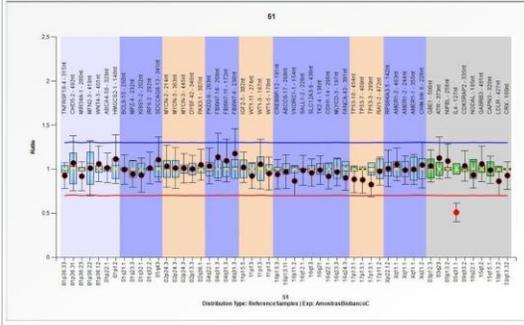
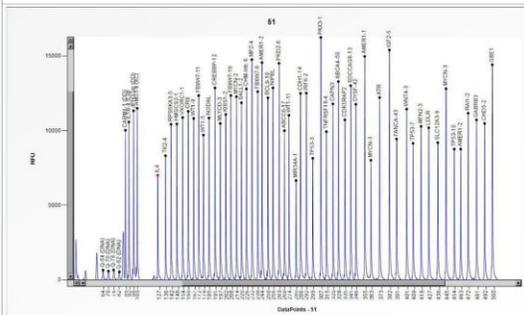
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization
Date

MLPA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-9)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRS: OK 100%
 FMS: OK 100%
 PSLP: OK 10%
 RSO: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSF18-4	01p36.33	01-001,129430	9928	78398	0.93	0.07	=	89	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-008,150850	10478	93366	1.07	0.16	=	81	0.03	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009,134420	6856	51201	0.92	0.08	=	50	0.06	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011,971940	10281	89575	1.01	0.16	=	87	0.03	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022,320550	11436	99784	1.06	0.1	=	74	0.08	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094,231210	13277	103238	1.01	0.08	=	68	0.03	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120,113020	10439	72461	1.12	0.14	=	63	0.02	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145,562810	12191	89232	1	0.08	=	61	0.01	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159,542830	14747	109408	0.94	0.07	=	55	0.00	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202,428550	11077	77931	0.93	0.1	=	62	0.04	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208,042100	12504	97962	1.01	0.09	=	55	0.01	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241,608730	13001	103442	1.11	0.13	=	60	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013,599780	12270	89925	1.03	0.12	=	59	0.00	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016,003140	8012	66362	1.01	0.12	=	67	0.02	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016,003310	12806	113758	1.01	0.08	=	91	0.05	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071,894010	11759	92368	1	0.08	=	54	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222,871610	16234	126387	1.05	0.09	=	67	0.04	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089,186880	14502	108626	1.04	0.1	=	58	0.01	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153,463560	12350	87147	1.14	0.13	=	66	0.01	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153,471370	12343	85494	1.1	0.12	=	46	0.04	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153,493220	12604	91803	1.18	0.14	=	51	0.01	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002,118910	15388	129554	1.02	0.09	=	84	0.02	-
274	WT1-11	11p13	11-032,366630	11023	82989	0.92	0.07	=	58	0.03	-
167	WT1-9	11p13	11-032,370830	10816	75071	1.06	0.14	=	52	0.03	-
178	WT1-5	11p13	11-032,395710	9701	69222	0.95	0.09	=	46	0.07	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003,764660	12854	95563	0.94	0.08	=	61	0.08	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016,163750	9989	76391	0.97	0.1	=	58	0.02	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031,013360	10874	80677	0.87	0.08	=	65	0.05	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049,732800	11857	87211	0.99	0.08	=	57	0.07	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055,469530	9192	82351	0.96	0.08	=	92	0.01	-
136	TN2-4	16q21	16-065,128370	8314	59864	0.99	0.08	=	64	0.02	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067,419590	12487	98166	0.92	0.07	=	67	0.04	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082,499340	10478	77277	0.97	0.08	=	63	0.07	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088,331930	9431	83156	0.9	0.07	=	82	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007,514690	8757	76186	0.89	0.07	=	58	0.07	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007,517800	9143	79876	0.88	0.07	=	76	0.00	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007,520080	8143	63331	0.83	0.07	=	72	0.01	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017,568050	11166	103786	0.98	0.08	=	94	0.00	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020,123050	10418	75411	1.01	0.1	=	69	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063,326860	8758	75488	1.05	0.09	=	65	0.00	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063,329590	14549	110324	0.99	0.08	=	57	0.02	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063,342160	14964	125481	1	0.09	=	82	0.02	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085,101110	12790	91029	1.05	0.13	=	58	0.02	-
500	GBE1	03p12.3	03-081,774630	14404	136526	1.04	0.09	=	104	0.00	-
373	ATR	03q23	03-143,651080	12210	88616	1.13	0.12	=	90	0.03	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037,012960	12862	96496	1.09	0.1	=	58	0.03	-
127	IL4	05q31.1	05-132,037620	7006	51081	0.67	0.05	<<	82	0.04	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122,370430	10718	82427	1.04	0.09	=	60	0.03	-
185	NODAL	10q22.1	10-071,865510	10844	79037	0.93	0.07	=	63	0.01	-
481	GABRB3	15q12	15-024,344330	10710	96465	1.06	0.1	=	74	0.00	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040,490380	11785	88950	0.99	0.08	=	57	0.01	-
427	LDLR	19p13.2	19-011,095270	10184	90179	0.86	0.08	=	105	0.00	-
160	CRX	19q13.32	19-053,029580	11288	82025	0.93	0.08	=	57	0.01	-

Median value all probe values: **11166 88950 1 0.09 63 0.02**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcolland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

422/18

51

Analísada



Sample report: 53_n

Project: AmosraBibancoC | Experiment: AmosraBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Reference | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software Version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

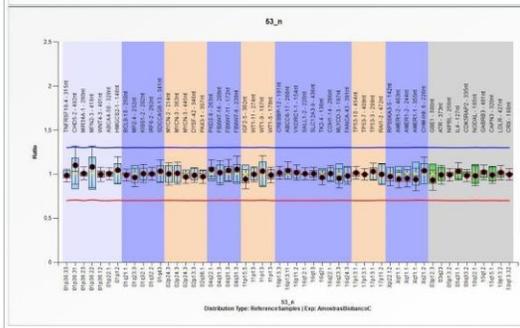
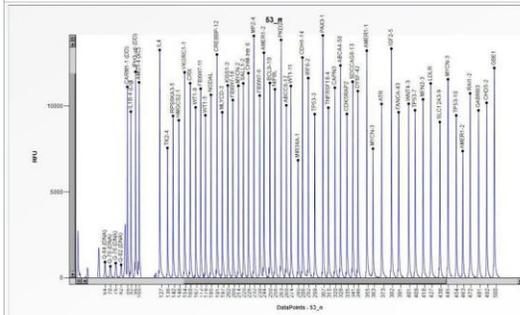
MLPA probe mix: P380-Wilm's tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-1)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 0%
 RSO: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSP18-4	01p36.33	01-001.129430	9910	76186	0.99	0.04	=	71	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	10195	89949	1.1	0.11	=	78	0.05	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6849	51053	1.01	0.04	=	52	0.03	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	10395	89491	1.08	0.12	=	84	0.07	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	10139	84867	1	0.04	=	69	0.01	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	12667	95325	1.01	0.03	=	61	0.05	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	9178	63303	1.05	0.08	=	58	0.03	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	11349	82702	0.99	0.03	=	58	0.06	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	14088	102398	0.96	0.05	=	57	0.05	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	11206	77355	1.01	0.05	=	59	0.06	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	11635	89546	1	0.04	=	51	0.01	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	11418	90894	1.03	0.06	=	62	0.03	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	11184	79942	1	0.06	=	59	0.03	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	7524	60873	1.01	0.06	=	65	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	11566	99085	0.97	0.04	=	59	0.04	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	10877	84057	0.99	0.04	=	56	0.01	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	14118	106819	0.97	0.04	=	66	0.05	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	13855	102881	1.05	0.05	=	60	0.07	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	10356	71736	1.02	0.07	=	62	0.03	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	11018	74785	1.04	0.06	=	45	0.02	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	10617	75994	1.06	0.07	=	52	0.05	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	13349	112004	0.94	0.05	=	90	0.07	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	11174	83046	1	0.04	=	59	0.03	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	9931	68686	1.03	0.09	=	62	0.01	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	9469	67253	0.99	0.04	=	51	0.05	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	13008	95177	1.02	0.04	=	64	0.01	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	10049	76899	1.04	0.05	=	57	0.06	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	11971	87301	1.02	0.04	=	64	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	11326	82842	1.01	0.03	=	60	0.02	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	9075	80242	1.01	0.04	=	93	0.09	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	7566	55360	0.96	0.04	=	60	0.02	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	12632	87963	1.01	0.05	=	70	0.03	-
197	MYL2C-3	16q23.3	16-082.499340	9645	70045	0.95	0.06	=	60	0.07	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	9647	82618	0.98	0.05	=	89	0.03	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	9459	81213	1.01	0.04	=	85	0.01	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	9762	84855	1	0.03	=	80	0.10	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	9532	73747	1.03	0.05	=	79	0.01	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017.568050	10743	89440	1	0.06	=	92	0.05	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	9432	67190	0.97	0.05	=	69	0.06	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	7387	62209	0.94	0.05	=	64	0.07	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	13111	98390	0.95	0.05	=	57	0.08	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	13230	109143	0.94	0.06	=	80	0.00	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	11921	82139	1.04	0.08	=	58	0.03	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	12221	113204	0.93	0.06	=	94	0.00	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	10128	82145	0.99	0.05	=	89	0.05	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	10963	80848	0.99	0.04	=	58	0.04	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	13270	96196	1.03	0.05	=	91	0.01	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	9550	74483	0.98	0.03	=	69	0.05	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	10655	79522	0.98	0.06	=	67	0.00	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	9755	87215	1.02	0.04	=	75	0.04	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	11074	82582	0.99	0.05	=	59	0.00	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	11322	97114	1.02	0.04	=	77	0.10	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	11332	82346	1	0.03	=	57	0.02	-

Median value all probe values: **10877 82618 1 0.05 62 0.03**



Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilm's tumour product description.

Rim normal



Sample report: 54_n

Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Reference | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software Version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

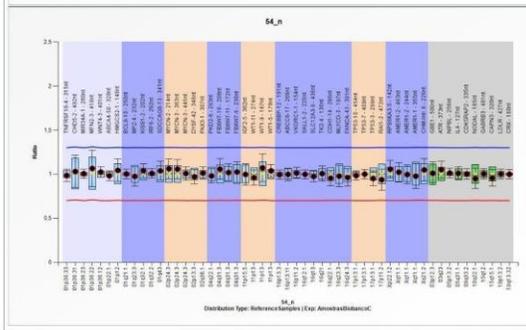
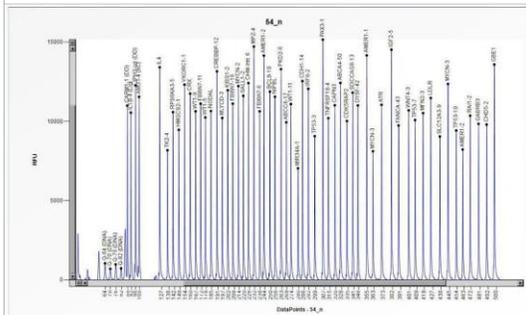
MLPA probe mix: P380-Wilm's tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-1)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 0%
 RBO: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	10202	78516	0.98	0.03		72	0.02	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	9796	88753	1.03	0.09		84	0.05	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7041	54002	1.01	0.03		53	0.01	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	10521	90798	1.06	0.1		88	0.02	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	10690	91884	1.02	0.03		76	0.07	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	12423	97483	0.98	0.03		63	0.05	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	9462	65414	1.04	0.06		55	0.01	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	11874	86564	1	0.03		61	0.01	-
233	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	14712	108468	0.97	0.05		58	0.07	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	11961	83027	1.04	0.04		58	0.05	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	12051	92424	1.01	0.03		48	0.07	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	11809	93875	1.04	0.05		61	0.03	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	12224	86836	1.06	0.06		59	0.04	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	8113	68347	1.06	0.06		76	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	12354	109880	1.01	0.04		90	0.03	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	11003	84831	0.97	0.04		56	0.01	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	15152	116815	1.01	0.04		65	0.05	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	13291	99680	0.98	0.04		59	0.04	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	11113	77772	1.06	0.06		64	0.03	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	11115	77369	1.02	0.05		54	0.03	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	10633	77660	1.02	0.06		53	0.08	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	14515	120883	1	0.06		98	0.02	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	11088	83543	0.96	0.04		60	0.09	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	10635	73873	1.07	0.08		62	0.05	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	10247	72826	1.04	0.04		53	0.01	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	13151	96083	0.99	0.03		65	0.06	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	9938	76147	1	0.04		59	0.03	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	12310	88520	1.01	0.03		65	0.04	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	11606	83811	1	0.02		60	0.03	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	9044	80636	0.97	0.03		98	0.01	-
138	TK2-4	16q21	16-065.128370	8175	57950	1.01	0.04		66	0.00	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	12537	96917	0.95	0.04		69	0.02	-
197	MYLCD-3	16q23.3	16-082.499340	10212	74077	0.98	0.06		62	0.06	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	9740	84388	0.96	0.05		86	0.05	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	9420	80883	0.98	0.03		62	0.00	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	10081	85907	1	0.03		79	0.02	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	9065	71253	0.95	0.04		77	0.00	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017.568050	10357	96185	0.94	0.06		91	0.04	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	10582	74331	1.06	0.05		64	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	8222	72051	1.02	0.05		66	0.06	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	14143	104697	1	0.05		55	0.03	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	14168	116990	0.98	0.07		77	0.02	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	12413	86132	1.05	0.06		57	0.05	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	13581	128699	1.01	0.07		104	0.00	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	11045	88614	1.05	0.05		85	0.02	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	11549	85397	1.01	0.03		58	0.09	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	13411	98110	1.01	0.04		92	0.01	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	10022	78368	1	0.03		61	0.05	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	10649	77701	0.95	0.06		63	0.03	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	9840	88975	1	0.03		71	0.03	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	11011	82122	0.96	0.05		57	0.00	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	11472	100223	1	0.03		93	0.00	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	11747	83412	1	0.03		58	0.01	-

Median value all probe values: 11045 85397 1 0.04 63 0.03



Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcolland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilm's tumour product description.

Rim normal



Sample report: 55_n

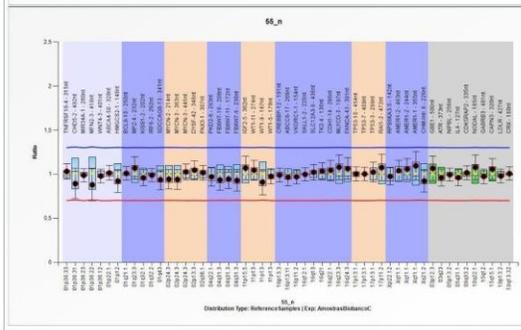
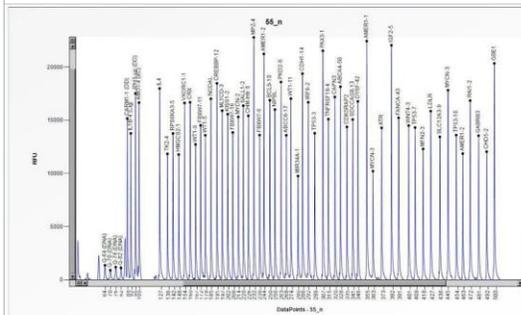
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Reference | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software Version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P380-Wilm's tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK -3%
 RSO: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSP18-4	01p36.33	01-001.129430	15106	129753	1.03	0.04	=	73	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	12050	117923	0.89	0.09	=	80	0.03	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	9768	83538	0.99	0.04	=	53	0.05	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	12309	117710	0.88	0.09	=	78	0.03	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	14504	140007	0.98	0.04	=	80	0.08	-
328	ABCA4-50	01p22.1	01-094.231210	19166	195051	1.01	0.04	=	65	0.05	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	11781	90121	0.92	0.06	=	63	0.03	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	16885	134953	1.01	0.04	=	59	0.02	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	22790	189515	1.07	0.06	=	62	0.02	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	15577	120968	0.96	0.05	=	60	0.05	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	16695	142922	0.99	0.04	=	49	0.00	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	15080	134392	0.94	0.06	=	64	0.05	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	15323	125540	0.94	0.06	=	59	0.02	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	10223	93164	0.94	0.06	=	66	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	17829	171086	1.03	0.04	=	60	0.04	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	16778	141729	1.05	0.05	=	61	0.00	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	21531	186954	1.02	0.04	=	66	0.06	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	18595	153720	0.97	0.05	=	61	0.02	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	13857	106655	0.93	0.06	=	64	0.02	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	14527	112024	0.94	0.05	=	45	0.02	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	13612	110462	0.93	0.06	=	51	0.02	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	22049	206531	1.07	0.07	=	97	0.02	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	17039	141134	1.04	0.05	=	64	0.05	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	12741	96998	0.91	0.07	=	53	0.01	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	13595	105981	0.98	0.04	=	47	0.05	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	18467	146759	0.99	0.04	=	59	0.08	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	13594	117335	0.97	0.05	=	61	0.00	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	16626	136488	0.97	0.04	=	64	0.02	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	16373	135613	1.04	0.04	=	63	0.08	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	13438	130692	1.02	0.04	=	91	0.00	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	11841	94874	1.03	0.05	=	66	0.03	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	19389	169272	1.04	0.06	=	72	0.00	-
197	MYLDC-3	16q23.3	16-082.499340	15910	126406	1.08	0.07	=	61	0.07	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	15240	144810	1.06	0.06	=	79	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	13612	131488	1.04	0.04	=	77	0.02	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	14315	134770	1.04	0.04	=	61	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	13783	117775	1.02	0.06	=	77	0.02	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017.568050	16854	172093	1.07	0.07	=	86	0.00	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	13764	110153	0.97	0.05	=	68	0.06	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	11868	110327	1.04	0.06	=	71	0.00	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	21235	175911	1.06	0.06	=	57	0.04	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	22444	205465	1.09	0.08	=	77	0.00	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	15424	125262	0.92	0.06	=	58	0.00	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	20351	208531	1.07	0.07	=	98	0.00	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	14290	130352	0.96	0.05	=	94	0.04	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	16009	133303	0.99	0.04	=	61	0.08	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	17992	145710	0.96	0.05	=	77	0.01	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	14377	120278	1.02	0.04	=	61	0.04	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	17027	136394	1.08	0.07	=	64	0.00	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	13552	131456	0.97	0.04	=	65	0.00	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	17190	137974	1.06	0.06	=	66	0.00	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	15862	153636	0.98	0.04	=	95	0.00	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	16690	135741	1.01	0.04	=	59	0.02	-

Median value all probe values: 15424 134392 1 0.05 84 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilm's tumour product description.

Rim normal



Sample report: 20

Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

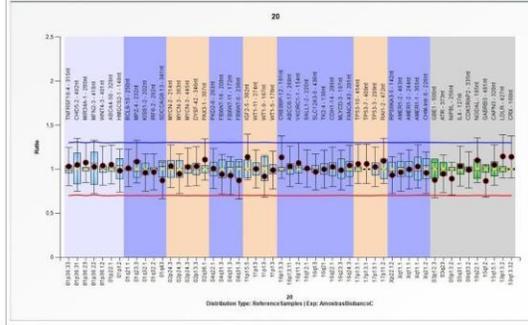
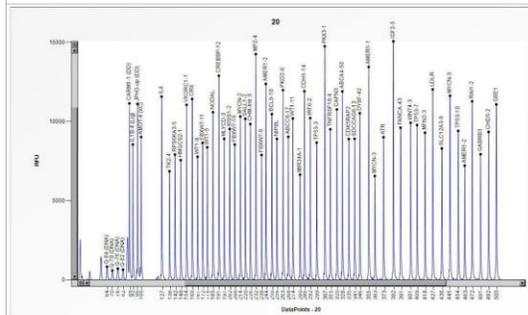
Authorization

Date

MPLA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-
 Analysis method: Block SSC: On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMS: OK 100%
 PSLP: OK -9%
 RQ: OK
 RPQ: Warning
 CAS: OK? 85%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	9508	71278	1.03	0.11	=	67	0.04	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.158950	9339	81214	1.05	0.15	=	89	0.30	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6639	49915	1.07	0.11	=	54	0.01	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	9291	76304	1.03	0.15	=	83	0.00	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	9917	83993	1.04	0.11	=	77	0.07	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	11868	96530	1.05	0.11	=	64	0.05	-
148	HMGC2-1	01p12	01-120.113020	7561	53267	0.98	0.12	=	60	0.07	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	10467	75901	1.01	0.11	=	49	0.00	-
232	MZF4	01q23.3	01-159.542830	14251	101278	1.09	0.12	=	50	0.00	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	9529	64548	0.96	0.11	=	47	0.02	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	10216	75597	0.97	0.1	=	49	0.07	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	8905	68989	0.87	0.1	=	60	0.06	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.599780	10310	71500	1.04	0.12	=	47	0.01	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	6562	50877	0.95	0.11	=	54	0.06	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	11625	99581	1.02	0.11	=	72	0.05	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.694010	10523	78723	1.03	0.11	=	52	0.06	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	14744	109764	1.11	0.12	=	67	0.03	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	11981	86541	1.01	0.11	=	64	0.03	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	8547	58389	0.94	0.11	=	48	0.02	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	8652	59078	0.93	0.11	=	46	0.00	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	7884	57662	0.87	0.11	=	59	0.06	-
382	IGFBP5	11p15.5	11-002.118910	15063	122070	1.14	0.13	=	89	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	10192	73976	1.1	0.11	=	51	0.03	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	7774	52104	0.92	0.12	=	35	0.04	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	8372	56712	0.99	0.11	=	29	0.04	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	12885	93142	1.13	0.12	=	57	0.05	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.183750	9027	66803	1.03	0.11	=	59	0.01	-
154	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013380	11048	78795	1.07	0.12	=	65	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	10168	70854	1.01	0.11	=	51	0.01	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	8300	73038	0.97	0.1	=	87	0.06	-
138	TNF2-4	16q21	16-065.128370	6859	49048	1.1	0.11	=	64	0.04	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	11912	86965	1.03	0.11	=	58	0.05	-
197	MYLDC-3	16q23.3	16-082.499340	8905	61706	0.99	0.11	=	56	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	9605	80278	1.04	0.12	=	84	0.01	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	9407	80580	1.06	0.11	=	78	0.02	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	9770	80434	1.06	0.11	=	62	0.02	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	8668	64821	1.03	0.11	=	57	0.02	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	11273	100502	1.09	0.13	=	96	0.03	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	7908	54170	0.93	0.1	=	59	0.02	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	7211	60332	0.96	0.11	=	67	0.01	-
244	AMER1-1	Xq11.1	X-063.329590	12371	89006	1.1	0.11	=	54	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	13445	107067	1.03	0.12	=	75	0.00	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	8640	66436	0.96	0.12	=	48	0.05	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	11078	102318	0.88	0.1	=	97	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	9007	70264	0.95	0.11	=	71	0.05	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012060	8803	63961	0.89	0.09	=	45	0.00	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	11572	84092	1.03	0.11	=	81	0.07	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	8893	68959	0.99	0.1	=	57	0.11	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	10588	76963	1.1	0.13	=	71	0.03	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	7929	69651	0.87	0.09	=	61	0.08	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	10757	80106	1.05	0.12	=	53	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	12029	101364	1.14	0.12	=	91	0.01	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	11421	79984	1.14	0.12	=	62	0.01	-

Median value all probe values: **9770 75597 1.02 0.11*** **80 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

Amostra 20 - Excluída por não atingir o controle de qualidade da técnica de MPLA



Sample report: 29

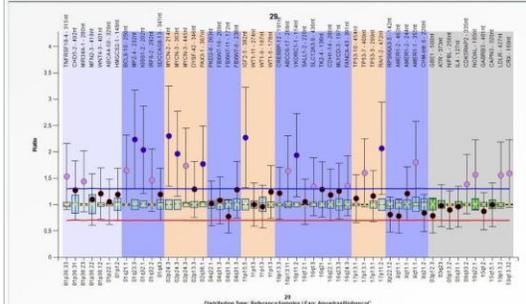
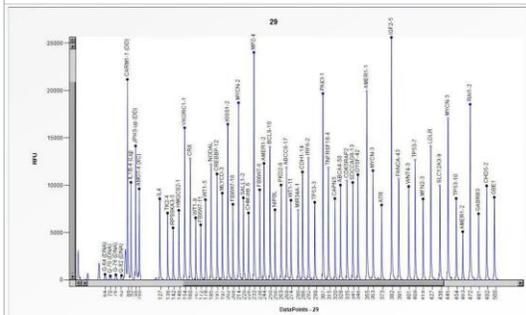
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MPLA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC: On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 90%
 PSLP: OK 0%
 RQ: OK
 RPO: Bad
 CAS: OK? 75%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	TNFRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	11844	90544	1.53	0.31	>*	73	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	9940	85721	1.27	0.28	=	90	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7374	55238	1.44	0.29	>*	58	0.03	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	8560	70506	1.1	0.24	=	47	0.02	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	9673	81199	1.21	0.24	=	68	0.05	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	10016	76987	1.05	0.21	=	63	0.02	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	7353	51336	1.19	0.25	=	56	0.07	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	14044	100904	1.65	0.33	>*	61	0.00	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	24034	171795	2.24	0.47	>>*	63	0.02	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	16451	114755	2.04	0.42	>>*	46	0.02	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	12883	94586	1.46	0.3	>*	49	0.00	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	10292	81578	1.19	0.25	=	58	0.02	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	18714	133482	2.3	0.47	>>*	61	0.05	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	11548	91579	1.96	0.41	>>*	63	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	17071	144813	1.74	0.35	>*	59	0.04	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	11119	84930	1.29	0.27	=	56	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	19860	148992	1.77	0.36	>>*	68	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	10024	74233	1.02	0.21	=	66	0.01	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	7985	54775	1.08	0.22	=	47	0.00	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	5824	39614	0.77	0.16	=	47	0.05	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	9524	70269	1.25	0.27	=	53	0.01	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	25616	206792	2.27	0.48	>>*	96	0.02	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	8413	62403	1	0.21	=	53	0.06	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	6563	44840	0.96	0.2	=	34	0.10	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	8485	59374	1.24	0.25	=	55	0.06	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	11196	76985	1.22	0.25	=	45	0.01	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	11851	89930	1.64	0.33	>*	57	0.05	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	16073	116379	1.84	0.39	>>*	66	0.09	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	8674	64311	1.05	0.21	=	57	0.01	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	9941	87697	1.34	0.27	>*	90	0.06	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	7064	50791	1.29	0.26	=	58	0.05	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	11410	86188	1.18	0.25	=	69	0.01	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	9173	65661	1.26	0.28	=	57	0.04	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	10673	88653	1.36	0.28	>*	83	0.04	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514690	8626	73476	1.12	0.23	=	88	0.04	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	12671	103567	1.6	0.32	>*	59	0.02	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	8201	62783	1.16	0.24	=	69	0.01	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	18555	170266	2.07	0.44	>>*	99	0.06	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	5502	38993	0.81	0.17	=	62	0.03	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326880	5095	42166	0.78	0.16	=	60	0.04	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	12312	89351	1.21	0.25	=	56	0.05	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	19935	156989	1.8	0.39	>*	67	0.04	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	7077	48699	0.84	0.18	=	48	0.04	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	8730	78556	0.79	0.17	=	84	0.01	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	7911	61369	0.98	0.2	=	65	0.03	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	7405	53958	0.9	0.18	=	56	0.02	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	8576	61231	0.96	0.2	=	73	0.00	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	10465	82066	1.39	0.28	>*	71	0.04	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	12192	86194	1.57	0.33	>*	65	0.06	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	6990	60274	0.87	0.18	=	63	0.03	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	8590	64276	1	0.21	=	59	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	14119	122079	1.56	0.32	>*	107	0.04	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	12819	92475	1.59	0.32	>*	57	0.09	-

Median value all probe values: 10016 81199 1.26 0.26* 61 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

Amostra 29 - Excluída por não atingir o controle de qualidade da técnica de MPLA



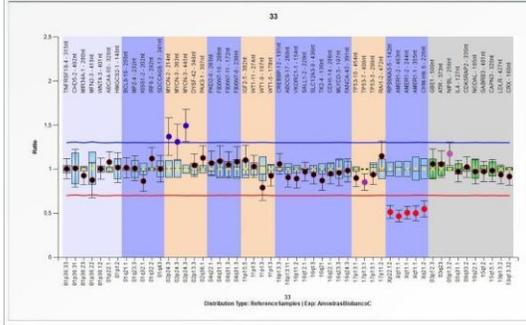
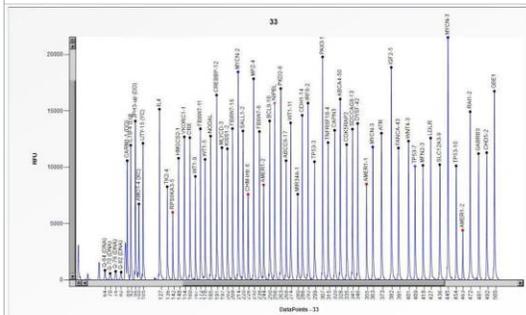
Sample report: 33
 Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MPLA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 5%
 RSO: OK
 RPO: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSP18-4	01p36.33	01-001.129430	12190	102537	1	0.06	=	74	0.03	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.158850	1287	109628	1.01	0.11	=	62	0.03	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7608	62766	0.93	0.05	=	51	0.02	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	10163	92078	0.88	0.1	=	91	0.03	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	12319	111048	1	0.06	=	70	0.07	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	16949	133225	1.08	0.06	=	71	0.03	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	10799	80506	1.02	0.09	=	65	0.04	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	14110	110430	1.02	0.06	=	63	0.04	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	17848	137794	1.01	0.07	=	54	0.00	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	11638	86109	0.86	0.06	=	46	0.03	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	15690	125988	1.12	0.06	=	51	0.03	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	13384	112359	1	0.08	=	59	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	18460	142324	1.37	0.11	>>	62	0.04	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	11795	99398	1.31	0.1	>>	79	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	21519	200279	1.49	0.09	>>	72	0.07	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.894010	13883	115744	1.04	0.06	=	56	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	19765	162564	1.13	0.07	=	68	0.02	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	16979	133064	1.07	0.07	=	61	0.01	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	13427	98882	1.09	0.09	=	50	0.05	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	13412	100789	1.05	0.07	=	47	0.06	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	13163	105287	1.08	0.09	=	57	0.02	-
382	IGFBP2-5	11p15.5	11-002.118910	18857	167786	1.1	0.08	=	97	0.07	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	13936	109468	1.03	0.06	=	54	0.03	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	9185	66626	0.79	0.07	=	38	0.04	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	10696	82172	0.93	0.06	=	63	0.02	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	16395	126090	1.06	0.06	=	61	0.02	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.183750	10583	86454	0.91	0.06	=	57	0.01	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	12695	96989	0.89	0.05	=	58	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	13215	101134	0.97	0.05	=	49	0.05	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	10225	95892	0.94	0.05	=	88	0.02	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	8273	63864	0.87	0.06	=	61	0.02	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	14608	121398	0.95	0.06	=	74	0.03	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	11735	88718	0.96	0.07	=	56	0.02	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	11706	105037	0.98	0.07	=	84	0.04	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514890	10121	93091	0.9	0.05	=	74	0.00	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	10082	91647	0.85	0.05	<<	79	0.08	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	10488	86487	0.94	0.06	=	68	0.01	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	14932	145855	1.15	0.08	=	104	0.04	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	6904	44538	0.51	0.04	<<<	53	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326880	4404	38265	0.47	0.03	<<<	48	0.03	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	8433	67185	0.51	0.04	<<<	54	0.04	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	8501	70890	0.5	0.04	<<<	61	0.00	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	7598	54924	0.65	0.05	<<<	51	0.03	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	16743	165712	1.06	0.08	=	92	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	13019	109229	1.06	0.07	=	71	0.07	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012960	15690	124390	1.17	0.07	>>	65	0.05	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	15148	118919	0.97	0.06	=	97	0.03	-
335	CDKSRAP2	09q33.2	09-122.370430	12008	100360	1.02	0.06	=	69	0.04	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	12766	99592	0.97	0.07	=	67	0.02	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	11205	104930	0.97	0.06	=	65	0.05	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	13276	106386	0.98	0.06	=	58	0.03	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	12592	117320	0.94	0.05	=	83	0.01	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	12623	97677	0.92	0.05	=	58	0.01	-

Median value all probe values: **12623 102537 0.98 0.06 63 0.03**

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

Amostra 33 - Excluída por não atingir o controle de qualidade da técnica de MPLA



Sample report: 38

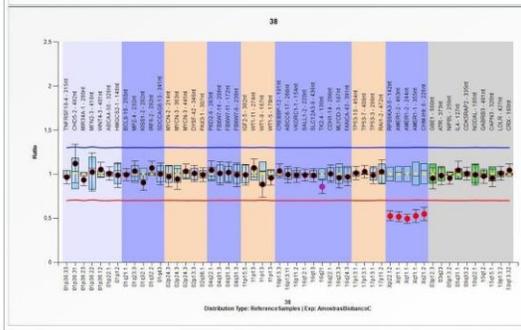
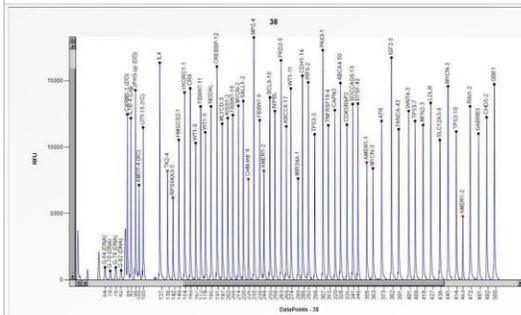
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MPLA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-)
 Analysis method: Block SSC: On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 12%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK -3%
 RSD: OK
 RPD: OK
 CAS: OK 100%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio [#]	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRSF18-4	01p36.33	01-001.129430	11644	92579	0.97	0.04	=	72	0.00	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	12245	109632	1.12	0.11	=	81	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	7632	60159	0.93	0.03	=	54	0.04	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	11673	101487	1.02	0.11	=	77	0.02	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	12717	109318	1.05	0.04	=	79	0.07	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	14829	117225	1.01	0.04	=	63	0.02	-
148	HMGC2-1	01p12	01-120.113020	10542	74688	0.99	0.07	=	55	0.07	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	13747	104497	0.99	0.03	=	61	0.04	-
232	MZF4	01q23.3	01-159.542830	16261	134827	1.03	0.06	=	64	0.00	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	12193	85849	0.9	0.04	=	60	0.01	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	14884	114396	1.07	0.04	=	50	0.00	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	13240	106159	1	0.06	=	61	0.02	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	13108	95400	0.97	0.06	=	48	0.04	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	8402	69340	0.94	0.06	=	66	0.04	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	14589	129135	1.03	0.04	=	62	0.04	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.894010	13276	104739	1.01	0.05	=	55	0.03	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	17299	136127	0.99	0.04	=	66	0.02	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	16535	124502	1.04	0.05	=	59	0.05	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	12416	87575	1.01	0.07	=	47	0.00	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	13065	91894	1.02	0.06	=	47	0.07	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	12026	91720	0.99	0.07	=	53	0.05	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	16736	143489	0.99	0.06	=	85	0.05	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	14417	109069	1.07	0.05	=	63	0.01	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	10313	72990	0.88	0.07	=	46	0.03	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	11112	83540	0.96	0.04	=	63	0.10	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	16064	118112	1.04	0.04	=	62	0.07	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.163750	11564	89647	0.99	0.05	=	57	0.01	-
154	VRCRC1-1	16p11.2	16-031.013360	14120	105164	0.99	0.04	=	63	0.09	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	13469	98052	0.99	0.03	=	59	0.03	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	10544	95535	0.99	0.04	=	81	0.03	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	8205	61250	0.86	0.04	<<	66	0.04	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	15370	119710	1	0.05	=	68	0.01	-
197	MYL2-3	16q23.3	16-082.499340	11764	84917	0.96	0.06	=	64	0.03	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	11351	100760	0.97	0.05	=	85	0.06	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514890	11170	96910	1.01	0.04	=	62	0.03	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	11968	103042	1.03	0.04	=	77	0.03	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	10965	87246	0.99	0.05	=	71	0.02	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	13074	122965	1.03	0.07	=	88	0.01	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	6191	43839	0.53	0.03	<<<	63	0.02	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	4785	40030	0.52	0.03	<<<	54	0.02	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	8218	62575	0.49	0.03	<<<	55	0.01	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	8844	71678	0.53	0.04	<<<	63	0.02	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	7592	53391	0.65	0.04	<<<	50	0.02	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	14731	140069	0.95	0.06	=	93	0.01	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	11969	98756	0.98	0.05	=	94	0.01	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.012060	12719	96312	0.96	0.03	=	62	0.03	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	16350	122103	1.04	0.05	=	97	0.03	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	11690	91160	1.01	0.04	=	62	0.03	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	13069	94580	0.99	0.06	=	63	0.01	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	11016	101659	0.98	0.04	=	78	0.03	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	12788	96432	0.96	0.05	=	56	0.02	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	13325	119059	1.01	0.04	=	98	0.04	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	14432	105746	1.04	0.04	=	56	0.00	-

Median value all probe values: 12416 98052 0.99 0.04 63 0.03

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

Amostra 38 - Excluída por não atingir o controle de qualidade da técnica de MPLA



Sample report: 42

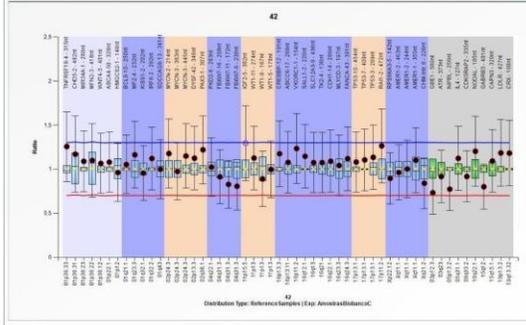
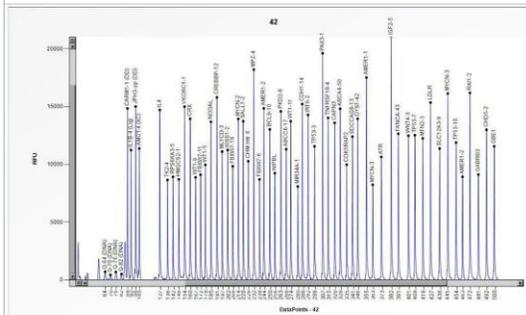
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
 Sample type: Sample | Machine: ABI-3501 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

MPLA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
 Analysis method: Block SSC: On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Female
 Residual primer %: OK 11%

FRS: OK 100%
 FMS: OK 100%
 PSLP: Warning -10%
 RQ: OK
 RPO: Warning
 CAS: OK? 75%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THFRSP18-4	01p36.33	01-001.129430	14013	109172	1.26	0.2		72	0.01	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	12988	116367	1.17	0.22		91	0.01	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	8080	63189	1.09	0.17		53	0.05	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	12247	106307	1.1	0.21		88	0.03	-
401	WNT4-3	01p36.12	01-022.320550	12474	107557	1.07	0.17		83	0.01	-
328	APCA4-50	01q22.1	01-094.231210	14805	116565	1.08	0.17		63	0.01	-
148	HMGCS2-1	01p12	01-120.113020	8693	61770	0.96	0.16		42	0.03	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	13023	96861	1.05	0.17		61	0.05	-
232	MPZ4	01q23.3	01-159.542830	18192	136308	1.16	0.19		57	0.06	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	11240	81331	0.96	0.16		62	0.06	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	14272	111217	1.12	0.18		50	0.04	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	12396	99626	1	0.17		60	0.01	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-015.099780	13933	103271	1.18	0.2		50	0.07	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	8233	66834	0.97	0.16		56	0.01	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	16122	140418	1.15	0.18		62	0.04	-
346	DYSP-42	02p13.3	02-071.894010	13942	106270	1.12	0.18		52	0.06	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.871610	19605	153000	1.22	0.19		65	0.00	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	14580	110407	1.02	0.17		68	0.01	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	9834	70377	0.91	0.15		46	0.05	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	9100	63079	0.83	0.14		45	0.00	-
238	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	8691	63235	0.81	0.14		49	0.01	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	20980	175957	1.3	0.21	>*	92	0.01	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	13726	103710	1.13	0.18		65	0.01	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	8972	63340	0.89	0.16		59	0.04	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	9952	72614	1	0.16		51	0.05	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	15794	114344	1.17	0.19		63	0.04	-
268	ABCC8-17	16p13.11	16-016.183750	11308	88039	1.08	0.17		54	0.02	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013380	14989	112166	1.23	0.2		68	0.01	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	13733	106517	1.15	0.18		72	0.07	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	11364	102040	1.07	0.17		83	0.01	-
138	TN2-4	16q21	16-065.128370	8650	61396	1.07	0.17		55	0.02	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419580	15215	119218	1.09	0.18		68	0.02	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	11101	80705	1.04	0.17		54	0.05	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	12641	109904	1.12	0.18		75	0.04	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514890	11869	103868	1.08	0.17		86	0.00	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	12521	109053	1.11	0.17		59	0.01	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	11560	91044	1.13	0.18		76	0.01	-
472	RAL1-2	17p11.2	17-017.568050	16183	151553	1.26	0.21		93	0.02	-
142	RPS8KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	8914	62078	0.9	0.15		56	0.01	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326880	8926	75878	0.96	0.16		56	0.04	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	14842	112559	1	0.16		55	0.04	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	17510	143363	1.1	0.18		73	0.00	-
226	CHM1int. 6	Xq21.2	X-085.101110	10273	72251	0.84	0.14		47	0.02	-
500	GBE1	03p12.3	03-081.774630	11558	108924	0.73	0.12		95	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	10639	85635	0.92	0.15		63	0.01	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.02060	9236	68182	0.77	0.12		55	0.05	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	14706	106555	1.12	0.18		56	0.06	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	9972	79010	0.92	0.14		62	0.04	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	13678	97547	1.2	0.2		67	0.02	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	9120	81026	0.8	0.13		61	0.01	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	13584	102761	1.09	0.18		56	0.02	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	15347	135075	1.18	0.19		94	0.04	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	13945	101057	1.18	0.19		57	0.00	-

Median value all probe values: 12521 103271 1.08 0.17** 61 0.02

Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

Amostra 42 - Excluída por não atingir o controle de qualidade da técnica de MPLA



Sample report: 50

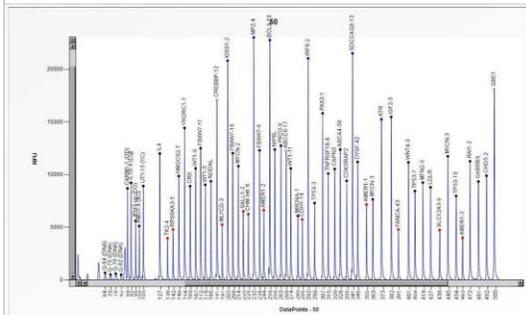
Project: AmostrasBibancoC | Experiment: AmostrasBibancoC | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin
Sample type: Sample | Machine: ABI-3500 | Report date: 04/07/2022 | Run date: 04/07/2022 | Software version: v.220513.1739

Authorization	
Date	

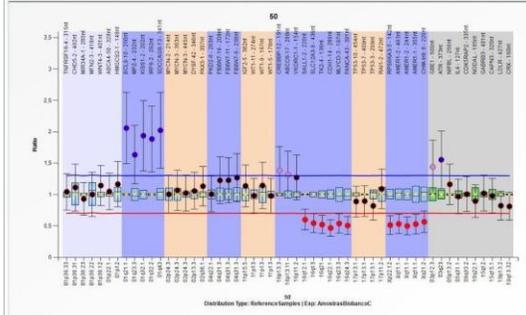
MPLA probe mix: P380-Wilms' tumour
 Lot number: B1-0220
 Sheet date: 01/07/2022 07:57:13
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-6)
 Analysis method: Block SSC; On
 Used metric: Peak height
 Reference Samples: 53_n | 54_n | 55_n

Nr of test probes: 53/53
 Nr of ref probes: 10/10
 DNA concentration: OK
 DNA denaturation: OK
 Expected gender: Male
 Residual primer %: OK 11%

FRSS: OK 100%
 FMRS: OK 100%
 PSLP: OK 5%
 RSO: OK
 RPQ: Bad
 CAS: OK? 75%



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	Width	d[nt]	[Mut details]
315	THRSFP18-4	01p36.33	01-001.129430	10093	75614	1.04	0.14	=	71	0.07	-
492	CHD5-2	01p36.31	01-006.150850	9890	86016	1.11	0.19	=	82	0.05	-
280	MIR34A-1	01p36.23	01-009.134420	6081	46468	0.93	0.13	=	54	0.03	-
418	MFN2-3	01p36.22	01-011.971940	9238	76757	1	0.17	=	80	0.00	-
401	WNTA-3	01p36.12	01-022.320550	11165	94017	1.14	0.16	=	80	0.02	-
328	ABCA4-50	01q22.1	01-094.231210	12364	94688	1.05	0.14	=	62	0.02	-
148	HMGC2-1	01p12	01-120.113020	9857	68153	1.16	0.18	=	56	0.02	-
250	BCL9-10	01q21.1	01-145.562810	22763	167537	2.06	0.28	>>*	67	0.05	-
232	MIR2-2	01q32.3	01-159.542830	23016	165598	1.63	0.23	>>*	69	0.03	-
202	KISS1-2	01q32.1	01-202.428550	20808	145461	1.94	0.28	>>*	64	0.04	-
292	IRF6-2	01q32.2	01-208.042100	21031	157794	1.88	0.26	>>*	77	0.00	-
341	SDCCAG8-13	01q43	01-241.608730	21500	168557	2.02	0.3	>>*	82	0.04	-
214	MYCN-2	02p24.3	02-013.099780	10794	76403	1	0.15	=	59	0.10	-
363	MYCN-3	02p24.3	02-016.003140	7648	58626	1.07	0.16	=	66	0.00	-
445	MYCN-3	02p24.3	02-016.003310	11731	101595	1.02	0.14	=	90	0.02	-
346	DYSF-42	02p13.3	02-071.694010	11193	85115	1.06	0.15	=	53	0.01	-
307	PAX3-1	02q36.1	02-222.671610	15817	118481	1.13	0.16	=	67	0.01	-
263	PKD2-6	04q22.1	04-089.186880	12745	91477	1.01	0.14	=	64	0.06	-
208	FBXW7-16	04q31.3	04-153.463560	12033	82683	1.23	0.19	=	62	0.01	-
172	FBXW7-11	04q31.3	04-153.471370	12504	86887	1.23	0.18	=	56	0.06	-
236	FBXW7-6	04q31.3	04-153.493220	12299	88722	1.27	0.19	=	52	0.04	-
382	IGF2-5	11p15.5	11-002.118910	15470	124047	1.14	0.17	=	90	0.03	-
274	WT1-11	11p13	11-032.366630	10582	76119	0.98	0.14	=	55	0.03	-
167	WT1-9	11p13	11-032.370830	10592	72130	1.14	0.18	=	61	0.05	-
178	WT1-5	11p13	11-032.395710	9030	62743	0.98	0.14	=	49	0.01	-
191	CREBBP-12	16p13.3	16-003.764660	17065	118835	1.38	0.19	>*	45	0.05	-
268	ABCG8-17	16p13.11	16-016.163750	12249	93013	1.32	0.19	>*	58	0.03	-
164	VKORC1-1	16p11.2	16-031.013360	14419	103694	1.27	0.18	=	63	0.06	-
220	SALL1-2	16q12.1	16-049.732800	6510	44717	0.6	0.08	<<*	41	0.09	-
436	SLC12A3-9	16q13	16-055.469530	4724	41632	0.54	0.07	<<*	93	0.04	-
136	TN2-4	16q21	16-065.128370	3955	27318	0.52	0.07	<<*	56	0.08	-
286	CDH1-14	16q22.1	16-067.419590	5739	40754	0.47	0.07	<<*	49	0.04	-
197	MLYCD-3	16q23.3	16-082.499340	5250	35506	0.54	0.08	<<*	51	0.05	-
391	FANCA-43	16q24.3	16-088.331930	4790	38767	0.57	0.07	<<*	58	0.02	-
454	TP53-10	17p13.1	17-007.514890	7971	67391	0.89	0.12	=	84	0.01	-
409	TP53-7	17p13.1	17-007.517800	8432	69519	0.9	0.12	=	58	0.03	-
299	TP53-3	17p13.1	17-007.520080	7297	53914	0.82	0.11	=	64	0.03	-
472	RAI1-2	17p11.2	17-017.568050	11262	100537	1.09	0.16	=	93	0.00	-
142	RPS3KA3-5	Xq22.12	X-020.123050	4789	32612	0.51	0.08	<<*	58	0.09	-
463	AMER1-2	Xq11.1	X-063.326860	4004	32202	0.53	0.08	<<*	51	0.00	-
244	AMER1-2	Xq11.1	X-063.329590	6623	48285	0.5	0.07	<<*	53	0.07	-
355	AMER1-1	Xq11.1	X-063.342160	7158	53596	0.53	0.08	<<*	61	0.01	-
226	CHM1int.6	Xq21.2	X-085.101110	6244	42275	0.56	0.09	<<*	51	0.01	-
500	GBE1	03p12.3	03-061.774630	18110	166580	1.44	0.21	>*	96	0.05	-
373	ATR	03q23	03-143.651080	15249	121132	1.55	0.23	>>*	84	0.05	-
256	NIPBL	05p13.2	05-037.02960	12375	89880	1.16	0.16	=	62	0.03	-
127	IL4	05q31.1	05-132.037620	11998	85575	0.97	0.14	=	76	0.06	-
335	CDK5RAP2	09q33.2	09-122.370430	9401	71147	1.01	0.14	=	59	0.03	-
185	NODAL	10q22.1	10-071.865510	9362	65557	0.89	0.13	=	67	0.06	-
481	GABRB3	15q12	15-024.344330	9341	82421	1.02	0.14	=	71	0.02	-
320	CAPN3	15q15.1	15-040.490380	10528	77975	0.98	0.14	=	59	0.04	-
427	LDLR	19p13.2	19-011.095270	8787	74281	0.82	0.11	=	99	0.04	-
160	CRX	19q13.32	19-053.029580	8901	62626	0.81	0.11	=	55	0.02	-
Median value all probe values:				10528	76757	1.02	0.14*		62	0.03	



Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <https://www.mrcholland.com>.
 Important information regarding individual probes can be found in Tables 1, 2a and 2b of the P380-B1 Wilms' tumour product description.

Amostra 50 - Excluída por não atingir o controle de qualidade da técnica de MPLA

Artigo do grupo de estudo: “Somatic Copy Number Alteration in Circulating Tumor DNA for Monitoring of Pediatric Patients with Cancer”



biomedicines



Article

Somatic Copy Number Alteration in Circulating Tumor DNA for Monitoring of Pediatric Patients with Cancer

Juliana Silveira Ruas ¹, Felipe Luz Torres Silva ^{1,2}, Mayara Ferreira Euzébio ^{1,2}, Tássia Oliveira Biazon ^{1,2}, Camila Maia Martin Daiggi ³, Daniel Nava ³, Mayra Troiani Franco ³, Izilda Aparecida Cardinali ³, Alejandro Enzo Cassone ³, Luiz Henrique Pereira ³, Ana Luiza Seidinger ¹, Mariana Maschietto ^{1,2} and Patricia Yoshioka Jotta ^{1,*}

- ¹ Research Center, Boldrini Children’s Hospital, Campinas 13083-884, SP, Brazil; ruasjulianas@gmail.com (J.S.R.); felipeluztorres@outlook.com (F.L.T.S.); ma.euzebio@gmail.com (M.F.E.); tassiabiazon@gmail.com (T.O.B.); analuseidinger@gmail.com (A.L.S.); marianamasc@gmail.com (M.M.)
² Genetics and Molecular Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas 13083-862, SP, Brazil
³ Boldrini Children’s Hospital, Campinas 13083-210, SP, Brazil; camilamdaiggi@gmail.com (C.M.M.D.); danielnava@gmail.com (D.N.); izilda.cardinali@boldrini.org.br (I.A.C.); alejandro.cassone@boldrini.org.br (A.E.C.); drluizhpereira@gmail.com (L.H.P.)
 * Correspondence: jottapaty@gmail.com

Abstract: Pediatric tumors share few recurrent mutations and are instead characterized by copy number alterations (CNAs). The cell-free DNA (cfDNA) is a prominent source for the detection of cancer-specific biomarkers in plasma. We profiled CNAs in the tumor tissues for further evaluation of alterations in 1q, MYCN and 17p in the circulating tumor DNA (ctDNA) in the peripheral blood at diagnosis and follow-up using digital PCR. We report that among the different kinds of tumors (neuroblastoma, Wilms tumor, Ewing sarcoma, rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma, osteosarcoma and benign teratoma), neuroblastoma presented the greatest amount of cfDNA, in correlation with tumor volume. Considering all tumors, cfDNA levels correlated with tumor stage, metastasis at diagnosis and metastasis developed during therapy. In the tumor tissue, at least one CNA (at CRABP2, TP53, surrogate markers for 1q and 17p, respectively, and MYCN) was observed in 89% of patients. At diagnosis, CNAs levels were concordant between tumor and ctDNA in 56% of the cases, and for the remaining 44%, 91.4% of the CNAs were present only in cfDNA and 8.6% only in the tumor. Within the cfDNA, we observed that 46% and 23% of the patients had MYCN and 1q gain, respectively. The use of specific CNAs as targets for liquid biopsy in pediatric patients with cancer can improve diagnosis and should be considered for monitoring of the disease response.

Keywords: cell-free DNA; circulating tumor DNA; copy number alterations; digital PCR; MYCN; 1q



Citation: Ruas, J.S.; Silva, F.L.T.; Euzébio, M.F.; Biazon, T.O.; Daiggi, C.M.M.; Nava, D.; Franco, M.T.; Cardinali, I.A.; Cassone, A.E.; Pereira, L.H.; et al. Somatic Copy Number Alteration in Circulating Tumor DNA for Monitoring of Pediatric Patients with Cancer. *Biomedicines* **2023**, *11*, 1082. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041082>

Academic Editors: Randolph C. Eble and Khalil Helou

Received: 31 January 2023

Revised: 2 March 2023

Accepted: 8 March 2023

Published: 3 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pediatric tumors represent a heterogeneous group of malignancies, including embryonic tumors, which are composed of undifferentiated cells left over from the early stages of embryo development [1]. These tumors can arise in different organs and typically affect children and young adults. The most common types of embryonal tumors are neuroblastoma, Wilms tumor, retinoblastoma, hepatoblastoma, central nervous system tumors and several kinds of sarcoma [2–4]. Given their lack of differentiation as well as their elevated growth potential, this group of tumors may behave aggressively, and treatment approaches have had variable success, depending on tumor type [4]. Molecular profiles obtained from these pediatric tumors are typically characterized by a relatively low mutational burden, with a high prevalence of structural variations, e.g., chromosomal rearrangements and copy number alterations (CNAs) driving tumorigenesis [5–7]. Solid pediatric cancers besides

embryonic tumors include some sarcomas (including osteosarcomas), central nervous system tumors and, more rarely, histologies usually found in adults [8].

CNAs have been profiled in thousands of tumor samples in virtually all cancer types [9]. In a series of 1699 pediatric tumors, 62% of the alterations were located in a CNA with many of them containing genes associated with cancer [8]. For several cancers, the chromosomal copy number profile of tumor tissue is not only prognostic but also a predictive biomarker of therapeutic response. For Wilms tumors, 1q and *MYCN* gains, as well as 17p loss, were correlated with a poor outcome [10–13]. For neuroblastoma, *MYCN* amplification, 1q gain as well as 1p and 11q deletions were independent predictors of decreased overall survival [14]. Although rare, CNAs have been reported in sarcomas and may be associated with a poor prognosis [15,16]. In particular, *MYCN* gain was associated with an adverse prognosis in patients with rhabdomyosarcoma [17].

Recurrent CNAs in *MYCN*, 1q and 17p loci are considered good biomarkers for cancer monitoring through circulating tumor DNA (ctDNA) detection in liquid biopsy since they are reported in several pediatric malignancies [18–24] and can be identified using accessible methodologies, such as digital PCR (dPCR) and qPCR [25]. Although dPCR provides limited information regarding the profile of alterations, it has a low cost and high sensitivity. Therefore, once the target regions are identified, great precision can readily be achieved with the depth of dPCR [26]. Although CNAs are present in several cancers, their measurement or even identification can be attenuated by sample heterogeneity, meaning precise measurements of this kind are required to discriminate small differences from normal [27].

ctDNA levels are associated with the prognosis and may assist in the disease monitoring of patients diagnosed with a wide range of malignancies, e.g., prostate, breast, bladder and ovarian cancer [25,28–33]. In patients diagnosed with osteosarcoma, higher ctDNA levels were associated with a worse prognosis [34]. ctDNA seems to present higher sensitivity compared to the plasma protein biomarkers (such as AFP, CEA and PSA), circulating tumor cells and miRNAs [29,35,36]. In hepatoblastomas, ctDNA was considered a more accurate indicator of disease severity and a better biomarker to track the dynamic tumor response compared to AFP [37].

In this study, we profiled CNAs in the tumor tissue from pediatric cancer, including embryonic tumors, followed by further evaluation of CNAs in 1q, *MYCN* and 17p in the circulating cell-free DNA (cfDNA) from plasma samples for long-term disease monitoring through liquid biopsy.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Eligibility and Sample Collection

This study only included Boldrini Children's Hospital patients who were diagnosed with cancer and who had (patient and/or parents) signed informed consent at the time of the enrolment. Pediatric patients with a pathology-confirmed diagnosis of Wilms tumor (n = 14), neuroblastoma (n = 10), Ewing sarcoma (n = 4), rhabdomyosarcoma (n = 4), leiomyosarcoma (n = 1), osteosarcoma (n = 1) or benign teratoma (n = 1) were included if a plasma sample was available for collection prior to initiation of any curative intervention. Clinical, image-based and pathological data were retrieved from medical records, such as histological diagnosis, stage, metastatic status at diagnosis and follow-up. We used tumor volumes obtained using computed tomography, which derived the measures using the Multislice technique, before and after intravenous injection of iodine contrast, with multiplanar reforms.

For all 35 patients, DNA from the fresh-frozen tumor tissue and ctDNA from the peripheral blood were analyzed before initiation of any treatment. On therapy, or after completion of treatment, blood samples were also collected for 7 patients (2 Wilms tumor, 3 neuroblastoma, 1 rhabdomyosarcoma and 1 osteosarcoma); these time points coincided with surveillance scans over therapy courses.

Tissue samples were then snap-frozen in RNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and blood samples were collected in an EDTA tube that was processed within

6 h. Samples were centrifuged at $2000\times g$ for 15 min at room temperature (RT) for plasma isolation, and then an additional high-speed centrifugation step ($3000\times g$ for 15 min at RT) was performed to ensure that the plasma was cell-free.

2.2. Characterization of the Copy Number Alterations (CNAs) in the Tumors

The GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma, St Louis, MO, USA; cat. ID: G1N70-1KT) was used for DNA extraction. DNA samples from tumor tissues were bisulfite converted using an EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA; cat. ID: D5002) and hybridized in EPIC Beadchip Methylation arrays (Illumina, San Diego, CA, USA). Copy number profiles were retrieved by applying the conumee package [38], which uses the sum of methylated and unmethylated signal intensities compared against healthy reference samples [39]. We determined the can status (diploid, gain or loss) by visual inspection.

For 8 samples canCNA data were retrieved from the SALSA MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification; MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) kit using the Probemix P380-B1, following the manufacturer's instructions. The results were analyzed on Coffalyser.Net.

2.3. ctDNA Analysis

Cell-free DNA was extracted from 1 mL of plasma using the QIAamp MinElute ccfDNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany; cat. ID: 55204). Cell-free DNA was quantified using the Qubit dsDNA High Sensitive Assay Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA; cat. ID: Q32854).

The dPCR assay was performed using the QIAcuity Probe PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany; cat. ID: 250102) in the QIAcuity One (Qiagen, Hilden, Germany). Reactions were set up for Nanoplate 26K 24-well plates (Qiagen, Hilden, Germany) in a volume of 40 μ L consisting of $1\times$ Probe PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), $1\times$ primer–probe mix (ThermoFisher, Waltham, MA, USA; cat. ID: Hs05712931, Hs00824796, Hs05506931) as well as 1 ng DNA template. Probes located at *CRABP2* (1q23, to represent 1q), *MYCN* (2p24) and *TP53* (17p13, to represent 17p) were labeled with FAM, and the internal control Copy Number Reference Assay RNaseP (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA; cat. ID: 4403328) was labeled with VIC. NTCs contained purified water instead of cfdDNA. RNaseP was used for normalization considering unknown and known technical biases, such as pipetting and presence of inhibitors. Our assays provided specific duplexed detection of the target and RNaseP.

Analysis was carried out in the QIAcuity Software Suite, version 2.1.7. 182 (Qiagen, Hilden, Germany), which defined fluorescence thresholds automatically. To enhance the accuracy of concentration measurements, the volume precision factor (VPF), which adjusts for tiny variations in nanoplate geometry, was applied, as recommended by the manufacturer.

2.4. Data Analysis

ctDNA was measured in ng/ μ L per 1 mL of plasma. Values were plotted in violin and correlations graphs using GraphPad Prism, version 9.0 (GraphPad Software). Statistical tests were applied according to the samples' grouping and distribution. Differences in cfdDNA or ctDNA between groups were calculated using the Mann–Whitney test (2 groups) or the Kruskal–Wallis test (3 or more groups). Spearman's one-tailed test was used to verify whether ctDNA was correlated with tumor characteristics.

3. Results

3.1. Characterization of 1q, MYCN and 17p Copy Number Status in the Tumors

Patients with a histological diagnosis of a tumor that had primary tumor tissue characterized for CNAs were evaluated using dPCR in the peripheral blood (Figure 1). Characteristics of the 35 patients and tumors were retrieved from medical records. Most patients were diagnosed with neuroblastoma, Wilms tumor, Ewing sarcoma or rhabdomyosarcoma. There was one case of each of leiomyosarcoma, osteosarcoma and benign teratoma (Table 1).

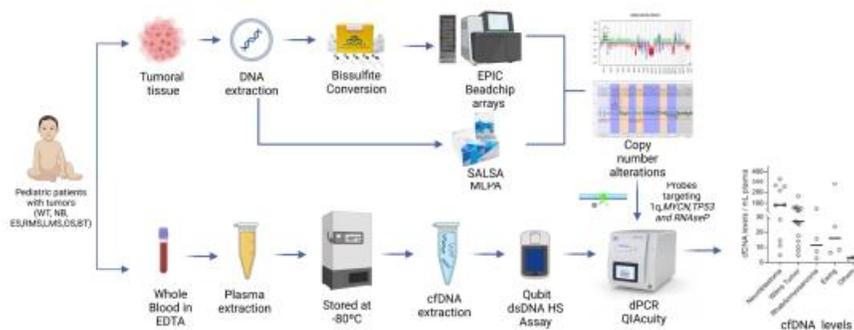


Figure 1. Overview of the study. Tumor tissue and whole blood were collected from pediatric patients diagnosed with cancer. Tumor tissue DNA was extracted and underwent either bisulfite conversion followed by hybridization in the EPIC BeadChip Methylation Arrays or SALSA MLPA assay. CNAs were obtained from either EPIC or MLPA data. Tumors with 1q gain, MYCN gain or TP53 gain/loss were selected for dPCR. Plasma was used for cDNA extraction and for CNAs' evaluation. WT, Wilms tumor; NB, neuroblastoma; ES, Ewing sarcoma; RMS, rhabdomyosarcoma; LMS, leiomyosarcoma; OS, osteosarcoma; and BT, benign teratoma.

Table 1. Characteristics of the patients and tumors.

Clinical Variable	Patients, No. (%)
Patients	35 (100%)
Sex	
Male	18 (51%)
Female	17 (49%)
Age, years	
1–10	29 (83%)
>10	6 (17%)
Diagnosis	
Wilms tumor	14 (40%)
Neuroblastoma	10 (29%)
Ewing Sarcoma	4 (11%)
Rhabdomyosarcoma	4 (11%)
Others	3 (9%)
Tumor Volume	
<50	5 (14%)
50–100	1 (3%)
101–500	16 (46%)
501–1000	8 (23%)
>1000	4 (11%)
Unknow	1 (3%)

Table 1. Cont.

Clinical Variable	Patients, No. (%)
Clinical Stage	
I	1 (3%)
II	9 (26%)
III	10 (29%)
IV	13 (37%)
Unknow	2 (6%)
Metastasis at diagnosis	
Yes	17 (49%)
No	18 (51%)
Metastasis during the treatment	
Yes	11 (31%)
No	19 (54%)
Unknow	5 (14%)
cfDNA levels (ng/mL plasma)	
<10	10 (29%)
10–50	13 (37%)
51–100	6 (17%)
>100	6 (17%)

The tumor samples were analyzed for CNAs of 1q, MYCN and TP53. Other CNAs present in these samples were not used for this study. Copy number profiling was derived from EPIC Beadchip arrays that showed 10 out of 26 tumors with a CNA. MLPA reported that four out of eight tumors also had at least one CNA. There were seven cases with 1q gain, nine with MYCN gain, one with TP53 loss and four with TP53 gain.

3.2. cfDNA Levels Reflect the Tumor Burden of Pediatric Patients at Diagnosis

cfDNA was extracted from the peripheral blood of patients before they began treatment. The cfDNA levels ranged from 2.16 ng to 334 ng per 1 mL of plasma (Table 1). Comparing the cfDNA levels/mL plasma between tumor types, neuroblastoma had higher median values, followed by Wilms tumor, Ewing sarcoma and rhabdomyosarcoma ($p = 0.0185$) (Figure 2A).

To investigate whether cfDNA had a relation to tumor burden, for all tumors, we compared the tumor characteristics with cfDNA levels. We observed that cfDNA levels were higher in patients with stage IV tumors compared to stages I/II ($p = 0.0227$) and stage III ($p = 0.0303$) in patients with metastasis at diagnosis ($p = 0.0153$) and in those who developed metastasis during treatment ($p = 0.0264$, Figure 2B–D). Although we did not identify an association with tumor histology, for neuroblastoma, we verified a correlation between cfDNA (ng/mL plasma) and the tumor volume ($p = 0.0172$; $R^2 = 0.5267$) (Figure 3). For the remaining cases, there was no association between cfDNA levels and clinical characteristics of each tumor type (Table 2).

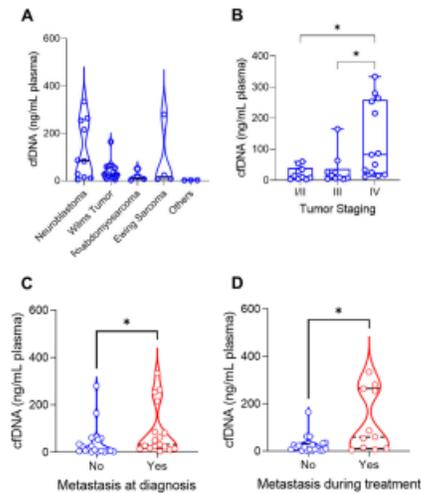


Figure 2. cfDNA levels at diagnosis were evaluated regarding the tumor characteristics. Statistically significant comparison where indicated by “*”. (A): cfDNA ng per mL plasma across tumor histologies ($p = 0.0201$, Kruskal–Wallis test). (B): cfDNA ng per mL plasma correlated with tumor stage (I/II–IV: $p = 0.0227$, III–IV: $p = 0.0303$). (C): Metastatic patients ($n = 17$) had higher levels of cfDNA at diagnosis compared with nonmetastatic patients ($n = 18$, $p = 0.0153$, Mann–Whitney U test). (D): Patients who developed metastasis during treatment ($n = 11$) also had higher levels of cfDNA compared to those who did not ($n = 19$, $p = 0.0264$, Mann–Whitney U test).

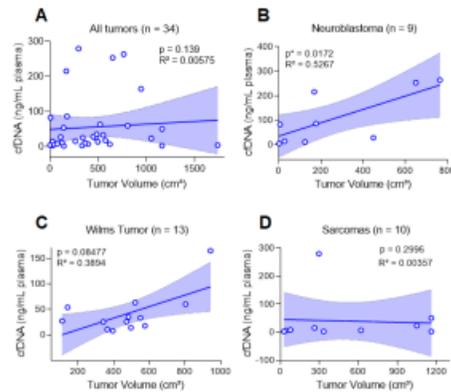


Figure 3. Correlation between cfDNA ng per mL plasma and tumor volume (Spearman’s correlation and linear regression). (A): cfDNA ng per mL plasma did not correlate with volume when all tumors were used. Considering each tumor type, (B): there was a correlation for neuroblastoma but not for (C): Wilms tumor or (D): sarcomas (Ewing sarcoma, embryonal rhabdomyosarcoma, osteosarcoma and leiomyosarcoma).

Table 2. Characteristics of the tumors.

Clinical Variable	Patients, No. (%)			Statistical Test
	WT	NB	Sarcomas	
I	0	0	1 (10%)	Not applied
II	6 (43%)	2 (20%)	1 (10%)	
III	5 (36%)	0	5 (50%)	
IV	3 (21%)	8 (80%)	2 (20%)	
Unknown	0	0	1 (10%)	
Correlation ctDNA levels vs. tumor staging				
I/II vs. III	$p = 0.99$	-	$p = 0.66$	Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test.
I/II vs. IV	$p = 0.99$	$p = 0.18$	$p = 0.05$	
III vs. IV	$p = 0.99$	-	$p = 0.32$	
Correlation ctDNA levels vs. tumor volume				
	$p = 0.08$	$p = 0.02$	$p = 0.29$	Spearman test.
ctDNA levels and metastasis vs. no-metastasis at diagnosis				
	$p = 0.70$	#	$p = 0.12$	Mann-Whitney test. # Statistics cannot be performed.
ctDNA levels and metastasis vs. no-metastasis during treatment				
	$p = 0.94$	#	$p = 0.50$	Mann-Whitney test. # Statistics cannot be performed.

3.3. ctDNA Plasma from Patients at Diagnosis Reflects CNA Status of the Tumor Tissues

At diagnosis, at least one tumor variant was detected in 31 out of 35 (89%) patients. From 79 tumor/ctDNA paired analyses, discordant genomic profiles represented 44%, of which 91% of CNAs were present only in ctDNA and 8.6% only in tumors (Figure 4).

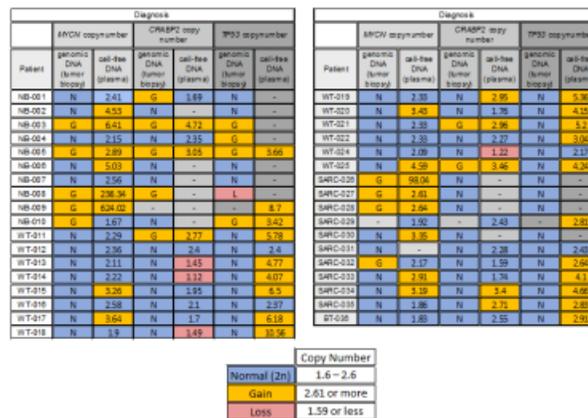


Figure 4. MYCN, CRABP2 (1q) and TP53 (17p) CN for tumor and peripheral blood. NB, neuroblastoma; WT, Wilms tumor; SARC, sarcomas; and BT, benign teratoma. Numbers refer to copy number of the target regions relative to RNaseP. The parameters for gain and loss are also displayed.

Considering only the ctDNA, the most common alteration at diagnosis was in 17p (83.3%, gain), followed by 1q (48%, of these 66.7% won and 33.3% lost) and MYCN (47%, gain). The MYCN gain was found in six out of nine neuroblastomas analyzed, four out of fourteen in Wilms tumors analyzed and six out of eight sarcomas analyzed.

In seven cases, serial plasma samples (one or two) were available for liquid biopsy and we checked for the presence of the CNAs characterized at the time of diagnosis (Figure 5).

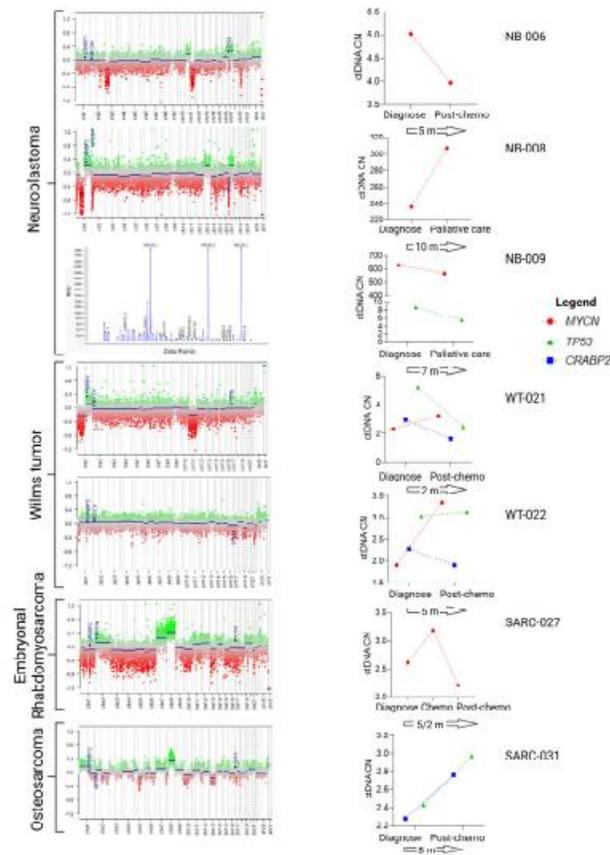


Figure 5. ctDNA CNA in follow-up samples from seven cases. CNAs in the tumor samples at diagnosis were characterized by methylome or MLPA. Genes evaluated in the ctDNA are labeled in blue. The ctDNA levels at diagnosis and in follow-up samples (graphs on the right) were determined by dPCR. The numbers contained within the arrows represent the time (in months) between the analyses performed at diagnosis and at follow-up. Chemo, chemotherapy.

Patient NB-006 had a neuroblastoma in which MYCN was not amplified in the sample assayed for CNA. However, the ctDNA showed an increase in the MYCN levels at diagnosis that decreased after 5 months, when ctDNA was re-evaluated. At this point in time, the tumor histology showed that the tumor comprised up to 8% immature neuroblasts, and the remaining cells were considered ganglioneuroma. Similarly, patient SARC-0027 was diagnosed with embryonal rhabdomyosarcoma with MYCN gain at diagnosis. Following chemotherapy, ctDNA levels increased and then decreased at the end of treatment, in agreement with the non-detection of tumor cells by standard tests. Patients NB-008 and NB-009 were both diagnosed with neuroblastoma with high amplification of MYCN. The

ctDNA levels remained high or did not change over a period of two evaluations, with both patients eventually dying of the disease.

The three other patients, WT-0021 (Wilms tumor), WT-0022 (Wilms tumor) and SARC-0031 (osteosarcoma), presented heterogeneous ctDNA levels in relation to the tumor tissue regarding the CNAs. WT-0021 had *CRABP2* and *TP53* gain at diagnosis that were normal in follow-up samples, but *MYCN* increased during follow-up. The patient is now out of treatment and does not have a detectable tumor. Both WT-0022 and SARC-0031 are considered in remission, although a small increase in the ctDNA has been observed. As these changes are small, they could be related to the limitations of the methodology; this will only be overcome through the analysis of a higher number of samples and by adjusting the technical parameters.

4. Discussion

Cancer cells often harbor genomic alterations that include partial or entire gains and losses of chromosomes, large intra-chromosomal inversions or translocations between different chromosomes, or more complex rearrangements. CNAs have been profiled in thousands of tumor samples in virtually all cancer types [9]. In pediatric tumors, among others, recurrent gains involve 1q25.2 (near *CRABP2*), 1q43, *MYCN*, *GLI2*, *MYC*, *TERT*, *BRAF* and 17p11.2, and recurrent losses involve 1p36.13, 4q34.3, *CDKN2A/B*, *PTEN*, 16q24.1, *TP53*, *IGLL5* and *SMARCB1* [5]. In this cohort, we verified that 89% of patients (31 out of 35) had at least one CNA identified in the tumor.

Liquid biopsy technologies have emerged as a minimally invasive approach useful when tumor tissue is inadequate or non-existent. Components derived from the tumor, such as the cell-free nucleic acids, might be measured as cfDNA or ctDNA, providing a potential tumor biomarker [40]. Patients with cancer usually have high concentrations of cfDNA in the peripheral blood [41], which may be dependent on tumor type. In our cohort, the median cfDNA ng/mL of plasma was highest for neuroblastoma, followed by Wilms tumor, Ewing sarcoma and rhabdomyosarcoma. In a cohort of 45 pediatric patients, cfDNA levels were also higher in neuroblastoma compared with osteosarcoma, rhabdomyosarcoma and Wilms tumor [42], which could be related to tumor biology. Moreover, cfDNA levels correlated with neuroblastoma tumor volume, but not for Wilms tumor or sarcomas. However, a greater number of cases need to be evaluated before drawing a more definitive conclusion. Neuroblastomas are aggressive tumors. In particular, those with *MYCN* amplification present a poor survival rate, even for localized disease [43]. The higher cfDNA levels in neuroblastoma could also reflect the high disease burden present in patients with metastatic disease [42]. Accordingly, independent of tumor type, we found that cfDNA levels were associated with metastasis at diagnosis and metastasis during treatment, with the ctDNA levels increasing strongly in the presence of distant metastases as well as with an advance of tumor stage.

To determine the source of ctDNA, which is a fraction of cfDNA, is a major limitation for the implementation of dPCR as a routine test for pediatric cancer. Pediatric solid tumors are known to show higher numbers of structural variants compared to point mutations [5]. The recurrent mutated genes are usually long, with the transcript divided into several exons, but no hotspots are reported in pediatric tumors, such as in the case of some tumor suppressor genes: *RB1* (27 exons), *WT1* (12 exons), *TP53* (11 exons), *PTEN* (10 exons). Some exceptions include mutation in exon 3 from *CNNTB1* in hepatoblastoma [44,45] and Wilms tumors [46] and *H3K27* in central nervous system tumors [47]; these are good candidates for liquid biopsy and are being tested in several tumors [48]. Due to the small quantity of recovered cfDNA and the characteristics of the mutational profile in pediatric tumors, the application of a target methodology, such as dPCR, can only be of limited use. Nevertheless, the use of CNAs in the peripheral blood can point to the presence of ctDNA [49]. ctDNA are fragments of around 166 bp DNA released in the blood by the tumor cells and they contain the original tumor molecular alterations. Digital PCR is a highly sensitive and linear method to assess the copy number in tumor-derived cfDNA from plasma. The methodology detects the absolute

concentration of targeted sequences and a diploid reference gene [18,27]. In this paper, we established the identification of CNAs in *CRABP2* and *TP53* as surrogates for 1q and 17p, respectively, as well as that of *MYCN* by dPCR, aiming toward the implementation of a routine copy number status assessment.

Considering that we used probes located at *TP53* as a surrogate for 17p, the finding that most samples presented 17p gain should be taken with caution as this high CNA number has not been found in the literature. The probe from this assay was located at the first intron from *TP53*. Non-coding regions are less resistant than coding regions to somatic alterations, which could explain, at least in part, the high number of alterations.

From 79 tumor/ctDNA paired analyses, discordant genomic profiles represented 44%, in which 91.4% of CNAs were present only in ctDNA and 8.6% only in tumors. Tumor heterogeneity might also have accounted for the observed differences. Single tumor biopsies do not always reflect clonal heterogeneity within the primary tumor, and spatial and temporal heterogeneity have been described for several cancer entities, including Wilms tumors [50] and neuroblastoma [51,52]. Furthermore, dPCR presents limitations, along with the divergence between tumor tissue and ctDNA, as reported here and for *MYCN* status in patients with neuroblastoma [53], 1q status and Wilms tumors [42,54] and others. These limitations must be carefully evaluated before the implementation of this methodology in a routine setting.

We found *MYCN* gain in the peripheral blood in 16 cases (46%); this is similar to other studies that reported 42% of 52 patients with neuroblastoma having *MYCN* gain [53,55].

Although we found some CNAs in Ewing sarcoma, the assessment of the driver translocation, which involves the family EWS, constitutes a more attractive biomarker to be pursued. In the literature, up to 91% of 102 cases had detectable ctDNA before the start of chemotherapy [42,56].

For seven patients, we observed changes in ctDNA levels during follow-up. Monitoring these changes in patients undergoing treatment could lead us to define a response-based risk stratification. The feasibility of such a proposal was tested in a wide range of pediatric solid tumors, and the researchers proposed a prospective study within each pediatric tumor to validate the use of ctDNA in prognostics [42].

This pilot study in pediatric tumors demonstrated that both ctDNA and CNAs can represent feasible biomarkers for a variety of solid tumor types and clinical indications. We demonstrated an association between tumor stage, metastasis at diagnosis, metastasis during treatment and tumor volume regarding neuroblastoma, in a routine setting. The differences between tumor genomic profile and ctDNA profile are obstacles that could be caused by subclonal events or technical limitations. In accordance with the current literature, we believe that CNAs may become relevant biomarkers to be explored for liquid biopsy to monitor tumors where these CNAs are relevant. However, the proven clinical utility of CNAs as biomarkers for liquid biopsy, as well as the benefits of knowledge of ctDNA levels, can only be ascertained through larger studies of ctDNA in pediatric patients with cancer. We believe that this study lays the foundation for such future studies.

Author Contributions: J.S.R.: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, data curation, original draft preparation. F.L.T.S.: software, formal analysis, writing, data curation. M.F.E.: methodology, data curation. T.O.B.: methodology. C.M.M.D.: sample collection, patients' information. D.N.: patients' information. I.A.C.: patients' information. M.T.F.: sample collection, patients' information. A.E.C.: sample collection. L.H.P.: sample collection. A.L.S.: conceptualization. M.M.: conceptualization, formal analysis, supervision, original draft preparation and final revision, project administration, funding acquisition. P.Y.J.: conceptualization, formal analysis, supervision, original draft preparation and final revision, project administration, funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by PRONON SIPAR (25000.012259/2019-42) and Ministério Público do Trabalho-PAJ (001585.2018.15.000/1). The APC was funded by PRONON SIPAR (25000.012259/2019-42). Fellowships were provided for M.M. (CNPq 311141/2021-8) and F.L.T.S. (FAPESP 2022/04781-6).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of Boldrini Children's Hospital (CAAE 28386820.7.0000.5376, 03/09/2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors acknowledge the members of Boldrini's institutional biobank and SAME (medical article service and statistics).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Dehner, L.P. The Evolution of the Diagnosis and Understanding of Primitive and Embryonic Neoplasms in Children: Living through an Epoch. *Mod. Pathol.* **1998**, *11*, 669–685. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9688189/> (accessed on 1 March 2023).
2. Steliarova-Foucher, E.; Stiller, C.; Lacour, B.; Kaatsch, P. International Classification of Childhood Cancer, third edition. *Cancer* **2005**, *103*, 1457–1467. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15712273/> (accessed on 1 March 2023). [CrossRef] [PubMed]
3. Gatta, G.; Ferrari, A.; Stiller, C.A.; Pastore, G.; Bisogno, G.; Trama, A.; Capocaccia, R. Embryonal cancers in Europe. *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 1425–1433. [CrossRef] [PubMed]
4. Tulla, M.; Berthold, F.; Graf, N.; Rutkowski, S.; von Schweinitz, D.; Spix, C.; Kaatsch, P. Incidence, Trends, and Survival of Children with Embryonal Tumors. *Pediatrics* **2015**, *136*, e623–e632. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26304823/> (accessed on 1 March 2023). [CrossRef]
5. Gröbner, S.N.; Worst, B.C.; Weischenfeldt, J.; Buchhalter, I.; Kleinheinz, K.; Rudneva, V.A.; Johann, P.D.; Balasubramanian, G.P.; Segura-Wang, M.; Brabetz, S.; et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* **2018**, *555*, 321–327. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29489754/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef] [PubMed]
6. Rahal, Z.; Abdulhai, F.; Kadara, H.; Saab, R. Genomics of adult and pediatric solid tumors. *Am. J. Cancer Res.* **2018**, *8*, 1356. Available online: <https://pmc/articles/PMC6129500/> (accessed on 1 March 2023). [PubMed]
7. Kattner, P.; Strobel, H.; Khoshnevis, N.; Grunert, M.; Bartholomae, S.; Pruss, M.; Fitzel, R.; Halatsch, M.-E.; Schilberg, K.; Siegelin, M.D.; et al. Compare and contrast: Pediatric cancer versus adult malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* **2019**, *38*, 673–682. Available online: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-019-09836-y> (accessed on 1 March 2023). [CrossRef]
8. Ma, X.; Liu, Y.; Liu, Y.; Alexandrov, L.B.; Edmonson, M.N.; Gawad, C.; Zhou, X.; Li, Y.; Rusch, M.C.; Easton, J.; et al. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature* **2018**, *555*, 371–376. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29489755/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
9. Harbers, L.; Agostini, F.; Nicos, M.; Poddighe, D.; Bienko, M.; Crosetto, N. Somatic Copy Number Alterations in Human Cancers: An Analysis of Publicly Available Data from The Cancer Genome Atlas. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 700568. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34395272/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
10. Popov, S.D.; Vujanic, G.M.; Sebire, N.J.; Chagtai, T.; Williams, R.; Vaidya, S.; Pritchard-Jones, K. Bilateral Wilms tumor with TP53-related anaplasia. *Pediatr. Dev. Pathol.* **2013**, *16*, 217–223. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23387809/> (accessed on 29 January 2023). [CrossRef]
11. Gratias, E.J.; Jennings, L.J.; Anderson, J.R.; Dome, J.S.; Grundy, P.; Perlman, E.J. Gain of 1q is associated with inferior event-free and overall survival in patients with favorable histology Wilms tumor: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer* **2013**, *119*, 3887–3894. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23983061/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef] [PubMed]
12. Williams, R.D.; Chagtai, T.; Alcaide-German, M.; Apps, J.; Wegert, J.; Popov, S.; Vujanic, G.; van Tinteren, H.; Heuvel-Eibrink, M.M.V.D.; Kool, M.; et al. Multiple mechanisms of MYCN dysregulation in Wilms tumour. *Oncotarget* **2015**, *6*, 7232–7243. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25749049/> (accessed on 26 January 2023). [CrossRef] [PubMed]
13. Maschietto, M.; Williams, R.D.; Chagtai, T.; Popov, S.D.; Sebire, N.J.; Vujanic, G.; Perlman, E.; Anderson, J.R.; Grundy, P.; Dome, J.S.; et al. TP53 mutational status is a potential marker for risk stratification in Wilms tumour with diffuse anaplasia. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109924. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25313908/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef] [PubMed]
14. Janoueix-Lerosey, I.; Schleiermacher, G.; Michels, E.; Mosseri, V.; Ribeiro, A.; Lequin, D.; Vermeulen, J.; Couturier, J.; Peuchmaur, M.; Valent, A.; et al. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 1026–1033. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19171713/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef] [PubMed]
15. Lynn, M.; Wang, Y.; Slater, J.; Shah, N.; Conroy, J.; Ennis, S.; Morris, T.; Betts, D.R.; Fletcher, J.A.; O'Sullivan, M.J. High-resolution genome-wide copy-number analyses identify localized copy-number alterations in Ewing sarcoma. *Diagn. Mol. Pathol.* **2013**, *22*, 76–84. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23628818/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef] [PubMed]

16. Mackintosh, C.; Ordóñez, J.L.; García-Domínguez, D.J.; Sevillano, V.; Llombart-Bosch, A.; Szuhai, K.; Alberghini, M.; Sciort, R.; Sinnavee, F.; Hogendoorn, P.C.W.; et al. Iq gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma. *Oncogene* **2012**, *31*, 1287–1298. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21822310/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
17. Williamson, D.; Lu, Y.J.; Gordon, T.; Sciort, R.; Kelsey, A.; Fisher, C.; Poremba, C.; Anderson, J.; Pritchard-Jones, K.; Shipley, J. Relationship between MYCN copy number and expression in rhabdomyosarcomas and correlation with adverse prognosis in the alveolar subtype. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 880–888. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15681534/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
18. Lodrini, M.; Sprüssel, A.; Astrahantseff, K.; Tiburtius, D.; Korschak, R.; Lode, H.N.; Fischer, M.; Keilholz, U.; Eggert, A.; Deubzer, H.E. Using droplet digital PCR to analyze MYCN and ALK copy number in plasma from patients with neuroblastoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 85234–85251. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29156716/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
19. Circulating MYCN DNA as a Tumor-Specific Marker in Neuroblastoma Patients | Cancer Research | American Association for Cancer Research. Available online: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/62/13/3646/508931/Circulating-MYCN-DNA-as-a-Tumor-specific-Marker-in> (accessed on 25 January 2023).
20. Gotoh, T.; Hosoi, H.; Iehara, T.; Kuwahara, Y.; Osone, S.; Tsuchiya, K.; Ohira, M.; Nakagawara, A.; Kuroda, H.; Sugimoto, T. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 5205–5210. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16051962/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
21. Ambros, P.F.; Ambros, I.M. Free DNA in the blood serum can unmask MYCN amplified tumors. *Pediatr. Blood Cancer* **2009**, *53*, 306–307. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19489051/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
22. Gallego Melcón, S.; Sánchez de Toledo Codina, J. Molecular biology of rhabdomyosarcoma. *Clin. Transl. Oncol.* **2007**, *9*, 415–419. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17652054/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
23. Wang, Q.; Diskin, S.; Rappaport, E.; Attiyeh, E.; Mosse, Y.; Shue, D.; Seiser, E.; Jagannathan, J.; Shusterman, S.; Bansal, M.; et al. Integrative genomics identifies distinct molecular classes of neuroblastoma and shows that multiple genes are targeted by regional alterations in DNA copy number. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6050–6062. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16778177/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
24. Pender, P.; Stütz, A.M.; Surdez, D.; Krumbholz, M.; Semper, S.; Chicard, M.; Sheffield, N.C.; Pierron, G.; Lapouble, E.; Tötzl, M.; et al. Multimodal analysis of cell-free DNA whole-genome sequencing for pediatric cancers with low mutational burden. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3230. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34050156/> (accessed on 29 January 2023). [CrossRef]
25. Wen, X.; Pu, H.; Liu, Q.; Guo, Z.; Luo, D. Circulating Tumor DNA-A Novel Biomarker of Tumor Progression and Its Favorable Detection Techniques. *Cancers* **2022**, *14*, 6025. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36551512/> (accessed on 1 March 2023). [CrossRef]
26. Volckmar, A.L.; Sülthmann, H.; Riediger, A.; Fioretto, T.; Schirmacher, P.; Endris, V.; Stenzinger, A.; Dietz, S. A field guide for cancer diagnostics using cell-free DNA: From principles to practice and clinical applications. *Genes Chromosom. Cancer* **2018**, *57*, 123–139. Available online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/gcc.22517> (accessed on 1 March 2023). [CrossRef]
27. Hindson, B.J.; Ness, K.D.; Masquelier, D.A.; Belgrader, P.; Heredia, N.J.; Makarewicz, A.J.; Bright, I.J.; Lucero, M.Y.; Hiddessen, A.L.; Legler, T.C.; et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8604–8610. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22035192/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef] [PubMed]
28. Newman, A.M.; Bratman, S.V.; To, J.; Wynne, J.F.; Eclow, N.C.W.; Modlin, L.A.; Liu, C.L.; Neal, J.W.; Wakelee, H.A.; Merritt, R.E.; et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 548–554. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24705333/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef] [PubMed]
29. Bettgowda, C.; Sausen, M.; Leary, R.J.; Kinde, I.; Wang, Y.; Agrawal, N.; Bartlett, B.R.; Wang, H.; Luber, B.; Alani, R.M.; et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 224ra24. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24553385/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef] [PubMed]
30. Diaz, L.A.; Bardelli, A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 579–586. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24449238/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
31. Bidard, F.C.; Madic, J.; Mariani, P.; Piperno-Neumann, S.; Rampanou, A.; Servois, V.; Cassoux, N.; Desjardins, L.; Milder, M.; Vaucher, I.; et al. Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 1207–1213. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23934701/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
32. Martignetti, J.A.; Camacho-Vanegas, O.; Priedigkeit, N.; Camacho, C.; Pereira, E.; Lin, L.; Garnar-Wortzel, L.; Miller, D.; Losic, B.; Shah, H.; et al. Personalized ovarian cancer disease surveillance and detection of candidate therapeutic drug target in circulating tumor DNA. *Neoplasia* **2014**, *16*, 97–103. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24563622/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
33. Alix-Panabières, C.; Pantel, K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov.* **2021**, *11*, 858–873. Available online: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/11/4/858/665896/Liquid-Biopsy-From-Discovery-to-Clinical> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef] [PubMed]

34. Shulman, D.S.; Crompton, B.D. Using Liquid Biopsy in the Treatment of Patient with OS. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2020**, *1257*, 95–105. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32483734/> (accessed on 25 January 2023). [PubMed]
35. Cheng, F.; Su, L.; Qian, C. Circulating tumor DNA: A promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 48832–48841. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27223063/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
36. Diamandis, E.P. The failure of protein cancer biomarkers to reach the clinic: Why, and what can be done to address the problem? *BMC Med.* **2012**, *10*, 87. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22876833/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
37. Kahana-Edwin, S.; Torpy, J.; Cain, L.E.; Mullins, A.; McCowage, G.; Woodfield, S.E.; Vasudevan, S.A.; Shea, D.P.T.; Minoche, A.E.; Kummerfeld, S.; et al. A quantitative universal NGS-based ctDNA assay for hepatoblastoma. *medRxiv* **2022**. Available online: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.09.20.22279947v1> (accessed on 29 January 2023).
38. Bioconductor—Conumee. Available online: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/conumee.html> (accessed on 25 January 2023).
39. Dangoni, G.D.; Teixeira, A.C.B.; Vince, C.S.C.; Novak, E.M.; Gimenez, T.M.; Maschietto, M.; Filho, V.O.; Krepschi, A.C.V. LHX6 promoter hypermethylation in oncological pediatric patients conceived by, IVF. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2023**, *14*, 140–145. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36154949/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
40. Sánchez-Herrero, E.; Serna-Blasco, R.; Robado de Lope, L.; González-Rumayor, V.; Romero, A.; Provencio, M. Circulating Tumor DNA as a Cancer Biomarker: An Overview of Biological Features and Factors That may Impact on ctDNA Analysis. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 943253. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35936733/> (accessed on 29 January 2023). [CrossRef] [PubMed]
41. Schwarzenbach, H.; Hoon, D.S.B.; Pantel, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 426–437. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21562580/> (accessed on 29 January 2023). [CrossRef]
42. Klega, K.; Imamovic-Tuco, A.; Ha, G.; Clapp, A.N.; Meyer, S.; Ward, A.; Clinton, C.; Nag, A.; Van Allen, E.; Mullen, E.; et al. Detection of Somatic Structural Variants Enables Quantification and Characterization of Circulating Tumor DNA in Children with Solid Tumors. *JCO Precis Oncol.* **2018**, *2018*, 1–13. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30027144/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
43. Matthay, K.K.; Maris, J.M.; Schleiermacher, G.; Nakagawara, A.; Mackall, C.L.; Diller, L.; Weiss, W.A. Neuroblastoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2*, 16078. Available online: <https://www.nature.com/articles/nrdp201678> (accessed on 29 January 2023). [CrossRef]
44. Aguiar, T.F.M.; Rivas, M.P.; Costa, S.; Maschietto, M.; Rodrigues, T.; Sobral de Barros, J.; Barbosa, A.C.; Valieris, R.; Fernandes, G.R.; Bertola, D.R.; et al. Insights Into the Somatic Mutation Burden of Hepatoblastomas from Brazilian Patients. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 556. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32432034/> (accessed on 1 March 2023). [CrossRef]
45. Sumazin, P.; Chen, Y.; Treviño, L.R.; Sarabia, S.F.; Hampton, O.A.; Patel, K.; Mistretta, T.-A.; Zorman, B.; Thompson, P.; Heczey, A.; et al. Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups. *Hepatology* **2017**, *65*, 104–121. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27775819/> (accessed on 1 March 2023). [CrossRef]
46. Maiti, S.; Alam, R.; Amos, C.I.; Huff, V. Frequent association of β -catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6288–6292. Available online: <https://mdandersonelsevierpure.com/en/publications/frequent-association-of-%CE%B2-catenin-and-wt1-mutations-in-wilms-tumo> (accessed on 1 March 2023).
47. Maeda, S.; Ohka, F.; Okuno, Y.; Aoki, K.; Motomura, K.; Takeuchi, K.; Kusakari, H.; Yanagisawa, N.; Sato, S.; Yamaguchi, J.; et al. H3F3A mutant allele specific imbalance in an aggressive subtype of diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant. *Acta Neuropathol. Commun.* **2020**, *8*, 8. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32019606/> (accessed on 1 March 2023). [CrossRef] [PubMed]
48. Li, D.; Bonner, E.R.; Wierzbicki, K.; Panditharatna, E.; Huang, T.; Lulla, R.; Mueller, S.; Koschmann, C.; Nazarian, J.; Saratsis, A.M. Standardization of the liquid biopsy for pediatric diffuse midline glioma using ddPCR. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 5098. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33658570/> (accessed on 1 March 2023). [CrossRef] [PubMed]
49. Walz, A.L.; Maschietto, M.; Crompton, B.; Evageliou, N.; Dix, D.; Tytgat, G.; Gessler, M.; Gisselsson, D.; Daw, N.C.; Wegert, J. Tumor biology, biomarkers, and liquid biopsy in pediatric renal tumors. *Pediatr. Blood Cancer* **2023**, e30130. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36592003/> (accessed on 25 January 2023).
50. Cresswell, G.D.; Apps, J.R.; Chagtai, T.; Mifsud, B.; Bentley, C.C.; Maschietto, M.; Popov, S.D.; Weeks, M.E.; Olsen, E.; Sebire, N.J.; et al. Intra-Tumor Genetic Heterogeneity in Wilms Tumor: Clonal Evolution and Clinical Implications. *EBioMedicine* **2016**, *9*, 120–129. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27333041/> (accessed on 26 January 2023). [CrossRef] [PubMed]
51. Bellini, A.; Bernard, V.; Leroy, Q.; Frio, T.R.; Pierron, G.; Combaret, V.; Lapouble, E.; Clement, N.; Rubie, H.; Thebaud, E.; et al. Deep Sequencing Reveals Occurrence of Subclonal ALK Mutations in Neuroblastoma at Diagnosis. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 4913–4921. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26059187/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]
52. Schramm, A.; Köster, J.; Assenov, Y.; Althoff, K.; Peifer, M.; Mahlow, E.; Odersky, A.; Beisser, D.; Ernst, C.; Henssen, A.G.; et al. Mutational dynamics between primary and relapse neuroblastomas. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 872–877. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26121086/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef] [PubMed]
53. Chicard, M.; Boyault, S.; Daage, L.C.; Richer, W.; Gentien, D.; Pierron, G.; Lapouble, E.; Bellini, A.; Iacono, I.; et al. Genomic Copy Number Profiling Using Circulating Free Tumor DNA Highlights Heterogeneity in Neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5564–5573. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27440268/> (accessed on 25 January 2023). [CrossRef]

54. Madanat-Harjuoja, L.M.; Renfro, L.A.; Klega, K.; Tornwall, B.; Thorner, A.R.; Nag, A.; Dix, D.; Dome, J.S.; Diller, L.R.; Fernandez, C.V.; et al. Circulating Tumor DNA as a Biomarker in Patients with Stage III and IV Wilms Tumor: Analysis From a Children's Oncology Group Trial, AREN0533. *J. Clin. Oncol.* **2022**, *40*, 3047–3056. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35580298/> (accessed on 25 January 2023). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Lodrini, M.; Graef, J.; Thole-Kliesch, T.M.; Astrahantseff, K.; Sprussel, A.; Grimaldi, M.; Peitz, C.; Linke, R.B.; Hollander, J.F.; Lankes, E.; et al. Targeted Analysis of Cell-free Circulating Tumor DNA is Suitable for Early Relapse and Actionable Target Detection in Patients with Neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2022**, *28*, 1809–1820. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35247920/> (accessed on 29 January 2023). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Krumbholz, M.; Eiblwiesser, J.; Ranft, A.; Zierk, J.; Schmidkonz, C.; Stütz, A.M.; Peneder, P.; Tomazou, E.M.; Agaimy, A.; Bäuerle, T.; et al. Quantification of Translocation-Specific ctDNA Provides an Integrating Parameter for Early Assessment of Treatment Response and Risk Stratification in Ewing Sarcoma. *Clin. Cancer Res.* **2021**, *27*, 5922–5930. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34426444/> (accessed on 25 January 2023). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.