



ATUALIZAÇÃO DE TEMA

Biópsia Líquida: Atualização de Tema

Liquid Biopsy: Literature Report

Daniela de Oliveira^{1*}, Thiago Vieira²

¹Hospital Santa Izabel- Oncoclínicas; ²Unidade de Oncologia de Feira de Santana-UNACON, Clínica AMO; Salvador, Bahia, Brasil

Os tratamentos oncológicos baseiam-se a partir de uma adequada caracterização tumoral quanto ao seu diagnóstico, extensão da doença e risco de recorrência a partir da compreensão de seus fatores prognósticos. Adiante, conhecer profundamente a carcinogênese traz avanços na condução desta patologia. Neste cenário, muitas alterações moleculares como as mutações, deleções, fusões tornam-se alvos terapêuticos na medida que surgem novas drogas de ação direcionada. A biópsia líquida surge como um campo de possibilidades de obtenção de diagnóstico, identificação de alvos terapêuticos e é uma ferramenta para monitorização de tratamentos, com benefícios de menores riscos que métodos tradicionais de estudo patológico.

Palavras-chave: Biópsia Líquida; Mutação Alvo; Fatores Prognósticos.

Correspondence addresses:

Dra. Daniela de Oliveira
danielagbarros@gmail.com

Received: December 13, 2023

Revised: January 10, 2024

Accepted: February 28, 2024

Published: March 31, 2024

Data Availability Statement:

All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was the result of author's initiative. There was no support of research or publication funds.

Competing interests: The author has declared that no competing interests exist.

Copyright

© 2024 by Santa Casa de Misericórdia da Bahia.
All rights reserved.
ISSN: 2526-5563
e-ISSN: 2764-2089

Cancer treatments are based on an adequate tumor characterization regarding its diagnosis, extent of the disease, and risk of recurrence based on the understanding of its prognostic factors. They further understand carcinogenesis in-depth, which advances the management of this pathology. In this scenario, many molecular changes such as mutations, deletions, and fusions become therapeutic targets as new targeted drugs emerge. Liquid biopsy is a field of possibilities for obtaining a diagnosis and identifying therapeutic targets. It is also a tool for monitoring treatments, with the benefits of lower risks than traditional pathological study methods.

Keywords: Liquid Biopsy; Target Mutation; Prognostic Factors.

A análise patológica de tumores desempenha um papel crucial no diagnóstico e na definição de um tratamento oncológico. Tradicionalmente, a obtenção de amostras tumorais envolve métodos invasivos como a ressecção de tecidos da lesão primária e/ou da metástase. É a avaliação dos aspectos no estudo anatomopatológico e imunohistoquímico que irão definir os aspectos relevantes para diagnóstico e avaliação de características prognósticas e preditivas.¹

Estes procedimentos abrangem desde o uso de agulhas guiadas por exames de imagem, como ultrassonografia e tomografia, até intervenções mais invasivas, como cirurgia laparoscópica, robótica ou aberta.¹

As abordagens convencionais de biópsia apresentam limitações, como possibilidade de amostra insuficiente para avaliação, principalmente para análise genômica, e podem cursar com complicações inerentes. Por essas limitações, pode não se tornar viável a repetição de coleta de material ao longo da história

natural da doença, não permitindo acompanhar as mudanças de alterações moleculares como mutações de resistência adquiridas que se expressam de forma dinâmica.

A heterogeneidade tumoral representa outro desafio na obtenção de biópsias invasivas. Isso ocorre devido à capacidade das células tumorais de apresentarem marcadores moleculares diversos associados e diferentes níveis de agressividade, resistência ou sensibilidade ao tratamento. Essas variações podem ser notadas não apenas entre lesões primárias e metastáticas, mas também em regiões dentro de uma mesma lesão. Uma biópsia, portanto, tem a limitação que é examinar apenas uma ou algumas regiões tumorais, o que pode gerar ausência de informações fundamentais sobre o perfil genômico/biológico.^{1,3,4}

A complexidade dessa heterogeneidade aumenta durante o processo de progressão tumoral. Isso se deve à seleção de células cancerígenas em resposta à pressão exercida por terapias ou pelo ambiente. Essas pressões podem inibir subgrupos de células sensíveis, enquanto estimulam a proliferação de células resistentes.^{1,3-5}

Biópsia Líquida (Tabela 1)

Tumores mesmo em estágio iniciais necessitam promover neoangiogênese para seu desenvolvimento e proliferação e, por este íntimo contato com a circulação sanguínea do portador, podem contaminar a corrente sanguínea com frações de DNA anormal possíveis de serem detectados.

Como uma alternativa às biópsias teciduais, surge a técnica da biópsia líquida (BL), que engloba uma variedade de abordagens utilizando fluidos corporais para avaliar o perfil molecular tumoral. Embora a amostra mais comum seja o sangue venoso periférico, outras fontes como urina, saliva, fezes, líquido cefalorraquidiano, derrames como ascite, secreção exócrina pancreática e sangue venoso portal também têm sido utilizadas.^{1,6}

Ao explorar fluidos corporais como fonte de amostra, a BL permite a análise de diversos componentes derivados do tumor, incluindo células circulantes tumorais, DNA tumoral circulante (ctDNA) e RNA circulante livre de células (cfRNA). Dentre os diversos componentes, destaca-se o DNA tumoral circulante (ctDNA), que é liberado na corrente sanguínea principalmente durante processos de apoptose e necrose celular.^{1,3,6}

Em pacientes diagnosticados com câncer, o ctDNA constitui uma fração relativamente pequena do total de DNA circulante, representando a soma do DNA livre do paciente mais o ctDNA, com variação entre 0,1% e 10%. Essa porcentagem é influenciada por fatores como o tipo primário da lesão, estágio da doença, taxa de renovação celular e resposta à terapia.^{3,5}

Atualmente, duas abordagens principais se destacam na análise do ctDNA: a Reação em Cadeia Polimerase (PCR) e o *Next Generation Sequencing* (NGS). A técnica de PCR concentra-se em estratégias direcionadas, visando a identificação de mutações genéticas específicas previamente conhecidas e de interesse ou rearranjos cromossômicos em regiões definidas do genoma. Esta metodologia funciona por meio de sondas que amplificam a fração do segmento de DNA em investigação, permitindo a identificação da anormalidade. Apresenta custos mais acessíveis, demanda menos tempo para a obtenção de resultados e possui maior especificidade.

Por outro lado, as tecnologias baseadas em NGS têm a capacidade de identificar dezenas de genes de interesse em uma única análise, proporcionando uma visão mais abrangente do perfil genético. Entretanto, essas técnicas geralmente envolvem custos mais elevados, um tempo de análise prolongado e uma diminuição na sensibilidade quando comparadas ao PCR.³

Mecanismos de resistência às terapias-alvo podem ser monitorados por meio do ctDNA do plasma. Quando esses mecanismos são desconhecidos, são indicados painéis gênicos ampliados com o NGS; quando são conhecidos, a análise pode se concentrar em mutações

específicas ou em painéis simplificados com os avaliados por técnicas PCR.³

Diagnóstico da Neoplasia

Em um estudo que avaliou 200 pacientes portadores de câncer colorretal, de mama, pulmão e de ovário, os resultados revelaram a detecção de mutações somáticas no plasma de 83%, 62%, 71% e 56% dos pacientes, respectivamente, abrangendo estágios I a IV da doença, identificando uma forte correlação entre o estágio da doença e a presença de ctDNA. No câncer colorretal, detectou-se em estágio clínico I, com 50%, e no estágio IV, com expressivos 93% de ctDNA, o que é compatível com a presença de maior carga tumoral e com as micrometástases em andamento.⁷

O ctDNA como exame de rastreamento foi avaliado em 10.006 mulheres, nas quais identificados 26 casos de câncer por meio do ctDNA. Porém em um seguimento de 12 meses, outras 24 pacientes tiveram câncer detectados em exames de rastreio padrão, e outras 46 mulheres tiveram diagnóstico oncológico em abordagens diversas.

A prevalência maior de resultados falsos negativos em comparação com diagnósticos positivos nessa população chama atenção da baixa sensibilidade do ctDNA, sobretudo em doenças em estágios precoces. Contudo, destaca-se a potencial relevância do ctDNA em contextos de grupos de alto risco oncológico.⁸

Indicação de Risco de Recorrência

Vidal e colaboradores (2017) avaliaram o uso do ctDNA para determinar a presença da

mutação na via de sinalização celular RAS e monitoramento de novas mutações do RAS durante a quimioterapia associada ao antiangiogênico bevacizumabe no tratamento do câncer colorretal metastático. Amostras de tecido e plasma de 115 pacientes mostrou uma concordância geral de 93%. As discrepâncias do RAS foram explicadas principalmente pela heterogeneidade do tumor.

Em pacientes com mutação RAS tratados com quimioterapia e terapia antiangiogênica, análise sequencial do RAS espelhou resposta ao tratamento, sendo um preditor precoce de resposta. Em pacientes com RAS não mutado, o monitoramento do RAS revelou que foi útil para detectar o surgimento de mutações RAS durante o tratamento com antiangiogênico. A elevada concordância geral na avaliação da mutação RAS entre plasma e tecido apoia testes baseados em sangue.⁹

Em um estudo com pacientes com câncer colorretal estágio II tratados com quimioterapia adjuvante, foi observado que o ctDNA foi detectado no pós-operatório de 14 de 178 (7,9%) pacientes. Destes pacientes, 11 (79%) apresentaram recorrência em um acompanhamento médio de 27 meses. Enquanto os 164 pacientes com ctDNA negativos, a recorrência ocorreu em apenas 16 (9,8%) dos pacientes [taxa de risco (HR) de 18; intervalo de confiança (IC) de 95%, 7,9 a 40; $p < 0,001$]. A presença de ctDNA após o término da quimioterapia também foi associada a uma sobrevida livre de recorrência inferior (HR, 11; IC 95%, 1,8 a 68; $p = 0,001$). Isto ilustra a doença residual, evidenciada pela persistência do ctDNA após tratamento com intenção curativa, e identifica pacientes com maior risco de recorrência.¹⁰

Tabela 1. Benefícios e limitações da biópsia líquida.

Benefícios	Limitações
Baixo risco de obtenção de amostra	Menor sensibilidade se baixa carga tumoral
Detecção de todo perfil de DNA tumoral	Alto custo
Possibilidade de múltiplas análises	Necessidade de alta tecnologia
Possibilidade de ajuste dinâmico do tratamento	Alta especificidade

Um dos estudos pioneiros na prática clínica com a BL foi o DYNAMIC que comparou pacientes com câncer de cólon estágio II que tiveram indicação de quimioterapia adjuvante através da presença do ctDNA pós-cirúrgico *versus* características clínico-patológicas de alto risco conforme utilizado de forma convencional. Uma porção menor de pacientes no grupo guiado por ctDNA do que no grupo de tratamento padrão recebeu quimioterapia adjuvante (15% *versus* 28%). Na avaliação de 2 anos, sobrevida livre de recorrência, o manejo guiado por ctDNA foi não inferior ao método guiado por características de alto risco (93,5% e 92,4%, respectivamente; IC 95%, -4,1 a 6,2).

É possível concluir assim que uma abordagem guiada por ctDNA para o tratamento do câncer de cólon em estágio II traduz uma forma mais precisa de descalonar tratamento e poderá ser capaz de reduzir a indicação do uso de quimioterapia adjuvante sem comprometer a sobrevida livre de recorrência.¹¹

Chaudhuri e colaboradores avaliaram o ctDNA de pacientes tratados com intenção curativa (cirurgia ou quimioterapia associada a radioterapia) para câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC) em estágio de I a III. Em 94% dos pacientes que apresentaram recorrência da doença, o ctDNA tinha sido detectado logo na primeira amostra de sangue pós-tratamento e a detecção de ctDNA precedeu a progressão radiográfica em 72% dos pacientes, com uma mediana de 5,2 meses. Este estudo mostra que a análise de ctDNA pode identificar doença residual molecular em pacientes com CPNPC localizado, caracterizando doença residual microscópica antes do surgimento de lesões por imagens radiológicas. Esta ferramenta, portanto, poderia servir com indicador do tratamento adjuvante personalizado em momentos iniciais quando a carga da doença é menor.¹²

Identificação de Mutações-Alvo

Um fator determinante no crescimento exponencial das publicações relacionadas à biópsia líquida (BL) e na sua crescente qualidade

é a integração da coleta de sangue para análise como um componente complementar em estudos oncológicos de grande porte.

O estudo AURA investigou o uso de osimertinibe, um inibidor de tirosinoquinase de terceira linha, em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC) portadores de mutação no receptor do Fator de Crescimento Endodérmico, (EGFR) após a progressão aos inibidores de primeira linha. A pesquisa identificou que a mutação T790M possibilitava o uso do osimertinibe com ganhos significativos na sobrevida dessa população. A sensibilidade da genotipagem plasmática para detecção de T790M foi estimada em 70%. A taxa de resposta objetiva (TRO) e a sobrevida livre de progressão (SLP) mediana foram comparáveis entre pacientes com T790M positivo no plasma (TRO, 63%; SLP, 9,7 meses) e no tecido tumoral (TRO, 62%; SLP, 9,7 meses).

Embora os pacientes com resultado negativo para T790M no plasma tenham apresentado resultados favoráveis (TRO, 46%; SLP mediana, 8,2 meses), a genotipagem do tecido permitiu distinguir subgrupos com desfechos clínicos divergentes: pacientes positivos para T790M no tecido tiveram resultados superiores (TRO, 69%; SLP, 16,5 meses), enquanto pacientes negativos para T790M tiveram desfechos menos favoráveis (TRO, 25%; SLP, 2,8 meses). Portanto, pacientes com T790M detectado no plasma demonstraram respostas ao osimertinibe equivalentes àqueles cuja detecção foi baseada em tecido. Essa constatação abre caminho para que alguns pacientes evitem a realização de biópsia tumoral para genotipagem do T790M. No entanto, devido à taxa de falsos negativos de 30% na genotipagem plasmática, pacientes com resultado negativo para T790M no plasma ainda necessitam de biópsia tumoral para conclusivamente determinar a presença ou ausência dessa mutação.¹³

Marcador de Resposta a Tratamento

Em outro estudo, realizado com o sequenciamento direcionado de 72 genes

cl clinicamente relevantes em 45 amostras de cfDNA coletadas no momento da biópsia de tecido metastático de pacientes com câncer de próstata, todas as mutações somáticas identificadas nas biópsias de tecido metastático correspondentes estavam simultaneamente presentes no ctDNA. Em diversos pacientes, o sequenciamento do ctDNA revelou alterações não detectadas na biópsia sólida pareada, incluindo alterações clinicamente relevantes em vias associadas ao tratamento e prognóstico. Este estudo demonstra que, na maioria dos pacientes, um ensaio de ctDNA é suficiente para identificar todas as alterações de DNA presentes no tecido metastático, além de ser capaz de identificar alterações que poderiam passar despercebidas em biópsias teciduais.¹⁴

Conclusão

O uso da BL já é uma realidade na definição das condutas em oncologia. Apesar de uma ampla gama de tumores já ter reconhecida sua indicação uso, merece destaque sua aplicação em pacientes sem lesões metastáticas acessíveis para biópsia, onde o ctDNA plasmático se torna uma fonte confiável para a identificação de biomarcadores.¹⁵

Mesmo em pacientes com lesões acessíveis a biópsias, a genotipagem do plasma deve ser priorizada devido à facilidade e ao conforto associados. A BL proporciona uma abordagem mais abrangente e menos invasiva para a análise molecular, emergindo como uma ferramenta valiosa na obtenção de amostras sequenciais durante a avaliação do tratamento.

Agradecimentos

Agradecemos a Dr Bruno Protássio, oncologista do Núcleo de Oncologia da Bahia e do Hospital Santa Izabel na orientação de trabalho de conclusão de curso da residência de Oncologia Clínica de Dr Thiago Viana.

Abreviaturas

CPNPC	Câncer de pulmão não pequenas células
cfRNA	Fração circulante de Ácido ribonucleico
ctDNA	<i>Circulant Tumor DNA</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento do Endotélio
HR	<i>Hazard Ratio</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico

Referências

1. Lone SF, Nisar S, Masoodi T, Singh M, Rizwan A, Hashem S, El-Rifai W, Bedognetti D, Batra SK, Haris M, Bhat AA, Macha MA. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Molecular Cancer*. 2022;21(79):2-22. Doi: 10.1186/s12943-022-01543-7.
2. Vachani A, Zhou M, Ghosh S, Zhang S, Szapary P, Gaurav D, Kalsekar I. Complications After Transthoracic Needle Biopsy of Pulmonary Nodules: A Population-Level Retrospective Cohort Analysis. *J Am Coll Radiol*. 2022;19:1121-1129.
3. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, Quaresmini D, Tucci M, Silvestris F. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Ther Adv Med Oncol*. 2018;10:1-24. Doi: 10.1177/1758835918794630.
4. Ignatiadis M., Sledge G.W., Jeffrey S.S. Liquid biopsy enters the clinic - implementation issues and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021; 18(5): 297-312. Doi: 10.1038/s41571-020-00457-x.
5. Castro-Giner F, Gkountela S, Donato C, Alborelli I, Quagliata L, Ng CKY, Piscuoglio S, Aceto N. Cancer Diagnosis Using a Liquid Biopsy: Challenges and Expectations. *Diagnostics* 2018;8(2):31. Doi: 10.3390/diagnostics8020031.
6. Raufi AG, May MSM, Hadfield MJ, Seyhan AA, El-Deiry WS. Advances in liquid biopsy technology and implications for pancreatic cancer. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):4238. Doi: 10.3390/ijms24044238.
7. Phallen J, Sausen M, Adleff V et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 2017;9:1-12. Doi: 10.1126/scitranslmed.aan2415.

8. Lennon AM, Buchanan AH, Kinde I et al. Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention. *Science*. 2020;3;369(6499):eabb9601. Doi: 10.1126/science.abb9601.
9. Vidal J, Muinelo L, Dalmasas A et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2017;28(6):1325-1332. Doi:10.1093/annonc/mdx125.
10. Tie J, Wang Y, Tomasetti C et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8:346ra96. Doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6219.
11. Tie J, Wang Y, Tomasetti C et al. Circulating Tumor DNA Analysis Guiding Adjuvant Therapy in Stage II Colon Cancer. *NEJM*. 2022; 386:2261-72. Doi: 10.1056/NEJMoa2200075.
12. Chaudhuri AA, Chabon JJ, Lovejoy AF, Newman AM, Stehr H, Azad TD, Khodadoust MS, Esfahani MS, Liu CL, Zhou L, Scherer F, Kurtz DM, Say C, Carter JN, Merriott DJ, Dudley JC, Binkley MS, Modlin L, Padda SK, Gensheimer MF, West RB, Shrager JB, Neal JW, Wakelee HA, Loo Jr BW, Alizadeh AA, Diehn M. *Cancer Discovery* 2017;7(12):1394-1403.
13. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrence R, Paweletz CP, Cantarini M, Yang JCH, Barrett JC, Janne PA. Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(28):3375-82. Doi: 10.1200/JCO.2016.66.7162.
14. Wyatt AW, Annala M, Aggarwal R et al. Concordance of circulating tumor DNA and matched metastatic tissue biopsy in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109 (12):dix118. Doi: 10.1093/jnci/dix118.
15. Pascual J, Attard G, Bidard FC et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2022; 33(8):750-768. Doi: 10.1016/j.annonc.2022.05.520.