



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MARIANA SALIBA DE SOUZA

CFDNA COMO FERRAMENTA NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DE NEOPLASIAS

Trabalho de conclusão de curso em formato de artigo elaborado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação da professora Dra. Maria Creuza do Espírito Santo Barros Ferreira

BRASÍLIA

2021

cfDNA como ferramenta no diagnóstico precoce de neoplasias.Mariana Saliba de Souza¹Maria Creuza do Espírito Santo Barros Ferreira²**Resumo**

Neoplasias, chamadas de cânceres quando metastizadas, são alterações celulares que geram multiplicação descontrolada, causadas por mutações em genes de proliferação ou de supressão tumoral, com ou sem estímulos externos. O diagnóstico, geralmente acidental e tardio, é problemático por causa dos sintomas que só aparecem com quadros avançados e é feito, predominantemente, por meio da biópsia sólida, que também serve para o acompanhamento da doença, mas é invasivo, complexo e impossibilitado em alguns casos. A biópsia líquida é uma alternativa nova, mais barata, menos invasiva, prática e capaz de detectar biomarcadores, moléculas que representam seus quadros respectivos com especificidade demais. O cfDNA, então, surge como opção de biomarcador universal de câncer, sendo estudado por diversos métodos moleculares para ser usado como ferramenta para o diagnóstico, estudo e acompanhamento de acometidos. As técnicas ainda precisam ser padronizadas e aprimoradas, mas podem revolucionar o diagnóstico precoce de câncer no futuro.

Palavras-chave: Ácidos nucleicos livres de célula, reação em cadeia da polimerase; ctDNA; biópsia líquida.

cfDNA as a tool for early diagnosis of neoplasms.**Abstract**

Neoplasms, called cancers when metastasized, are cellular alterations that generate uncontrolled multiplication, caused by mutations on proliferation or tumor suppressor genes, with or without external stimuli. The diagnosis, usually accidental and late, is problematic due to the symptoms that only appear with advanced conditions and is achieved, predominantly, by solid biopsy, which also serves for the monitoring of the disease, but is invasive, complex and impossible in some cases. Liquid biopsy is a new alternative, cheaper, less invasive, easy to use and capable of detecting biomarkers, molecules that represent their respective conditions too specifically. cfDNA, then, appears as an option for a universal cancer biomarker, being studied with diverse molecular methods to be used as a tool for diagnosis, study and follow-up of affected patients. The techniques still need to be standardized and improved but can revolutionize early diagnosis of cancer in the future.

Keywords: cell-Free Nucleic Acids; polymerase chain reaction; ctDNA; liquid biopsy.

¹ Acadêmica de Biomedicina do CEUB

² Professora do CEUB (Orientadora)

1. INTRODUÇÃO

Durante o avanço científico da humanidade, uma doença se destacou das demais por envolver alterações lesivas nas células do próprio organismo, e ficou conhecida como neoplasia (OPPERMANN, 2014). As neoplasias podem se manifestar na forma de câncer, uma doença complexa que afeta organismos multicelulares, e utiliza-se o termo para descrever formas agressivas de neoplasias, que consistem, em suma, no crescimento desordenado de células (MCINNES, 2016).

Para a doença ser caracterizada como câncer, não basta haver neoplasia, é preciso que também exista a capacidade de metastizar (MCINNES, 2016) e, além disso, não é necessário obrigatoriamente um estímulo ambiental para o seu desenvolvimento – de forma que a enfermidade pode se desenvolver a partir de mutações dentro do próprio organismo (HAUSMAN, 2019).

Existem duas principais causas para o desenvolvimento de um câncer: 1) Mutações em genes de proliferação e de supressão tumoral e 2) defeitos no mecanismo de apoptose celular, levando a uma proliferação desordenada de células doentes com capacidade de migrar para órgãos à distância ou invadir tecidos próximos (DANTAS *et al.*, 2009).

A manifestação da doença pode acontecer por uma combinação de fatores genéticos, tais como: a predisposição ao surgimento de neoplasias, ou os agentes mutagênicos ambientais, a citar a radiação e as infecções virais (OPPERMANN, 2014).

Essas infecções virais podem ter participação no desenvolvimento da doença e aumentar o risco de formação de neoplasias, ou ainda podem ter papel determinante na carcinogênese, como é o caso do papilomavírus humano (HPV), responsável por casos de câncer de colo de útero, de orofaringe, anal, perianal e peniano (HANNA *et al.*, 2018).

O câncer se trata de uma doença muito diversa e pode ser observada em todo o organismo e em diferentes graus de malignidade. Ao todo, existem mais de 100 variações da doença, que são nomeados de acordo com o órgão de origem e suas lesões específicas. (OPPERMANN, 2014).

As classificações da doença são divididas em características celulares do câncer, com a subdivisão mais específica baseada nas características dos tecidos afetados. Essas classificações baseadas nas características do tecido pelo qual são geradas podem ser: sarcomas (gerados a partir de tecidos musculares, adiposos ou ósseos), carcinomas (se iniciam nas células epiteliais que revestem os órgãos) e neoplasias malignas linfóides e hematológicas

(MCINNES, 2016). As subdivisões são feitas, por exemplo, de acordo com o local acometido e suas características metastáticas: sendo assim, um câncer de tireóide pode ser classificado como carcinoma papilar (com crescimento nas células foliculares e capacidade de se espalhar para os gânglios linfáticos do pescoço) ou carcinoma medular (com crescimento nas células parafoliculares e pode atingir o fígado, ossos ou cérebro) (LUPO *et al.*, 2018; GOLBERT *et al.*, 2005).

Na fase inicial, grande parte dos cânceres não apresentam sintomas, sendo assim uma doença de difícil prevenção e diagnóstico. Isso acontece porque, uma vez que os sintomas começam a se fazer aparentes, o indivíduo já se encontra no estado avançado da doença e mesmo assim, para que o diagnóstico ocorra, é necessária uma investigação médica minuciosa, a geração de uma hipótese e só então avaliações laboratoriais se iniciam. Por se tratar de uma doença agressiva e de rápida evolução, o tempo é um recurso valioso, que pode influenciar diretamente na taxa de sobrevivência dos pacientes e também na escolha da abordagem terapêutica. Diagnósticos tardios reduzem as chances de sobrevivência e dificultam o tratamento, tornando imprescindível um diagnóstico rápido e preciso (DE OLIVEIRA; OLIVEIRA FILHO, 2019)

Utilizadas por médicos para diagnóstico e acompanhamento da doença, as biópsias sólidas têm sido um recurso fundamental para a oncologia na caracterização histológica dos tumores. Apesar de essencial para um diagnóstico assertivo da doença, ainda existem muitas dificuldades na obtenção das amostras como complicações inerentes ao procedimento, desconforto sofrido pelo paciente e ainda o fato de que alguns tumores não são acessíveis cirurgicamente (WERNER, 2009).

Essas biópsias são feitas através de cirurgias, com a retirada de parte da lesão neoplásica para avaliação histológica posterior, sendo, atualmente, a única alternativa para confirmar e classificar a doença de forma exata. A análise anatomopatológica é o padrão-ouro para diagnóstico de neoplasias, e o processo para extração do tecido é complexo e muitas vezes a localização da massa tumoral impossibilita a coleta do material por encontrar-se perto de artérias e órgãos vitais (WERNER, 2009).

Outra utilidade da biópsia sólida é a genotipagem de tecido tumoral. Para realizar a genotipagem desses tecidos são utilizados os *microarrays* que caracterizam a expressão de milhares de genes ao mesmo tempo, o que permite comparar a biologia molecular das células em diferentes tecidos avaliados e determinar os diagnósticos, prognósticos e quais estão casos podem ser suscetíveis a tratamentos (TIBURTINO; MILOVANOVITCH, 2011).

Em luz das limitações encontradas nos atuais métodos diagnósticos, surge a biópsia líquida como alternativa para a detecção de tumores e acompanhamento da evolução da doença a partir de amostras de fluidos corporais do paciente.

Este trabalho tem por objetivo descrever a aplicação do *cell-free* DNA (cfDNA) enquanto ferramenta a ser utilizada no diagnóstico precoce de neoplasias malignas, através da detecção de fragmentos de sequências mutadas já conhecidas e que podem, por consequência, indicar a presença de determinado tipo de câncer.

2. METODOLOGIA

O trabalho é de uma revisão bibliográfica narrativa que, segundo Rother (2007), é um formato de pesquisa que tem uma abordagem mais ampla com o objetivo de discutir e desenvolver o estado em que o tema em questão se encontra. Para o levantamento de dados foram utilizadas ferramentas de pesquisa como as bases: SciELO (*Scientific Electronic Library Online*) e PubMed.

Na busca, foram utilizadas as palavras-chave *cell-Free Nucleic Acids*, *polymerase chain reaction*, *ctDNA*, *liquid biopsy*. Além disso, a pesquisa inclui o uso dos idiomas português, inglês e espanhol e, ao todo, os trabalhos utilizados como referência datam do período de 2016 a 2021, mas também foram usados materiais mais antigos que tinham importância histórica e auxiliam na compreensão do texto.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Biópsia líquida

A biópsia líquida surgiu como tema de destaque no encontro anual da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) em 2020, como recurso no diagnóstico e monitoramento da evolução da doença (ONCOLOGIA BRASIL, 2020). Consiste principalmente no uso de sangue, urina, líquido cefalorraquidiano e/ou outros fluidos biológicos a serem utilizados para pesquisa de mutações no material genético livre circulante, que podem indicar a presença de um processo neoplásico (POULET; MASSIAS; TALY, 2019).

Por ser um assunto recente, ainda não se desenvolveram padrões universais para a realização dos exames, de forma que se complica a comparação de resultados para desenvolvimento de valores de referência (FREITAS, 2019).

Uma das principais vantagens de seu uso enquanto exame é eliminar o passo do procedimento cirúrgico de obtenção de biópsia sólida, de forma que não expõe o paciente a um risco desnecessário. Além disso, é uma técnica que permite a repetição do exame quantas

vezes forem necessárias, tem um custo inferior ao da biópsia sólida, e também é pouco invasiva. Ela, ainda, permite a avaliação do tumor em sua heterogeneidade, o que permite tratamentos ainda mais personalizados e com menores efeitos prejudiciais para o organismo como um todo. O resultado do exame reflete em efeitos comparáveis à biópsia tradicional, reduzindo os danos do tumor no organismo e aprimorando o tratamento do quadro (SIRAVEGNA *et al.*, 2017).

Menos invasiva, mais simples, e com resultados semelhantes à biópsia sólida, a biópsia líquida se mostra como um valioso recurso no planejamento terapêutico, tendo em vista a sua capacidade de identificar as alterações genéticas específicas de cada tumor existente através de biomarcadores (COSTA, 2017).

3. 2. Biomarcadores

Os biomarcadores são macromoléculas presentes nos fluidos biológicos e tecidos que se relacionam com o estado do organismo. Quando avaliados junto ao histórico e aos sinais clínicos levantados do paciente, funcionam como uma valiosa ferramenta no diagnóstico e estadiamento de doenças. Estes marcadores podem ser variáveis genéticas, imunológicas ou ainda bioquímicas, podendo ser desde um simples eletrólito plasmático até moléculas específicas da manifestação de doenças (VOLP *et al.*, 2008).

Nos quadros de câncer, os biomarcadores são utilizados como parâmetros estimáveis para a avaliação de pacientes, que pode ser preditiva ou prognóstica, podendo partir do tumor propriamente dito ou como resposta do organismo à presença da neoplasia (SCHRIEFER; CARVALHO, 2021).

Os biomarcadores são úteis, de forma geral, para processos tumorais e avaliação de outras doenças. No caso da avaliação oncológica, é necessário que haja a relação direta com o quadro neoplásico, assim sendo considerado ideal para a eficácia do tratamento e ainda a evolução da doença no organismo ou a remissão da patologia (TERMINI; VILLA, 2008).

O diagnóstico do câncer de próstata, por exemplo, se baseia em exames de triagem, além de toque retal e, quando necessário, a biópsia do tecido afetado. O Antígeno Prostático Específico (PSA) é uma protease presente no esperma após a ejaculação, é produzido exclusivamente pela próstata e, por isso, é considerado um biomarcador específico desse órgão (GUIMARÃES; FONSECA, 2016).

As doenças reumáticas autoimunes são as que mais se beneficiam do uso de biomarcadores para o diagnóstico. Até o século XX, o diagnóstico dessas doenças era clínico e com exames complementares. Atualmente, há o conhecimento de que essas formas de

diagnosticar só são possíveis para doenças avançadas e suas formas graves. Por ter um diagnóstico tardio, o lúpus eritematoso sistêmico era tido como uma doença grave e com baixa sobrevida, mas esse cenário foi melhorado com a ajuda de biomarcadores como anti-DNA e anticorpo anti-SSA, que possibilitam a identificação de formas leves da doença precocemente (SCHRIEFER; CARVALHO, 2008).

Um dos tipos de câncer maligno mais comum em todo o mundo, o câncer cervical fica em quarto lugar no que remete ao acometimento de mulheres e continua a aumentar apesar do desenvolvimento da vacina para o papiloma vírus humano (HPV), que é um agente crítico para o desenvolvimento da doença. Essa realidade se perpetua tendo em vista que a maioria das mulheres não adere à prevenção. Um teste sensível e simples, que é útil para informar prognóstico e guiar o tratamento da doença, é pesquisar a presença do DNA do HPV no organismo (HANNA *et al.*, 2018).

Não há ainda, porém, um biomarcador geral para câncer, existindo apenas marcadores específicos para alguns órgãos, como o PSA. Dessa forma, o cfDNA se apresenta como opção interessante.

3. 3. cfDNA

Mandel e Métais foram responsáveis por uma das descobertas científicas que revolucionaram a biomedicina, com foco na área de genética. Em 1948, descobriram a presença de ácidos nucleicos extracelulares na circulação de indivíduos saudáveis e doentes (MANDEL; METAIS, 1948).

A descoberta passou despercebida até 1953, e passou a ter importância graças à publicação de Watson e Crick sobre a dupla-hélice do DNA, e sua relevância como portador da mensagem genética. O estudo ficou esquecido por anos, até a década de 60, quando uma pesquisa identificou a presença de quantidades elevadas do que mais tarde seria conhecido como cfDNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Apenas em 1970, a descoberta se tornou verdadeiramente relevante quando estudos demonstraram que a quantidade de DNA livre detectado no plasma de pacientes poderia ser correlacionada com casos de câncer e ainda sua diminuição com tratamentos bem sucedidos (LO, 2001).

O termo *Cell-Free DNA* (cfDNA) remete aos fragmentos de ácido desoxirribonucleico extracelulares, que podem ter origem na morte celular e de outras fontes diversas (SALVI *et al.*, 2016). Esses fragmentos têm tamanho de 80 a 200 pares de bases e nos indivíduos tidos como saudáveis a concentração encontrada pode variar entre 10–30ng/mL (PÖS *et al.*, 2018). Nos casos de amostras de pessoas saudáveis, a origem do cfDNA pode se dar pela lise de

leucócitos, precursores de eritrócitos, células endoteliais vasculares, e hepatócitos (MOSS *et al.*, 2018) e a presença desses fragmentos de DNA no plasma pode ser encontrada em forma: livre, vesicular e complexada (AARTHY *et al.*, 2015). Em sua forma livre o DNA fica desprotegido contra a ação de DNAses, podendo ter sua concentração elevada por conta da diminuição das concentrações da enzima e a presença de inibidores, em pacientes com câncer (AARTHY *et al.*, 2015). A forma vesicular, por sua vez, é protegida de degradação por uma membrana lipoprotéica que envolve o material genético. Isso pode gerar os corpos apoptóticos, que são liberados pela célula durante processo de apoptose para posterior fagocitose e os exossomas, que têm função de comunicação intercelular. Exossomas cancerígenas, por exemplo, podem transferir o fenótipo defeituoso para células saudáveis na chamada genometastase. Por fim, a forma complexada, também chamada de virtossomo, é associada a macromoléculas como proteínas, lipídios e lipoproteínas para evitar sua degradação. Esses complexos podem se incorporar às células por ter um papel na comunicação intercelular e modificá-las (PÖS *et al.*, 2018; AARTHY *et al.*, 2015).

As elevações nos níveis de cfDNA no sangue estão relacionadas com danos graves nos tecidos, como observado nas doenças auto-imunes, cirrose hepática e, especialmente, em todos os tipos de câncer (AARTHY *et al.*, 2015). Isto torna o cfDNA um biomarcador geral interessante para o diagnóstico do câncer, uma vez que não é limitado pela especificidade dos tecidos, ao contrário das outras opções, e aumenta em concentração mais para a neoplasia que para outras doenças (VOLCKMAR *et al.*, 2018).

O responsável por esse aumento na taxa de concentração do cfDNA no câncer é o DNA tumoral circulante (ctDNA), mudando na composição dependendo do tipo de tumor de onde provém. Ambos são detectáveis pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando primers que marcam uma sequência incluída neles para amplificação. O teste consiste em buscar fragmentos de ácidos nucleicos na corrente sanguínea, que servem como biomarcadores prognósticos e/ou preditivos, que podem auxiliar ao oferecer uma visão do real estado do tumor, já que a quantidade presente no material analisado pode indicar o estado do nível tumoral (AARTHY *et al.*, 2015).

Para a realização do exame, o plasma se apresenta como amostra ideal em relação ao soro, que tem sua quantidade de cfDNA aumentada artificialmente devido à destruição de glóbulos brancos que acontece no decorrer do processo de coagulação. Quando processado rapidamente após a coleta, foi possível identificar maiores quantidades de cfDNA devido a baixa concentração de DNase em quadros de câncer (AARTHY *et al.*, 2015). Com a amostra de plasma, também é possível, se armazenada em condições adequadas após no máximo 2h

ou com a aplicação de conservador adequado, utilizar a amostra dias depois da coleta sem grandes modificações no resultado o que não foi possível com as amostras de soro que apresentaram altíssimas concentrações de cfDNA mesmo armazenadas corretamente (LEE *et al.* , 2001). Além dessas, porém, também podem ser utilizados sangue, urina, líquido cefalorraquidiano e/ou outros fluidos biológicos para a pesquisa de material genético (VOLP *et al.* , 2008).

Diversos métodos de estudo são utilizados para o estudo de cfDNA. Dentre eles, se destacam a *quantitative Digital Polymerase Chain Reaction* (qPCR), *Droplet Digital Polymerase Chain Reaction* (ddPCR) (LEE *et al.* , 2001) e *Next Generation Sequencing* (NGS) (ALBORELLI *et al.* , 2019).

3. 4. qPCR, ddPCR e NGS

Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) ou Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real é o nome dado a técnica que promove a multiplicação de uma sequência de ácidos nucleicos, à qual é adicionado um agente fluorescente que permite a quantificação e identificação do material encontrado. Desde sua apresentação em 1992 tem se mostrado uma ferramenta essencial para o diagnóstico e identificação de cânceres (DIJKSTRA *et al.* , 2014).

A *Droplet Digital Polymerase Chain Reaction* (ddPCR), também conhecida como PCR Digital, é uma técnica capaz de minimizar o requisito mínimo de material genético utilizado no reconhecimento de sequências de DNA. O seu diferencial é a capacidade de realizar a quantificação absoluta do material analisado sem a necessidade de um padrão ou calibrador, realizando várias reações de PCR particionadas em nanogotas (GINKEL *et al.* , 2017). A margem de erro é muito baixa, tornando a técnica ainda mais específica e apresentando os melhores resultados em cfDNA (GINKEL *et al.* , 2017). ddPCR é mais cara, mais trabalhosa, mas mais sensível e eficiente que a qPCR (LINK-LENCZOWSKA *et al.* , 2018).

O sequenciamento de DNA é a principal ferramenta para a medicina personalizada e de precisão, os testes genômicos orientam o diagnóstico e tratamento do cancro desde seu surgimento até os dias atuais. Em 1990, Sanger percebeu que era possível interromper a replicação de uma determinada sequência de DNA adicionando didesoxinucleotídeos associados a um corante fluorescente específico e com a falta de uma hidroxila com a finalidade de marcar onde houve a interrupção da replicação, e ao juntar as fitas formar a sequência completa desejada (TURCHETTO-ZOLET *et al.* , 2017).

Esta tecnologia foi o que permitiu o mapeamento de todo o genoma humano no “Projeto Genoma Humano” que levou décadas até ser concluído apesar dos esforços de centenas de cientistas (GÓES; OLIVEIRA, 2014).

Com o advento de novas tecnologias na área de biologia molecular, surge o sequenciamento de nova geração ou *Next generation Sequencing* (NGS) que permitiu aumentar a escala dessas análises, sequenciando e genotipando várias sequências de interesse. O NGS pode ser caracterizado como um sequenciamento de alto rendimento e automatizado (GÓES; OLIVEIRA, 2014). Uma das principais plataformas que utilizam esta tecnologia é a Illumina que realiza *reads* com qualidade a valor acessível através da técnica de *shotgun* que consiste na associação de nucleotídeos a uma sequência de DNA por complementaridade, com etapas de fragmentação, sequenciamento particionado e reconstrução da sequência original. A fluorescência indica onde houve a clivagem e o próximo nucleotídeo se ligaria (MCCOMBIE; MCPHERSON; MARDIS, 2019).

Com esses métodos, é possível a realização de diversos estudos envolvendo o cfDNA, como observado na literatura.

3. 5 Estudos

Um exemplo são experimentos utilizando e testando o cfDNA no acompanhamento de quadros de câncer colorretal, com a dosagem de cfDNA comparada à dosagem de um marcador previamente conhecido, o antígeno carcínogênico embrionário (CEA). O CEA é utilizado para a detecção de recorrência nos pacientes submetidos a terapia primária (YU, 2016; HAO, 2014).

Para determinar a concentração de DNA livre presente nas amostras, os primers ALU247 e ALU115 foram utilizados para amplificar as sequências alvo através da PCR em tempo real, o soro de quarenta indivíduos em estadiamento avançado foi analisado antes e após a administração de quimioterapia a fim de identificar variações na concentração dos marcadores selecionados. A combinação da detecção dos fragmentos ALU 115, ALU 247/115 e de marcadores como CEA aprimoraram o acompanhamento da doença (YU, 2016; HAO, 2014).

Outro exemplo é o *CancerSEEK*, que é um teste que está sendo desenvolvido utilizando os princípios de biópsia líquida e tecnologia de ponta para a identificação de 8 tipos de câncer (ovário, fígado, estômago, pâncreas, esôfago, colorretal, pulmão e mama). O teste pesquisa biomarcadores proteicos e cfDNA mutados que indicariam a presença da doença. O

estudo avaliou mil pacientes previamente diagnosticados com câncer e 850 indivíduos saudáveis como grupo controle e apresentou resultados de 69-98% em sensibilidade e 99% de especificidade (COHEN *et al.*, 2018).

Outros exemplos de experimentos envolvendo cfDNA em quadros de câncer são, em casos de cânceres esofágicos (LUPO *et al.*, 2018), pancreáticos (BERGER *et al.*, 2019), câncer de cavidade oral e faringe (GINKEL *et al.*, 2017), câncer de tireoide (LUPO *et al.*, 2018; ALLIN *et al.*, 2018), laringe (GUTTERIDGE *et al.*, 2017a; EGUCHI-ISHIMAE *et al.*, 2019; TOMBOLAN; ZIN; BISOGNO, 2019), rins (DE MARTINO *et al.*, 2012), suprarenais (CREEMERS *et al.*, 2017), cólon e reto (HAO *et al.*, 2014), fígado (MARCHIO *et al.*, 2018), próstata (PONTI *et al.*, 2018) e, ainda, em casos de leucemias (ALBITAR *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2020), linfomas (BESSI *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019; DELFAU-LARUE *et al.*, 2018) mielomas (MITHRAPRABHU; SPENCER, 2018; RUSTAD *et al.*, 2017), macroglobulinemia de waldenstrom (WU *et al.*, 2020; DRANDI *et al.*, 2018) e outros.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de biópsias líquidas para a quantificação e estudo de cfDNA para a detecção de neoplasias é uma nova abordagem para contribuir no diagnóstico, tratamento e prognóstico de pacientes, a técnica promete revolucionar a abordagem de tratamentos para câncer no futuro.

Por não apresentar padronização entre todos os projetos e ser uma área de interesse mais recente, porém, é complicado comparar resultados entre experimentos, uma vez que as técnicas diferem entre si. Com os avanços da tecnologia de sequenciamento, dos estudos desenvolvidos no assunto e com a padronização e uniformização das técnicas para identificação de cfDNA é provável que essa ferramenta revolucione o diagnóstico precoce de câncer.

REFERÊNCIAS

AARTHY, R. et al. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 19, n. 6, p. 339–350, 1. 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40291-015-0167-y> Acesso em: 19 nov. 2021.

ALBITAR, A. et al. Using high-sensitivity sequencing for the detection of mutations in BTK and PLC γ 2 genes in cellular and cell-free DNA and correlation with progression in patients

treated with BTK inhibitors. **Oncotarget**, v. 8, n. 11, p. 17936–17944, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5392298/> > Acesso em: 19 nov. 2021.

ALBORELLI, I. et al. Cell-free DNA analysis in healthy individuals by next-generation sequencing: a proof of concept and technical validation study. **Cell Death & Disease** 2019 10:7, v. 10, n. 7, p. 1–11, 11. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-019-1770-3> Acesso em: 19 nov. 2021.

ALLIN, D. M. et al. Circulating tumour DNA is a potential biomarker for disease progression and response to targeted therapy in advanced thyroid cancer. **European Journal of Cancer**, v. 103, p. 165–175, 1. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0959804918313297> Acesso em: 19 nov. 2021.

BERGER, A. W. et al. A blood-based multi marker assay supports the differential diagnosis of early-stage pancreatic cancer. **Theranostics**, v. 9, n. 5, p. 1280–1287, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6401492/> Acesso em: 19 nov. 2021.

BESSI, L. et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by targeted next-generation sequencing and digital droplet PCR in classical Hodgkin lymphoma. **Leukemia and Lymphoma**, v. 60, n. 2, p. 498–502, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10428194.2018.1492123> Acesso em: 19 nov. 2021.

CHEUNG, T. H. et al. Liquid biopsy of HPV DNA in cervical cancer. **Journal of Clinical Virology**, v. 114, n. March, p. 32–36, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386653219300502> Acesso em: 19 nov. 2021.

COHEN, J. D. et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. **Science**, v. 359, n. 6378, p. 926–930, 2, 2018. Disponível em <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/109635/2/235986.pdf> Acesso em: 19 nov. 2021.

DA COSTA, T. R. **Papel das biópsias líquidas no cancro esofágico, gástrico, pancreático e colo-retal**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto. Porto, p. 48, 2017. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/109635/2/235986.pdf> Acesso em: 19 nov. 2021.

CREEMERS, S. G. et al. Identification of mutations in cell-free circulating tumor DNA in adrenocortical carcinoma: A case series. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 10, p. 3611–3615, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/jcem/article/102/10/3611/3903084?login=true> Acesso em: 19 nov. 2021.

DANTAS, É. L. R. et al. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 263–269, 2009. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/revista/index.php/revista/article/view/1619> Acesso em: 19 nov. 2021.

DE MARTINO, M. et al. Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: A diagnostic and prognostic marker. **Cancer**, v. 118, n. 1, p. 82–90, 2012. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.26254> > Acesso em: 19 nov. 2021.

DE OLIVEIRA, R. P. G. ; OLIVEIRA FILHO, R. G. **Revisão da Teoria e da Prática Médica**. 2. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. Disponível em: <https://www.atenaeditora.com.br/wp-content/uploads/2019/09/E-book-Revisao-da-Teoria-e-da-Pratica-Medica-1.pdf> Acesso em: 19 nov. 2021.

DELFAU-LARUE, M. H. et al. Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA: Distinct prognostic value in follicular lymphoma. **Blood Advances**, v. 2, n. 7, p. 807–816, 10, 2018. Disponível em: <<https://ashpublications.org/bloodadvances/article/2/7/807/15817/Total-metabolic-tumor-volume-circulating-tumor> Acesso em: 19 nov. 2021.

DIJKSTRA, J. R. et al. Critical appraisal of quantitative PCR results in colorectal cancer research: Can we rely on published qPCR results? **Molecular Oncology**, v. 8, n. 4, p. 813–818, 1, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1574789113001889> Acesso em: 19 nov. 2021.

DRANDI, D. et al. Highly sensitive MYD88 1265p mutation detection by droplet digital polymerase chain reaction in waldenström macroglobulinemia. **Haematologica**, v. 103, n. 6, p. 1029–1037, 3, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6058774/> Acesso em: 19 nov. 2021.

GINKEL, J. H. VAN et al. Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of head and neck cancer patients. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3424-0> Acesso em: 19 nov. 2021.

GÓES, A. C. DE S. OLIVEIRA, B. V. X. DE. Projeto Genoma Humano: um retrato da construção do conhecimento científico sob a ótica da revista Ciência Hoje. **Ciência & Educação (Bauru)**, v. 20, n. 3, p. 561–577, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ciedu/a/6NMQtBZN8C98xyFcZSgsWFn/abstract/?lang=pt> Acesso em: 19 nov. 2021.

GOLBERT, L. et al. Carcinoma diferenciado de tireóide: avaliação inicial e acompanhamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 5, p. 701–710, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/LmjB6zkNmtMbFsDhdNB9pRm/abstract/?lang=pt> Acesso em: 19 nov. 2021.

GUIMARÃES, J. V. DE A. ; FONSECA, I. M. VANTAGENS E DESVANTAGENS DO PSA EM RELAÇÃO AOS PRINCIPAIS BIOMARCADORES PROTEÔMICOS NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PRÓSTATA: REVISÃO DE LITERATURA. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 6, n. 11, p. 18–25, 9, 2016. Disponível em: <https://www.metodista.br/revistas-izabela/index.php/bio/article/view/1033> Acesso em: 19 nov. 2021.

GUTTERIDGE, A. et al. Digital PCR analysis of circulating tumor DNA: a biomarker for chondrosarcoma diagnosis, prognostication, and residual disease detection. **Cancer Medicine**, v. 6, n. 10, p. 2194–2202, 2017a. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cam4.1146> Acesso em: 19 nov. 2021.

GUTTERIDGE, A. et al. Digital PCR analysis of circulating tumor DNA: a biomarker for chondrosarcoma diagnosis, prognostication, and residual disease detection. **Cancer Medicine**, v. 6, n. 10, p. 2194–2202, 1, 2017b. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cam4.1146> Acesso em: 19 nov. 2021.

HANNA, G. J. et al. Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer. **Targeting γ -secretase**, v. 29, p. 1980–1986, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419341729> Acesso em: 19 nov. 2021.

HAO, T. B. et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 8, p. 1482–1489, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/bjc2014470> Acesso em: 19 nov. 2021.

HAUSMAN, D. M. What is cancer? **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 62, n. 4, p. 778–784, 1, 2019. Disponível em: <https://muse.jhu.edu/article/740322/summary> Acesso em: 19 nov. 2021.

LEE, T. H. et al. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. **Transfusion**, v. 41, n. 2, p. 276–282, 2001. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1537-2995.2001.41020276.x> Acesso em: 19 nov. 2021.

LINK-LENCZOWSKA, D. et al. A comparison of qPCR and ddPCR used for quantification of the JAK2 V617F allele burden in Ph negative MPNs. **Annals of Hematology**, v. 97, n. 12, p. 2299–2308, 1, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00277-018-3451-1> Acesso em: 19 nov. 2021. Acesso em: 19 nov. 2021.

LO, YM D. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 945, n. 1, p. 1-7, 2001. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.319.4416&rep=rep1&type=pdf> Acesso em: 19 nov. 2021.

LUPO, M. et al. Is measurement of circulating tumor DNA of diagnostic use in patients with thyroid nodules? **Endocrine Practice**, v. 24, n. 5, p. 453–459, 1, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1530891X20392673> Acesso em: 19 nov. 2021.

MANDEL, P. ; METAIS, P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. **Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales**, v. 142, n. 3–4, p.

241–3, 1948. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18875018/> Acesso em: 19 nov. 2021.

MARCHIO, A. et al. Droplet digital PCR detects high rate of TP53 R249S mutants in cell-free DNA of middle African patients with hepatocellular carcinoma. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 18, n. 3, p. 421–431, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10238-018-0502-9> Acesso em: 19 nov. 2021.

MCCOMBIE, W. R. ; MCPHERSON, J. D. ; MARDIS, E. R. Next-Generation Sequencing Technologies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 9, n. 11, p. a036798, 1, 2019. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/9/11/a036798>. short Acesso em: 19 nov. 2021.

MCINNES, R. R. **Thompson & Thompson Genética Médica**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2016. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595151819/> . Acesso em: 19 novembro 2021. Acesso em: 19 nov. 2021.

MITHRAPRABHU, S. ; SPENCER, A. Analysis of circulating tumor DNA. In: **Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press Inc. , 2018. v. 1792p. 129–145. Disponível em https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-7865-6_9. Acesso em: 19 nov. 2021.

OPPERMANN, C. P. **Entendendo o câncer**. Porto Alegre: Grupo A, 2014. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582710524/> . Acesso em: 19 nov. 2021.

Estudo apresentado no ASCO GI 2020 revela avanços na biópsia líquida. **Oncologia Brasil**, 2020. Disponível em: <https://oncologiabrasil.com.br/estudo-apresentado-no-asco-gi-2020-revela-avancos-na-biopsia-liquida/> . Acesso em: 19 nov. 2021.

PONTI, G. et al. The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 479, p. 14–19, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29309771/> Acesso em: 19 nov. 2021.

PÖS, O. et al. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. **European Journal of Human Genetics**, 2018 26:7, v. 26, n. 7, p. 937–945, 23, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29205637/> Acesso em: 19 nov. 2021.

POULET, G. ; MASSIAS, J. ; TALY, V. Liquid Biopsy: General Concepts. **Acta cytologica**, v. 63, n. 6, p. 449–455, 1, 2019. Disponível em <https://www.scielo.br/j/ape/a/z7zZ4Z4GwYV6FR7S9FHTByr/?lang=pt> Acesso em: 19 nov. 2021.

ROTHER, E. T. Revisão sistemática X revisão narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 2, p. v–vi, 2007. Disponível em :<https://www.scielo.br/j/ape/a/z7zZ4Z4GwYV6FR7S9FHTByr/?lang=es&format=pdf> Acesso em: 19 nov. 2021.

RUSTAD, E. H. et al. Monitoring multiple myeloma by quantification of recurrent mutations in serum. **Haematologica**, v. 102, n. 7, p. 1266–1272, 26, 2017. Disponível em: <https://www.haematologica.org/article/view/8133> Acesso em: 19 nov. 2021.

SALVI, S. et al. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 6549–6559, 25, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27822059/> Acesso em: 19 nov. 2021.

SCHRIEFER, A. ; CARVALHO, E. M. Biomarcadores em medicina. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, 2008. Disponível em: <http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/view/259> Acesso em: 19 nov. 2021.

SIRAVEGNA, G. et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Nature reviews. **Clinical oncology**, v. 14, n. 9, p. 531–548, 1, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28252003/> Acesso em: 19 nov. 2021.

TERMINI, L. ; VILLA, L. L. BIOMARCADORES NA TRIAGEM DO CÂNCER DO COLO UTERINO. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 2, n. 20, p. 125–131, 2008. Disponível em: <http://www.dst.uff.br/revista20-2-2008/8.pdf> Acesso em: 19 nov. 2021.

TIBURTINO V. D. S. . ; MILOVANOVITCH, T. Benefícios do mapeamento do genoma humano em oncologia. **Enfermagem Brasil**, v. 11, n. 1, p. 55–61, 10, 2012. Disponível em: <https://www.portalatlanticaeditora.com.br/index.php/enfermagembrasil/article/view/3788> Acesso em: 19 nov. 2021.

TOMBOLAN, L. ; ZIN, A. ; BISOGNO, G. Cell-free DNA in pediatric rhabdomyosarcoma: Potential and challenges. In: **Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press Inc. , 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30580430/> Acesso em: 19 nov. 2021.

TURCHETTO-ZOLET, C. A. et al. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/206114/001056131.pdf?sequence=1> Acesso em: 19 nov. 2021.

VOLCKMAR, A. L. et al. A field guide for cancer diagnostics using cell-free DNA: From principles to practice and clinical applications. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 57, n. 3, p. 123–139, 1, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/gcc.22517> Acesso em: 19 nov. 2021.

VOLP, A. C. P. et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 3, p. 537–549, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/mq5vx3hRb85zc8WBk4VG3WJ/?lang=pt> Acesso em: 19 nov. 2021.

WERNER, B. Biópsia de pele e seu estudo histológico. Por quê? Para quê? Como? Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 4, p. 391–396, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/n9C5zXmGWtYtRVpD44YtBfr/?lang=pt> Acesso em: 19 nov. 2021.

WU, J. et al. The analysis of cell-free DNA concentrations and integrity in serum of initial and treated of lymphoma patients. **Clinical Biochemistry**, v. 63, p. 59–65, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30292543/> Acesso em: 19 nov. 2021.

WU, Y. Y. et al. Detection of the MYD88L265P and CXCR4S338X mutations by cell-free DNA in Waldenström macroglobulinemia. **Annals of Hematology**, v. 99, n. 8, p. 1763–1769, 1, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32577844/> Acesso em: 19 nov. 2021.