

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELIAS NUNES MONTEIRO NETO

BIÓPSIA LÍQUIDA E O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER

CURITIBA

2024

ELIAS NUNES MONTEIRO NETO

BIÓPSIA LÍQUIDA E O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção de título de Bacharel em Farmácia. Curso de Farmácia do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos Weiss

CURITIBA

2024

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais, Ana Lucia Ferreira Monteiro e Daniel Nunes Monteiro que sempre estiveram do meu lado me apoiando durante toda minha trajetória.

Agradeço às minhas companheiras caninas Meg e Amélia por todo amor incondicional e apoio durante todos esses anos.

Agradeço a todos os meus amigos do curso de graduação que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos, sempre com espírito colaborativo, e agradeço por todas as risadas que tornaram toda nossa jornada mais leve.

Agradeço a minha querida e admirada orientadora, Prof^a. Dr^a Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos Weiss por toda a orientação durante toda a graduação e por todo suporte intelectual que fizeram ser possível a finalização deste trabalho. Agradeço também por todo apoio na minha trajetória na universidade e por todas as oportunidades que me proporcionou que me ajudaram a crescer como pessoa e profissional.

Agradeço a todos os professores da Universidade Federal do Paraná por todo o conhecimento transmitido durante a graduação e por toda a paciência enquanto me guiavam no meu aprendizado.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná por fornecer a infraestrutura necessária que utilizei durante toda minha graduação e por me permitir ter contato com tanto conhecimento vindo de professores e colegas.

RESUMO

A biópsia líquida é uma técnica de análise de marcadores como células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (ctDNA) e vesículas extracelulares (VEs) a partir de amostras de fluídos corporais como sangue e urina. Essa técnica utiliza diversos métodos para realizar a identificação, extração e análise dos marcadores a fim de descobrir informações sobre o câncer em relação a diagnóstico, acompanhamento da carga tumoral, recidivas, efetividade do tratamento e existência de metástases. A biópsia tecidual, se mantém como o padrão ouro para diagnóstico do câncer, entretanto, possui limitações relacionadas com o perfil invasivo da técnica cirúrgica de obtenção de amostras. Em comparação, a biópsia líquida, por analisar fluídos corporais, não possui essas limitações, permitindo a repetibilidade da coleta de amostras e análise. Entretanto, ainda apresenta problemas relacionados a sensibilidade e especificidade das técnicas utilizadas em conjunto com a falta de padronização das mesmas. Com o surgimento de novos estudos e o avanço das tecnologias, a biópsia líquida pode superar suas limitações e se tornar uma ferramenta confiável e efetiva no cuidado do paciente com câncer.

Palavras chave: Câncer, Biomarcadores, CTCs, ctDNA, VEs, Diagnóstico, Biópsia Líquida, Biópsia Tecidual

ABSTRACT

Liquid biopsy analyzes body fluids to detect biomarkers, such as circulating tumor cells (CTCs), circulating tumor DNA (ctDNA), and extracellular vesicles (EVs), utilizing body fluids samples, such as blood and urine. This technique allows the identification, extraction, and analysis of these biomarkers to provide valuable information on diagnosis, tumor burden, relapses, treatment effectiveness, and metastasis. While tissue biopsy remains the gold standard for cancer diagnosis, it has limitations due to its invasive nature. In contrast, liquid biopsy is non-invasive, allowing for easier, repeatable sample collection. However, issues with standardization, and specificity currently limit its reliability. With ongoing research and advances in technology, liquid biopsy has the potential to overcome these challenges and become an effective tool in cancer patient care.

Keywords: Cancer, Biomarkers, CTCs, ctDNA, EVs, Diagnostics, Liquid Biopsy, Tissue Biopsy

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	35
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ENRIQUECIMENTO POSITIVO E NEGATIVO DE CTCs COM BASE EM IMUNOAFINIDADE PARA ANTÍGENOS EpCAM E CD45.....	20
FIGURA 2 - COMPARAÇÃO DE MICROFILTROS PARA CTC: MATRIZ FLEXÍVEL DE MICROMOLAS E ESTRUTURA DE BICAMADA.....	21
FIGURA 3 - O PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DE UM CITÔMETRO DE FLUXO.	23
FIGURA 4 - DISPERSÃO DA LUZ.....	23
FIGURA 5 - PRINCÍPIO DA HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU (FISH).....	25
FIGURA 6 - REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DE PCR.....	26
FIGURA 7 - ABORDAGENS COMBINADAS EM PROTEÔMICA: EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E DETECÇÃO DE PROTEÍNAS.....	27
FIGURA 8 - ddPCR.....	30
FIGURA 9 - BEAMing UP PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS VARIANTES RARAS.....	31
FIGURA 10 - VISÃO GERAL DO SEQUENCIAMENTO PROFUNDO DE AMPLICON MARCADO (TAm-seq).....	33
FIGURA 11 - FUNÇÕES DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NA FISIOLOGIA NORMAL E NA PATOGÊNESE DA DOENÇA.....	38
FIGURA 12 - BIÓPSIA LÍQUIDA EM UM PACIENTE COM CÂNCER.....	46

LISTA DE SIGLAS

- BEAMing - *Beads, Emulsion, Amplification, and Magnetics*/Esferas, Emulsão, Amplificação e Magnética
- CAPP-seq - *Cancer Personalized Profiling by Deep Sequencing*/Perfil Personalizado de Câncer por Sequenciamento Profundo
- CBNMI - Câncer de Bexiga Não-músculo Invasivo
- cDNA - DNA complementar
- cfDNA - *cell-free* DNA/DNA livre circulante
- CNV - *Copy number variation*/variação no número de cópias
- CPCNP - Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas
- CTCs - Células Tumorais Circulantes
- ctDNA - DNA tumoral circulante
- ddPCR - *Droplet Digital Polymerase Chain Reaction*/Reação em Cadeia da Polimerase Digital em Gotículas
- DNA - *deoxyribonucleic acid/ácido desoxirribonucleico*
- FISH - *Fluorescent in situ hybridization*/Hibridização fluorescente *in situ*
- FMSA - *Flexible micro spring array*/Matriz flexível de micromolas
- FSC - *Frontal scatter*/Dispersão frontal
- IAC - Cromatografia por Imunoafinidade
- LCR - Líquido Cefalorraquidiano
- miRNA - MicroRNA
- mRNA - RNA mensageiro
- NGF - Citometria de Fluxo de Próxima Geração
- PCR - *Polymerase Chain Reaction*/Reação em cadeia da Polimerase
- RCA - *Rolling circle amplification*/Amplificação por círculo rolante
- RNA - *ribonucleic acid/ácido ribonucleico*
- RT-PCR - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*/Reação de Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
- RT-qPCR - *Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*/PCR quantitativo em tempo real com transcrição reversa
- SEC - Cromatografia por Exclusão de Tamanho
- SSC - *Side scatter*/Dispersão lateral

TAm-seq - *Tagged Amplicon Deep Sequencing*/Sequenciamento Profundo de Amplicon Marcado

VEs - Vesículas Extracelulares

WES - *Whole Exome Sequencing*/Sequenciamento Completo do Exoma

WGS - *Whole Genome Sequencing*/Sequenciamento Completo do Genoma

WGBS - *Whole Genome Bisulfite Sequencing*/Sequenciamento de Bissulfito do Genoma Completo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 HISTÓRICO.....	13
2.2 TIPOS DE AMOSTRAS.....	14
2.2.1 Sangue.....	14
2.2.2 Urina.....	15
2.2.3 Saliva.....	15
2.2.4 Líquido cefalorraquidiano.....	15
2.2.5 Leite materno.....	16
2.2.6 Derrame pleural.....	17
2.3 MARCADORES.....	17
2.3.1 Células Tumorais Circulantes (CTCs).....	17
2.3.1.1 Técnicas de separação de CTCs.....	19
2.3.1.2 Técnicas de identificação de CTCs.....	22
2.3.1.3 Aplicações clínicas das CTCs.....	28
2.3.2 DNA tumoral circulante (ctDNA).....	28
2.3.2.1 Técnicas de detecção.....	29
2.3.2.2 Aplicações clínicas.....	35
2.3.3 Vesículas Extracelulares (VEs).....	36
2.3.3.1 Métodos de separação.....	39
2.3.3.2 Métodos de análise.....	41
2.3.3.3 Aplicações clínicas das VEs.....	42
2.4 APLICAÇÕES CLÍNICAS E LIMITAÇÕES DA BIÓPSIA LÍQUIDA.....	43
2.5 BIÓPSIA TECIDUAL X BIÓPSIA LÍQUIDA.....	44
2.6.COMBINAÇÃO DA BIÓPSIA LÍQUIDA COM OUTRAS FERRAMENTAS PARA DIAGNÓSTICO.....	46
2.7 EXPECTATIVAS E FUTURO DA BIÓPSIA LÍQUIDA.....	46
3 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

As células neoplásicas são caracterizadas por um crescimento descontrolado e uma multiplicação acelerada, e geram novas células com as mesmas características anômalas. Esse crescimento desordenado das células cancerosas leva a formação de uma massa, chamada de tumor, que pode comprimir, deformar e até destruir o órgão no qual está presente. As células tumorais também adquirem a capacidade de migrar para outros tecidos, gerando uma transmissão dessa anormalidade para o tecido no qual se fixou e formando novas massas tumorais que são chamadas de metástases (Medrado, 2015).

No ano de 2022 foram registrados mais de 19 milhões de novos casos de câncer no mundo todo, com quase 10 milhões de mortes no mesmo período, sendo o câncer de pulmão com maior número de novos casos e mortes. No Brasil foram mais de 625 mil novos casos com mais de 270 mil mortes em 2022. A prevalência de casos de câncer de 2018 até 2022 mostra mais de 1,2 milhões de casos registrados no país (WHO, 2022). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) em 2022 fez um levantamento de dados que mostram uma estimativa de mais de 700 mil novos casos de câncer para o ano de 2023 (Ministério da Saúde, 2022).

Uma pesquisa realizada por Trufelli, et al. (2008) com pacientes diagnosticadas com câncer de mama, mostra que o diagnóstico precoce é essencial para um melhor prognóstico da doença. Devido ao elevado número de acometimentos e mortes derivadas dessa condição se faz necessário utilizar de métodos de diagnósticos que sejam capazes de detectar o mais cedo possível a presença do tumor. Para a detecção precoce do câncer, a Organização Mundial da Saúde indica duas estratégias: (i) triagem de indivíduos aparentemente saudáveis para detecção de lesões pré-cancerosas ou do tumor em seus estágios iniciais; (ii) diagnóstico precoce envolvendo pacientes sintomáticos que passam por consultas com profissionais da saúde que vão auxiliar no encaminhamento para exames de diagnóstico (WHO, 2007).

Um dos procedimentos padrão para diagnóstico de câncer é baseado na técnica de biópsia tecidual, que consiste na obtenção de amostras tumorais por meio de cirurgias invasivas e normalmente realizadas após confirmação por palpação ou visual através de exames de imagem (Frable, 1986). A biópsia permite realizar análise histológica e genética do tumor, gerando informações que auxiliam no

diagnóstico, previsão da progressão da doença e resposta terapêutica (Crowley, 2013). Apesar da padronização, essa técnica apresenta algumas limitações como a dificuldade de obtenção de material tumoral em quantidade e qualidade, repetibilidade e heterogeneidade genética das lesões (Diaz Jr. *et al.*, 2012; Lone *et al.*, 2022; Perakis e Speicher, 2017).

Nos últimos anos uma nova técnica de diagnóstico, a biópsia líquida, ganhou força uma vez que é capaz de detectar biomarcadores tumorais por meio de fluidos corporais, como sangue e urina de forma minimamente invasiva (Junqueira-Neto, 2019). Por se tratar de um método que possui uma maior facilidade de obtenção de material, com menores riscos associados, essa estratégia já mostra um grande potencial como auxiliar ou até mesmo substituto da biópsia tecidual. Diante do exposto, esse trabalho tem como intuito realizar uma revisão bibliográfica da biópsia líquida, apresentando as vantagens e limitações do método, e mostrar a importância que já vem alcançando na rotina de diagnóstico e tratamento de neoplasias, além de comentar sobre as expectativas futuras relacionadas a esta técnica.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 HISTÓRICO

Existem mais de 100 tipos de câncer que variam de acordo com célula e tecido de origem. Cada um desses tipos têm sintomas diferentes e necessitam de tratamentos diferentes (Brasil, 2024). Da mesma forma, o diagnóstico de cada tipo de câncer segue protocolos clínicos que falam sobre os exames ideais a serem realizados e marcadores que devem ser acompanhados (Ministério da Saúde, 2021). Os métodos de diagnóstico podem ser separados em exames de imagem, cirúrgicos, clínicos e laboratoriais (Ministério da Saúde, 2014). Entretanto, são poucos exames de diagnósticos aprovados baseados na coleta e análise do sangue (Cohen *et al.*, 2018).

A biópsia líquida, ainda que uma técnica recente, teve seus principais componentes descobertos há décadas atrás. Em 1869, a existência de células tumorais circulantes (CTCs) foi descrita pela primeira vez por um médico australiano chamado Thomas Ashworth (Ashworth, 1869 apud Siravegna, 2017). Entretanto, seu potencial clínico só foi descoberto a partir da década 90, após o desenvolvimento do método da reação em cadeia da polimerase (PCR) que consegue detectar as diferentes sequências de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e Ácido Ribonucleico (RNA) expressas por células tumorais (Alunni-Fabbroni, Sandri, 2010 apud Krebs, 2010; Paterlini-Brechot, Benali, 2007 apud Krebs, 2010).

Em 1948 foi publicado um estudo que descreveu a existência de DNA livre circulante, após detectá-lo na circulação de pacientes com câncer (Mandel, Metais, 1948 apud Siravegna, 2017). Já em 1996, foi detectado RNA mensageiro (mRNA) na circulação associado a um tumor no sangue de pacientes com melanoma (Stevens, Scheer, Levine, 1996 apud Siravegna, 2017). Outro marcador utilizado pela biópsia líquida, a vesícula extracelular chamada de exossomo, foi descrita pela primeira vez em 1983 (Pan, Johnstone, 1983).

Esses componentes, que são os principais biomarcadores procurados nas amostras, levaram décadas após sua descoberta para serem utilizados como ferramentas de diagnóstico. Esse tempo de espera ocorreu principalmente pela necessidade de estudos que mostrassem sua função e utilidade clínica, sendo

acompanhada pelo avanço tecnológico que permitiu novas tecnologias capazes de isolar, detectar e analisar esses marcadores (Anitha *et al.*, 2024; Krebs, 2010)

2.2 TIPOS DE AMOSTRAS

O princípio da Biópsia Líquida se baseia na coleta de DNA, RNA e outros fragmentos liberados na circulação sanguínea, ou em outros fluidos corporais, durante os processos de apoptose ou necrose das células. Esses fragmentos são usados como biomarcadores que contêm informações moleculares e suas quantidades estão diretamente relacionadas com o tamanho e desenvolvimento do tumor. Alguns dos principais fluidos corporais que podem ser estudados na busca desses marcadores são: sangue, urina, saliva, líquido pleural e líquido cefalorraquidiano (Ma *et al.*, 2022).

2.2.1 Sangue

Um estudo realizado com 76 pacientes diagnosticados com Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas (CPCNP) que estavam participando das fases I e II de um ensaio que procurava descobrir os parâmetros de eficácia e segurança de um inibidor ALK de segunda geração. O objetivo deste estudo era mostrar a utilidade clínica de um marcador, DNA tumoral circulante (ctDNA), na resposta clínica do paciente à droga usada no tratamento. Foi concluído que esse marcador tinha utilidade clínica no pré-tratamento, na localização de subgrupos que possuem uma mutação que leva a uma melhor resposta ao uso da droga usada no estudo, e na detecção de determinantes genéticos de resistência ao tratamento (Horn *et al.*, 2019).

Outro estudo recente realizado em 2024, analisou amostra de sangue periférico de 128 pacientes pediátricos com tumores sólidos. O objetivo do estudo era detectar CTCs nessas amostras de sangue periférico utilizando a técnica de Citometria de fluxo de próxima geração (NGF). As amostras após coleta foram tratadas para lise de hemácias e em seguida, marcadas com anticorpos monoclonais para tumores sólidos. Os resultados mostraram que a técnica foi capaz de detectar CTCs em até um terço das amostras de sangue periférico de pacientes com tumores sólidos pediátricos com um limite de detecção de até 10^{-6} . Ocorreu a

identificação correta de CTCs dos principais tumores sólidos pediátricos não-hematopoiéticos utilizando marcadores como CD45, CD56, GD2, CD271, nuMiogenina e EpCAM. Os tumores descobertos foram, neuroblastoma, rabdomiossarcoma e meduloblastoma, cada um com um fenótipo de expressão diferente desses marcadores (Abraham *et al.*, 2024).

2.2.2 Urina

Estudo realizado por El-Falouji e colaboradores em 2022 recrutou 62 pacientes que foram diagnosticados previamente com câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI) e que passaram pelo tratamento de Ressecção transuretral de tumor de bexiga. Esses pacientes passaram por um exame de cistoscopia, que é o padrão para verificar recidivas, apesar de ser um método invasivo, e tiveram coletadas amostras de urina, após 3 meses do tratamento. As amostras analisadas mostraram que o método espectroscópico usado para análise da urina em busca de marcadores tumorais, conseguiu atingir níveis de especificidade e sensibilidade altos e que com mais estudos na área esse procedimento pode vir a substituir a cistoscopia no estudo de recidivas, uma vez que já apresenta vantagens por não ser um método invasivo

2.2.3 Saliva

A saliva também mostrou potencial no seu uso para detecção de câncer gástrico em um estudo realizado por Swarup *et al.*, (2023) no qual foram analisadas 20 amostras; 10 de pacientes diagnosticados com câncer gástrico e outras 10 amostras de pacientes controle sem diagnóstico de câncer. O resultado mostrou que havia diferença no DNA obtido entre os dois grupos, evidenciando um possível uso da saliva como líquido para obtenção de material genético para diagnosticar pacientes com câncer gástrico.

2.2.4 Líquido cefalorraquidiano

Um estudo de coorte analisou pacientes de dois grupos recentemente diagnosticados com glioma, um tumor localizado no cérebro, com objetivo de

verificar a viabilidade do uso do líquido cefalorraquidiano (LCR) para caracterização molecular. O método normalmente usado para obter essa caracterização molecular é a biópsia tecidual, mas por se tratar de um método invasivo, e que muitas vezes devido à localização do tumor, não se pode acessar, são necessárias novas ferramentas que auxiliem no diagnóstico e tratamento do paciente.

O estudo realizou a pesquisa com 45 pacientes, dos quais todos tiveram amostras teciduais do tumor, amostras do LCR e amostras de sangue retiradas para análise. Inicialmente foi feita a análise do tecido tumoral retirado por biópsia para procurar mutações comumente encontradas em pacientes com glioma. Em seguida, foram analisadas as amostras de LCR e plasma, para verificar se as mutações encontradas pelo DNA contido nas células teciduais, também poderiam ser detectadas. Foi possível detectar quantidades suficientes de DNA no LCR para análise molecular, e também foram detectadas as mutações buscadas e algumas outras. Dessa forma, o estudo mostrou que existe uma utilidade para o material genético obtido pela extração do LCR, em análise de alterações moleculares para diagnóstico diferencial de subgrupos de gliomas (Orzan *et al.*, 2023).

2.2.5 Leite materno

Estudo realizado por Saura e colaboradores em 2023 analisaram amostras de leite materno de 19 pacientes diagnosticadas com câncer de mama em comparação com amostras de 12 doadoras saudáveis, com intuito de comprovar a possibilidade de usar o leite materno como ferramenta de diagnóstico e acompanhamento. O estudo evidenciou a presença de DNA tumoral no leite materno, que se analisado pode auxiliar na detecção do câncer de mama pós-parto de forma mais ágil que os exames de imagem. O estudo também mostrou que o leite materno é uma melhor fonte de DNA tumoral do que o plasma quando se trata de estágios iniciais do câncer de mama, podendo ser adaptado para diagnóstico precoce da neoplasia e além de poder ser inserido na rotina clínica (Saura *et al.*, 2023). Uma vez que mulheres grávidas e lactantes possuem poucos métodos de triagem, sendo os principais baseados em testes de imagem e realizados principalmente em mulheres em pós-menopausa, o uso do leite materno apresenta-se como uma ferramenta de interesse.

2.2.6 Derrame pleural

O derrame pleural é caracterizado pelo acúmulo de fluidos no espaço pleural. Pode vir a aparecer tanto em casos de tuberculose quanto relacionado a câncer de pulmão, sendo esse diagnóstico diferencial um desafio na rotina (Zhang *et al.*, 2023).

Foi realizado um estudo por Zhang e colaboradores em 2023, no qual coletou-se amostras de derrame pleural de pacientes diagnosticados com câncer de pulmão e outras amostras de pacientes diagnosticados com tuberculose. O estudo tinha objetivo de usar o líquido pleural para encontrar diferenças entre as amostras coletadas dos dois grupos, de forma a encontrar uma maneira de, clinicamente, diagnosticar com mais facilidade essas condições. O estudo mostrou que as amostras dos dois grupos possuem diferenças em relação ao material genético encontrado em exomas derivados do tumor, os microRNAs. Por mais que seja necessário se aprofundar mais e validar os métodos para validar esses achados, já se mostra promissor para melhorar a rotina clínica de diagnóstico de câncer de pulmão (Zhang *et al.*, 2023).

2.3 MARCADORES

A biópsia líquida busca, por meio de métodos minimamente ou não-invasivos, biomarcadores presentes no sangue e em outros fluidos corporais. Esses fluidos vão conter os biomarcadores derivados do tumor primário e outros sítios metastáticos como células tumorais circulantes (CTCs), DNA livre (cfDNA), DNA tumoral circulante (ctDNA) e vesículas extracelulares (VEs) (Junqueira-Neto, 2019).

A seguir, cada marcador será descrito individualmente, com detalhes sobre seus métodos de detecção e aplicações clínicas.

2.3.1 Células Tumorais Circulantes (CTCs)

As células tumorais circulantes vão invadir a circulação sanguínea após se separarem do tumor primário ou do sítio metastático. Essa invasão pode acontecer de forma espontânea ou como resultado de um procedimento cirúrgico. As CTCs já foram detectadas em diversos tipos de neoplasias, como câncer de mama, próstata, pulmão e câncer ovariano (Wang *et al.*, 2024). Como vantagens de ser utilizado com

métodos não-invasivos, é possível obter um maior número de amostras que garantem um monitoramento mais dinâmico da progressão e do estado do tumor. Desta forma, o uso de CTCs possui grande valor em relação ao diagnóstico, monitoramento do tratamento e prognóstico (Hao *et al.*, 2018).

Como células são entidades biológicas mais completas, são capazes de gerar análises dinâmicas de DNA, RNA, proteínas e outras moléculas se em comparação com outros marcadores. Dessa forma, as CTCs possuem uma vantagem quando se trata de análises proteômicas e transcriptômicas do tumor e metástases (Siravegna *et al.*, 2017). Ainda, as CTCs podem ser isoladas e cultivadas em culturas *in vitro* ou *in vivo* para verificar resposta terapêutica, auxiliando no tratamento do paciente (Yu *et al.*, 2014).

De acordo com Wang (2024), “Foi constatado que as CTCs apresentam diferenças em vários aspectos, como tamanho e morfologia celular, fenótipo molecular, nível de atividade, potencial metastático e potencial de proliferação.”

Essas células são dificilmente isoladas pois possuem uma estimativa de cerca de uma CTC para um bilhão de células sanguíneas normais em um paciente em estágio avançado de câncer na circulação. O principal objetivo das técnicas de isolamento é conseguir isolar essas as CTCs das células sanguíneas de forma a obter quantidades ideais em uma forma viável e pura (Yu *et al.*, 2011). Com o passar do tempo, as tecnologias para detecção e isolamento das CTCs evoluíram por conta do surgimento de novas pesquisas e pelo aumento da demanda. Inicialmente era feita somente a contagem dessas células, mas hoje em dia já é possível fazer a análise e sequenciamento das células extraídas.

Um dos principais métodos de detecção de CTCs é baseado em duas etapas de contagem. Esse processo obedece a sequência de enriquecimento e separação das CTCs seguido da identificação dessas células (Wang *et al.*, 2024).

A primeira parte do processo descreve a ação de isolar as CTCs das demais células sanguíneas presentes a partir de algumas das diferentes propriedades das CTCs, sejam elas físicas como tamanho ou densidade, assim como biológicas pelo uso de marcadores. Em seguida, a análise e identificação subsequente dessas células segue alguns métodos como a identificação baseada na morfologia celular, imunofluorescência, entre outras (Wang *et al.*, 2024).

2.3.1.1 Técnicas de separação de CTCs

Imunoafinidade

Algumas técnicas de separação de CTCs se utilizam do conceito de imunoafinidade. Essas técnicas vão utilizar os antígenos expressos em CTCs que não estão expostos em outras células, utilizando anticorpos para localizar e se ligar a esses antígenos. Quando o alvo são os antígenos das CTCs a técnica é chamada de enriquecimento positivo. Quando o alvo dos antígenos são as outras células sanguíneas, se chama de enriquecimento negativo (Bankó *et al.*, 2019).

De forma geral para a técnica de enriquecimento positivo é usado o antígeno EpCAM, presente nas membranas das CTCs e normalmente resulta numa pureza significativa; enquanto as técnicas de enriquecimento negativo utilizam antígenos que estariam presentes na membrana das células sanguíneas. O enriquecimento positivo tende a ter células com uma pureza maior se comparada com o enriquecimento negativo. Porém, uma vantagem apresentada por esta é a possibilidade de obter CTCs sem marcador, ou seja, obter todas as CTCs presentes e não só as que possuem o antígeno EpCam, garantindo uma maior gama dessas células (Bankó *et al.*, 2019).

Algumas das principais desvantagens desses métodos baseados em imunoafinidade seriam a perda de subpopulações de CTCs por conta da heterogeneidade dessas células, além da dificuldade na recuperação das CTCs que ficam aderidas na superfície dos instrumentos utilizados no processo por imunomagnetismo (Bankó *et al.*, 2019). A figura 1 mostra a diferença entre a técnica de enriquecimento positivo e enriquecimento negativo.

FIGURA 1 - ENRIQUECIMENTO POSITIVO E NEGATIVO DE CTCs COM BASE EM IMUNOAFINIDADE PARA ANTÍGENOS EpCAM E CD45



Técnicas baseadas em imunofluorescência em que o antígeno EpCAM é normalmente direcionado à superfície das CTCs para enriquecimento positivo, enquanto o antígeno CD45 é direcionado à superfície de células não cancerosas para enriquecimento negativo. Para enriquecimento positivo, apenas uma subpopulação com um antígeno distinto é capturada. Para enriquecimento negativo, as células cancerosas obtidas são isentas de rótulos e uma população heterogênea de CTC é obtida.

Fonte: adaptado de Bankó *et al.* (2019).

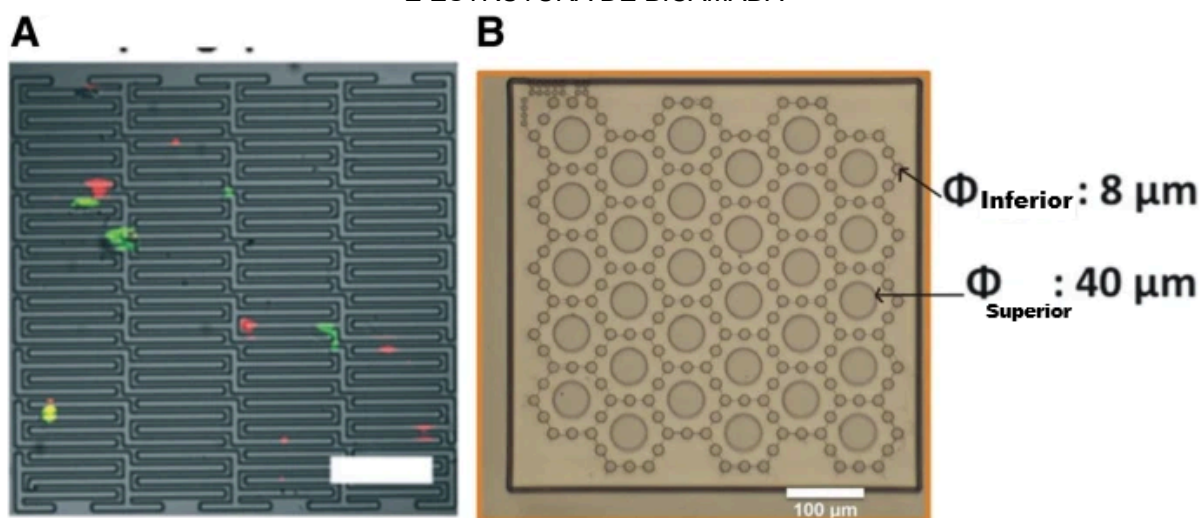
O método de enriquecimento positivo imunomagnético foi capaz de superar a dificuldade da recuperação das células após aderências a partir do uso de esferas magnéticas que substituem a superfície favorecendo a extração dessas células (Bankó *et al.*, 2019). Outro método de enriquecimento positivo é baseado no uso de estruturas que se equivalem à escala de tamanho celular, permitindo um micro fluxo de células, favorecendo assim a separação entre elas, pois melhora o contato células-anticorpo usando o controle desse fluxo (Ferreira; Ramani; Jeffrey, 2016). Por sua vez, o método de enriquecimento negativo se utiliza dos antígenos CD45 e CD66b que estão presentes na superfície das células sanguíneas, mas não nas CTCs (Bankó *et al.*, 2019).

Microfiltração

Outra forma de realizar a separação de CTCs das células sanguíneas é através de métodos baseados em diferenças no tamanho das células. O principal método com essa característica se baseia na microfiltração das CTCs levando em conta o tamanho das células e sua possível deformidade. Esses filtros estão na

escala de micro a nano e atuam como uma barreira para células de determinados tamanhos (Bankó *et al.*, 2019; Hao *et al.*, 2018). Em comparação com os métodos anteriores, uma vantagem existente na microfiltração é a não dependência dos marcadores de superfície, além da garantia da integridade das CTCs. A baixa pureza se torna um problema em conjunto com a possibilidade das células sanguíneas bloquearem a membrana dos filtros ao se acumularem pela sua grande concentração nas amostras, diminuindo assim a quantidade de CTCs coletadas (Hao *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2024). Dois exemplos de estruturas de microfiltros usados para separação de CTCs são mostradas na figura 2.

FIGURA 2 - COMPARAÇÃO DE MICROFILTROS PARA CTC: MATRIZ FLEXÍVEL DE MICROMOLAS E ESTRUTURA DE BICAMADA



Diferentes microfiltros de membrana para CTC onde (A) uma matriz flexível de micromolas (*Flexible micro spring array* - FMSA) contém estruturas de micromolas altamente porosas e flexíveis em uma única camada e (B) mostra uma estrutura de bicamada separável onde a captura é obtida por um espaço entre as membranas porosas superior e inferior com furos de 8 µm de diâmetro dispostos hexagonalmente na camada inferior e furos maiores com diâmetro de 40 µm na camada superior.

FONTE: Adaptado de Bankó *et al.* (2019).

Centrifugação

Ainda dentro de métodos que se baseiam em características físicas de células para separação, temos a centrifugação. Essa técnica utiliza a flutuabilidade das células para separá-las de acordo com sua densidade. Esse método se chama centrifugação por gradiente de densidade (*density based gradient*) e é capaz de separar células vermelhas, brancas e CTCs por essa característica. Como vantagens deste método pode-se citar o custo, a rapidez e facilidades relacionadas, além da obtenção de células viáveis *label-free* (análise sem marcação). Porém um

grande problema apresentado é a possibilidade de contaminação por células de gradiente semelhante como as células brancas, resultando num menor nível de pureza das CTCs (Bankó *et al.*, 2019; Ferreira, Amani, Jeffrey, 2016).

2.3.1.2 Técnicas de identificação de CTCs

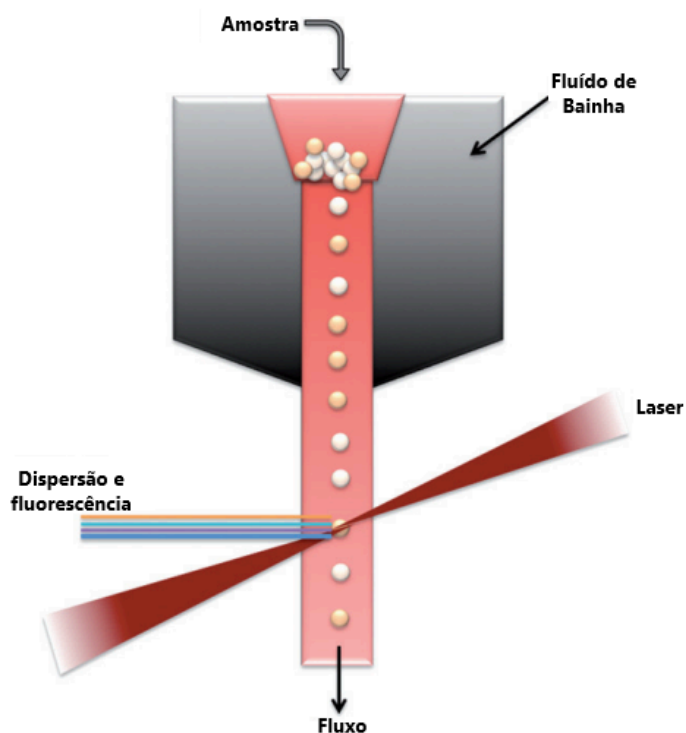
Após a separação e enriquecimento das CTCs, é fundamental aplicar técnicas para sua identificação e análise (Wang *et al.*, 2024). A seguir, são apresentadas as principais metodologias empregadas atualmente neste processo.

Citometria de fluxo

Entre as técnicas disponíveis, a citometria de fluxo permite a análise quantitativa de células em alta velocidade, detectando antígenos marcados com fluoróforos. Essa técnica possibilita também a caracterização do tamanho e da granularidade das células. A técnica é rápida em sua análise, além de possuir uma boa especificidade uma vez que emprega marcadores fluorescentes e anticorpos (Muchlinska *et al.*, 2022 e Wang *et al.*, 2024).

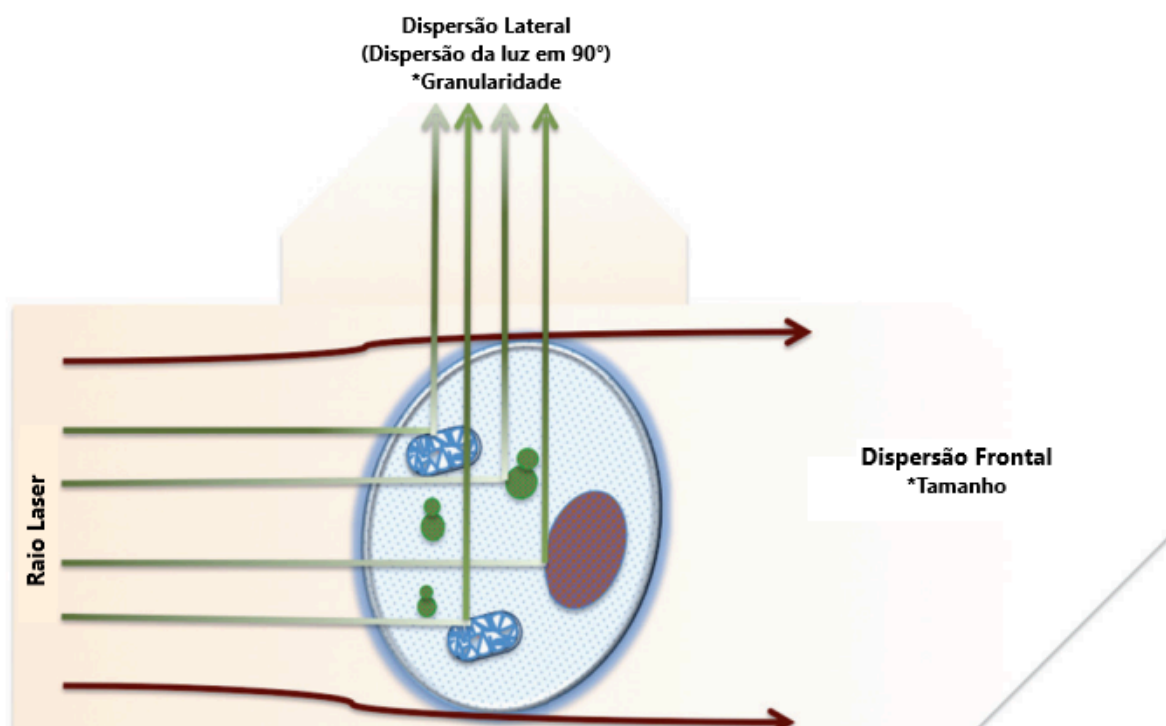
Porém, esse método também apresenta alguns desafios como a perda de algumas células durante o processo de calibração e compensação do equipamento, além de uma baixa sensibilidade pela dificuldade de diferenciar CTCs de falsos-positivos (Muchlinska *et al.*, 2022 e Wang *et al.*, 2024). O princípio básico de funcionamento de um citômetro de fluxo e como é feita identificação das células são mostrados nas figuras 3 e 4 respectivamente.

FIGURA 3 - O PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DE UM CITÔMETRO DE FLUXO.



FONTE: Adaptado de Adan *et al.* (2017)

FIGURA 4 - DISPERSÃO DA LUZ



Dispersão frontal (Frontal scatter - FSC) é proporcional ao tamanho e a dispersão lateral (Side scatter - SSC) é proporcional a granularidade da célula ou à complexidade interna.

FONTE: Adaptado de Adan *et al.* (2017)

Imunofluorescência

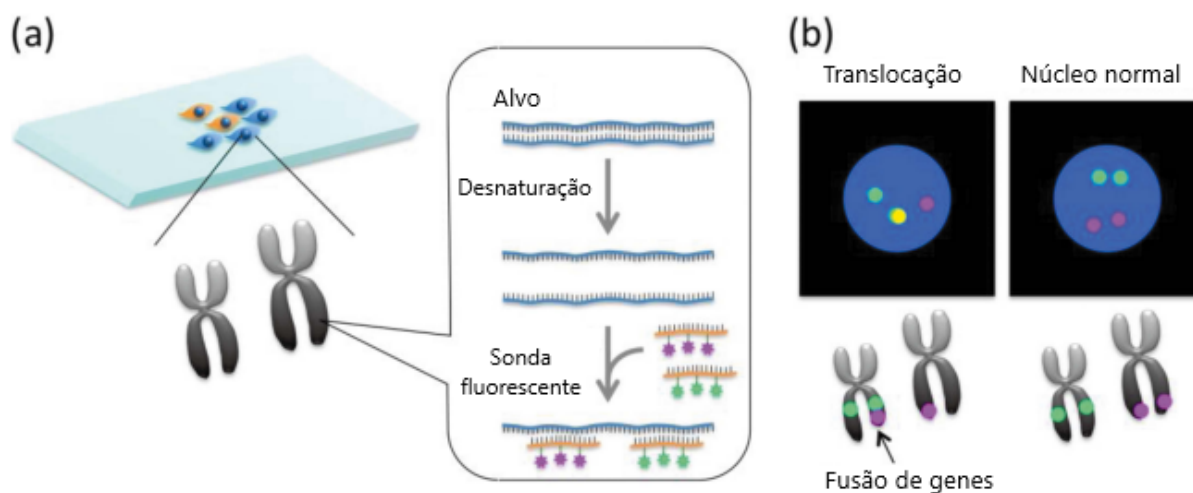
A imunofluorescência se baseia na coloração das CTCs usando anticorpos fluorescentes que vão reconhecer os antígenos presentes na superfície. Esse método também utiliza marcadores de células sanguíneas para poder diferenciá-las das CTCs. Com alta sensibilidade e capacidade de utilizar vários marcadores, é possível a identificação de uma gama maior de células (Wang *et al.*, 2024).

Não é necessário um maquinário muito especializado, e o valor dos reagentes é mais acessível, o que permite o emprego da técnica com menor custo. As limitações do método aparecem justamente por conta da variação da morfologia e heterogeneidade dessas células, além de possivelmente demonstrar dificuldades em lidar com um fluxo maior de amostras em um ambiente clínico mais exigente (Sabath *et al.*, 2022; Sulaiman *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2024).

Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

A hibridização fluorescente *in situ* ou FISH (do inglês: *fluorescent in situ hybridization*) é uma técnica de microscopia que utiliza sondas fluorescentes que possuem uma sequência de pares de base que vão buscar na célula sua sequência complementar no DNA (Hao *et al.*, 2018 e Sato, 2015).

Ao encontrar sua sequência complementar e realizar a ligação, acontece a liberação do fluoróforo. Por utilizar marcadores que se ligam diretamente no DNA, possui alta sensibilidade e especificidade em sua detecção. Entretanto, o método apresenta um alto custo, demanda de experiência para manuseio e é acompanhado por um longo tempo de análise, chegando a mais de 2 dias o prazo para recebimento do resultado (Hao *et al.*, 2018; Sato, 2015; Wang *et al.*, 2024). O princípio de funcionamento da FISH é mostrado na figura 5.

FIGURA 5 - PRINCÍPIO DA HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

(a) Procedimento geral da FISH. Células fixadas em uma lâmina são pré-tratadas por digestão enzimática para melhorar a penetração das sondas. Em seguida, as sequências alvo nos cromossomos são desnaturadas pelo calor ou reagentes químicos. As sondas fluorescentes hibridizam especificamente com suas sequências complementares no cromossomo. Os híbridos formados entre as sondas e seus alvos cromossômicos podem ser detectados usando um microscópio fluorescente. (b) Detecção de anormalidades cromossômicas em um núcleo interfásico. Dois pares de sinais (e.g. dois sinais verdes e dois sinais vermelhos) foram observados em células normais. Um gene em fusão originado da translocação produziu um sinal amarelo que foi detectado como um único sinal derivado de dois pontos na mesma localização.

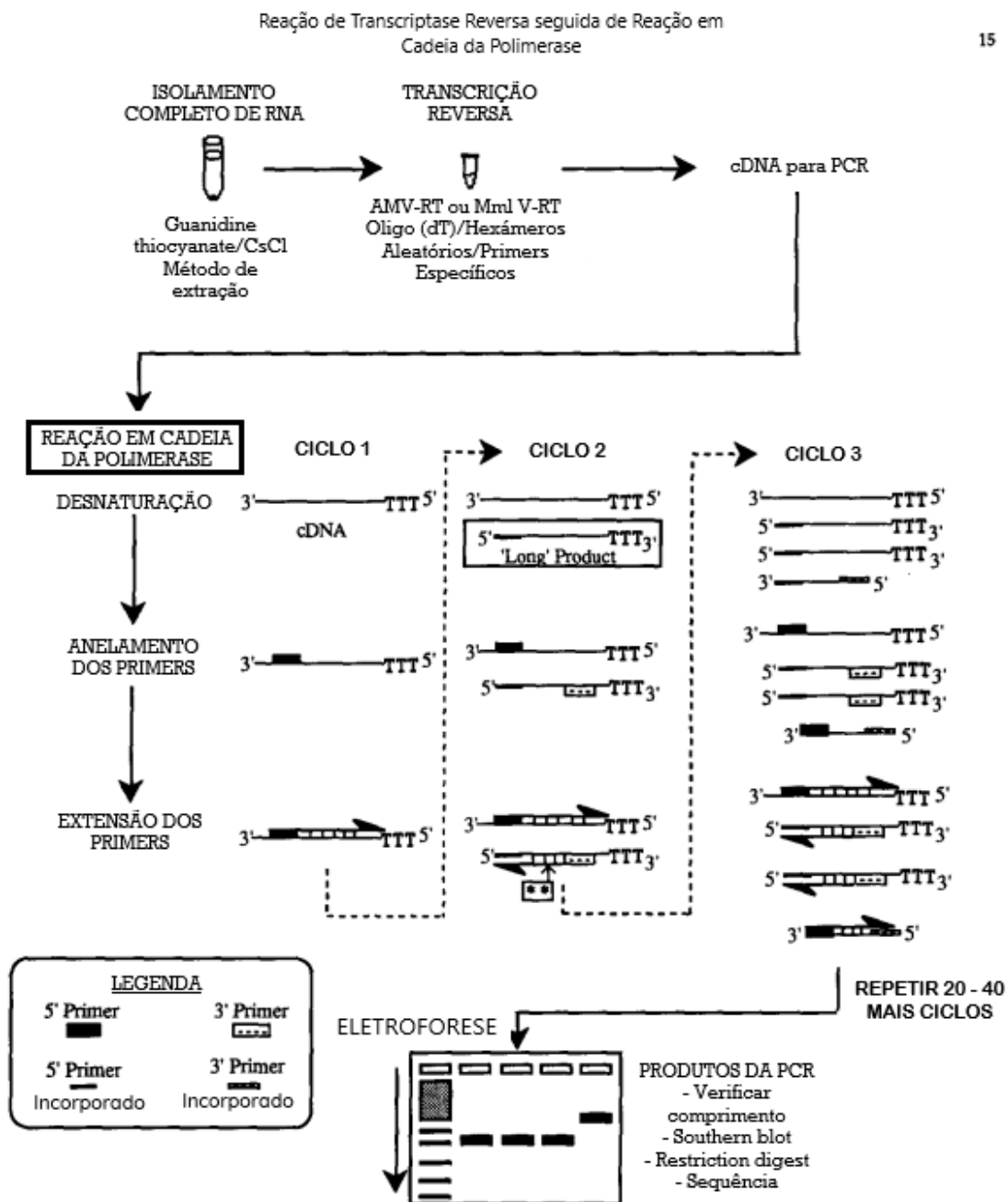
FONTE: Adaptado de Sato (2015)

Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR)

O método de Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR) é uma técnica de Biologia Molecular que utiliza a enzima transcriptase reversa para converter o RNA em DNA complementar (cDNA). Em seguida, o cDNA é amplificado por PCR, permitindo a identificação e quantificação precisa de moléculas de RNA específicas com uso de sondas fluorescentes para verificar a reação em tempo real (Godfrey, Kelly, 2005).

Essa técnica é capaz de detectar concentrações baixas de CTCs com alta sensibilidade, além de ter uma boa especificidade para encontrar mRNA específico pelo uso das sondas. Um dos desafios desse método é a facilidade com que o RNA se degrada e a alta suscetibilidade à contaminação das amostras, o que dificulta a detecção precisa do material genético (Hao et al., 2018; Wang et al., 2024). O funcionamento da RT-PCR é observado na figura 6.

FIGURA 6 - REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DE PCR



Na Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa, a sequência alvo aparece primeiramente em seu comprimento adequado ao fim do ciclo 2 (**). Esse fragmento é amplificado exponencialmente. O produto 'longo' é amplificado linearmente e não aparece no gel.

FONTE: Adaptada de Ohan, Heikkila (1993)

Sequenciamento de DNA de Próxima Geração

Mutações genéticas ocorrem por conta de diversos fatores como a pressão do ambiente celular, metástases e até mesmo por decorrência do tratamento, formando diversas subpopulações distintas de células tumorais. As CTCs podem ser

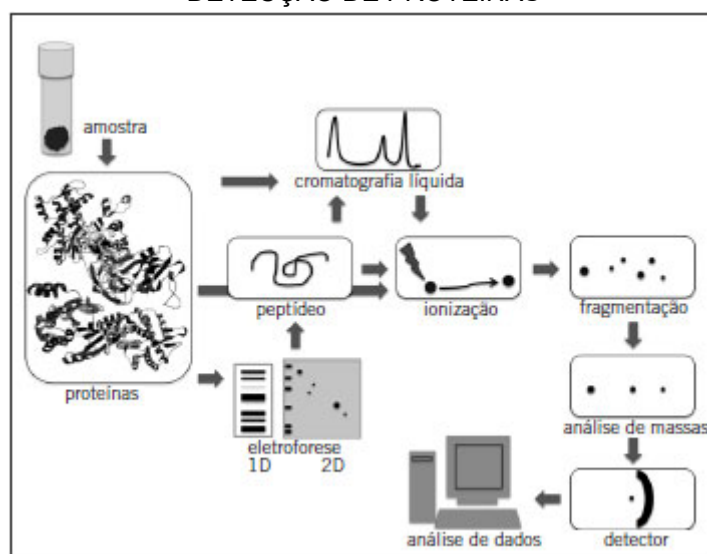
liberadas tanto do tumor primário quanto das suas metástases, e a análise molecular dessas células pode fornecer informações genéticas únicas do tumor de origem a partir da sua liberação, além de fornecer informações espaciais e temporais do tumor durante todo seu tempo de desenvolvimento (Hao *et al.*, 2018).

Ferramentas como o sequenciamento de DNA de próxima geração (do inglês: *Next-Generation Sequencing*-NGS) são capazes de sequenciar a informação genética das CTCs recuperadas e dessa forma analisar as mutações já existentes e novas que podem surgir durante o acompanhamento (Hao *et al.*, 2018).

Proteômica

A análise proteômica é o estudo em larga escala de proteínas em uma célula, tecido ou organismo. Essa análise investiga a estrutura, função, quantificação e modificações das proteínas, fornecendo uma visão abrangente do proteoma — o conjunto completo de proteínas expressas em um sistema biológico em determinado momento ou condição (Barbosa *et al.*, 2012; Valledor, Jorrín, 2011). Essas proteínas, que realizaram diversas funções celulares, podem conter informações importantes sobre o papel das CTCs nas metástases. Um resumo do funcionamento da análise proteômica é mostrado na figura 7.

FIGURA 7 - ABORDAGENS COMBINADAS EM PROTEÔMICA: EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E DETECÇÃO DE PROTEÍNAS



Diferentes metodologias podem ser combinadas em estudos proteômicos. As metodologias mais comumente utilizadas envolvem extração de proteínas da amostra, separação por eletroforese uni (1-DE) ou bidimensional (2-DE) e/ou por cromatografia líquida, ionização, fragmentação, análise e detecção de peptídeos e análise de dados.

FONTE: Barbosa *et al.* (2012)

Alguns dos métodos usados para análise das proteínas são, eletroforese, sequenciamento de peptídeos e espectrometria de massa. Um problema apresentado é a dificuldade desses métodos de traçar esse perfil por conta da natureza transiente do próprio código genético das CTCs, que são conhecidas por sua heterogeneidade, além da sua baixa presença em quantidade (Hao *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2024).

Existem métodos como a imunocitoquímica e a citometria de massa que conseguem analisar diversas proteínas de uma vez, favorecendo uma análise de alto rendimento. Essas técnicas, também, podem garantir uma alta especificidade na detecção das proteínas (Hao *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2024).

2.3.1.3 Aplicações clínicas das CTCs

A demanda pelo uso de CTCs para diagnóstico de câncer tem aumentado principalmente devido à sua característica não invasiva. Diversos estudos foram capazes de detectar a presença de CTCs em estágios iniciais da doença, mostrando que esses marcadores podem ser encontrados e identificados antes mesmo do aparecimento do tumor primário em exames de imagem, se tornando uma ferramenta muito importante para diagnóstico precoce. Além do diagnóstico precoce, CTCs podem dar informações sobre prognóstico e monitoramento do tratamento (Wang *et al.*, 2024).

O foco normalmente é na contagem dessas CTCs e estudos mostram que a sua presença antes do início do tratamento pode levar a um pior prognóstico. Foi descoberto também que o aparecimento de CTCs durante ou após o tratamento pode dar informações sobre a resposta tumoral, podendo ser usada como uma ferramenta para analisar o sucesso do tratamento (Wang *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2023).

2.3.2 DNA tumoral circulante (ctDNA)

O DNA pode ser liberado das células após a morte celular por processos como apoptose e necrose se tornando um DNA livre ou cfDNA. O DNA livre circulante de células normais em pessoas saudáveis é encontrado em baixa

quantidade e é removido rapidamente da circulação dentro de até 1 hora após sua liberação. As células tumorais também podem liberar seu DNA na circulação, sendo esse chamado de DNA tumoral circulante ou ctDNA (Li *et al.*, 2022). Mouliere e colaboradores em 2018, realizaram um estudo em que foi verificado que o tamanho dos fragmentos de ctDNA encontrados normalmente são menores que os de cfDNA, estando principalmente na faixa de 90-150pb.

A quantidade de ctDNA liberado na circulação vai depender de fatores como localização do tumor, tamanho do tumor, nível de metástase e até o estágio em que o tumor se encontra, e por conta disso a proporção encontrada pode variar bastante (Li *et al.*, 2022). Além disso, a concentração de ctDNA é só uma pequena porção de todo o cfDNA encontrado na circulação, sendo necessários métodos capazes de diferenciá-los. Combinado com o baixo tempo de meia-vida na circulação, a análise desse marcador se torna um desafio. Porém, como o ctDNA é derivado de células tumorais, carrega as mutações presentes nesse tumor que estão ausentes no cfDNA, podendo assim gerar informações importantes sobre o estado da doença. Essas anormalidades genéticas podem então ser usadas como biomarcadores para monitoramento e gestão do estado tumoral (Lin *et al.*, 2021).

Alguns dos principais pontos que o ctDNA consegue fornecer são as variações genéticas específicas do tumor, além de informações epigenéticas e sobre a variação no número de cópias (do inglês: *copy number variation - CNV*). Essas aplicações em relação à gestão do tumor são reconhecidas e foram inseridas em diversas diretrizes de diagnóstico e tratamento de câncer. Alguns dos avanços necessários para melhorar o uso desse marcador seria a tentativa de aumentar a sensibilidade de detecção das tecnologias existentes e melhorar a forma como lidar com os ruídos de fundo que surgem durante o processo de análise e isolamento (Wang *et al.*, 2024).

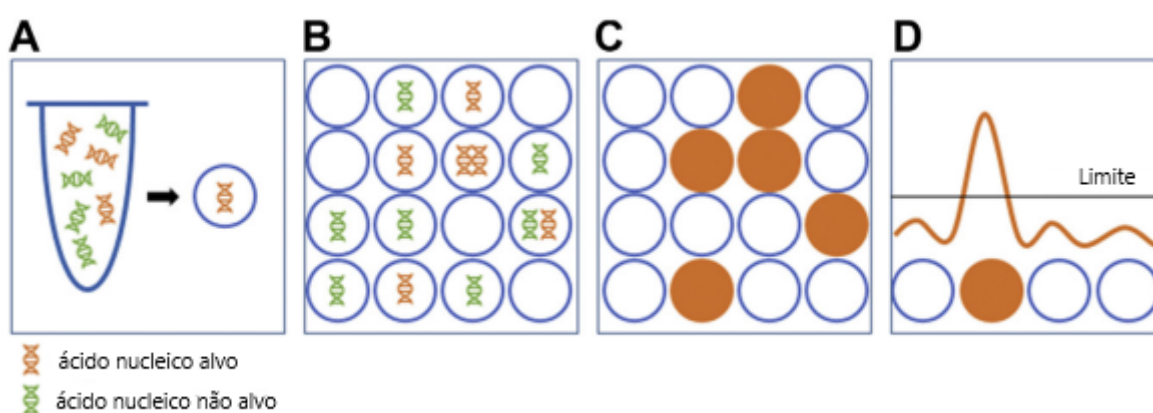
2.3.2.1 Técnicas de detecção

Reação em Cadeia da Polimerase Digital em Gotículas (ddPCR)

A reação em cadeia da polimerase digital em gotículas (ddPCR) é uma técnica avançada com alta sensibilidade, que consegue detectar de forma precisa alterações genéticas, além de oferecer uma quantificação absoluta, sem a necessidade de curvas padrão. Essa técnica utiliza uma emulsão do tipo água em

óleo para gerar até 20.000 gotículas que funcionam como uma micro reação de PCR isolada. A reação de PCR acontece em cada uma das gotículas, amplificando o DNA alvo presente nelas. Em sequência é usado um detector de fluorescência para analisar as gotículas e verificar o número absoluto de cópias da sequência desejada (Zhang *et al.*, 2015). Pode ser usada para detectar mutações raras, quantificar variações no número de cópias e avaliar microRNAs, mas uma limitação do método é a possibilidade de analisar somente mutações conhecidas (Li *et al.*, 2018). Uma imagem mostrando o funcionamento da ddPCR é mostrada na figura 8.

FIGURA 8 - ddPCR



(A) O ácido nucleico é particionado em milhares de gotículas, cada uma contendo reagentes para uma PCR individual e para sua detecção por fluorescência. (B) Ácidos nucleicos são aleatoriamente distribuídos por toda população de gotículas. (C) A PCR acontece em cada uma das gotículas produzindo fluorescência se o ácido nucleico alvo está presente. (D) Na etapa de análise, as gotículas são analisadas individualmente por fluorescência (acima ou abaixo do limite quantitativo) para uma quantificação mais precisa do material de entrada. O número de gotículas positivas é proporcional à quantidade de alvo inserido.

FONTES: Adaptado de Duncan, Zeidner, Montgomery (2019)

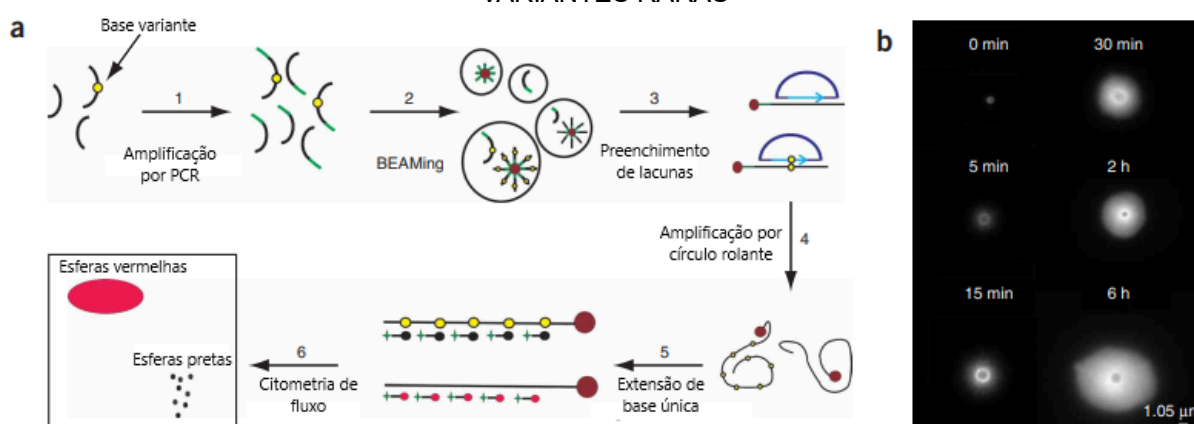
Beads, Emulsion, Amplification, and Magnetics (BEAMing)

Uma outra técnica que possui alta sensibilidade para detecção de mutações é *Beads, Emulsion, Amplification, and Magnetics (BEAMing)*. Essa técnica combina a PCR digital e sequenciamento para detectar e quantificar mutações genéticas específicas em ctDNA, em amostras de sangue. Inicialmente uma molécula de DNA se liga a uma partícula magnética (*beads*) que têm oligonucleotídeos específicos para as sequências-alvo, como mutações no DNA tumoral (García-Foncillas *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2006).

O DNA contido nessas partículas magnéticas é então compartimentalizado em microemulsões do tipo água em óleo que então vão conter um modelo de uma

molécula de DNA, e dentro de cada gotícula vai acontecer uma amplificação, o que gera muitas cópias da sequência-alvo em cada esfera. Após a amplificação, as esferas são recolhidas e analisadas por métodos como citometria de fluxo para detectar a presença de mutações (García-Foncillas *et al.*, 2017). Em uma análise feita por Diehl e colaboradores em 2008., foi descoberto que a sensibilidade da técnica permite detectar uma mutação em até 10.000 sequências normais (0.01%). Assim como na ddPCR essa técnica só consegue analisar mutações conhecidas (Li *et al.*, 2018).

FIGURA 9 - BEAMing UP PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS VARIANTES RARAS



(a) Esquema do procedimento. Na etapa 1, amostras de DNA são amplificadas por PCR. Na etapa 2, emulsões do tipo água em óleo são formadas de forma que moléculas únicas de DNA em cada compartimento aquoso são amplificadas e ligadas às esferas (círculos marrons). Na etapa 3, sondas que podem se tornar circulares realizam hibridização com sequências nas esferas. Uma lacuna de 1-20-pb é preenchida por uma polimerase e então suas extremidades são ligadas. Na etapa 4, as sequências a serem consultadas nas esferas são amplificadas através da amplificação por círculo rolante (do inglês: *Rolling circle amplification - RCA*). Na etapa 5, terminadores dideoxynucleotídeos marcados com fluorescência (círculos vermelhos e pretos) são usados para distinguir esferas contendo sequências que divergem em posições de interesse. Na etapa 6, as esferas são analisadas por citometria de fluxo. (b) RCA nas esferas. A RCA foi realizada durante os períodos de tempo indicados em esferas produzidas a partir de amplicons TP53. As esferas foram hibridizadas com uma sonda marcada com fluoresceína para TP53 e fotografadas usando um microscópio de fluorescência.

FONTE: Adaptado de Li *et al.* (2006)

Whole-genome Bisulfite Sequencing (WGBS)

A metilação do DNA é uma modificação epigenética que consiste na adição de grupos metila (-CH₃) no quinto carbono de citosinas, geralmente (Moore, Le, Fan, 2013). A metilação desempenha papéis críticos na regulação gênica, no desenvolvimento celular e na manutenção do genoma, além de estar associada a doenças, como o câncer (Robertson, 2005). Estudos mostram que como biomarcador, a metilação do DNA é usada para diagnóstico de câncer de próstata, bexiga, mama, pulmão, entre outros, tendo a fonte de DNA variando de urina, fezes,

soro e plasma. A metilação do ctDNA é um biomarcador promissor porque perfis de metilação específicos podem refletir a origem do tumor e seu estado de desenvolvimento, além de poder monitorar a resposta a tratamentos, detectar recidivas precoces e indicar a progressão do câncer, e sugerir resistência a terapias (Leygo *et al.*, 2017).

O método considerado padrão ouro para avaliação da metilação do DNA é a WGBS (*Whole-genome bisulfite sequencing*). Esse método consiste em três principais etapas. Inicialmente é feita a preparação de biblioteca onde, se utilizando de bisulfito, é realizada a transformação de citosinas não metiladas em grupos uracil. As duas etapas seguintes são o sequenciamento do DNA após reação e por último o processamento das leituras. O resultado é gerado pela contagem da proporção entre o número de citosinas transformadas e não-transformadas, refletindo o número de metilações. Um problema encontrado na realização dessa técnica é a necessidade de treinamento de pessoal (Gong *et al.*, 2022, Suzuki *et al.*, 2018), além do alto custo envolvendo o processo. Por outro lado, o método apresenta uma alta sensibilidade para detectar baixas concentrações de ctDNA, além de conseguir analisar a metilação da amostra com alta especificidade. Diferente dos métodos apresentados anteriormente, a WGBS consegue analisar mutações que não são conhecidas (Wardenaar *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2024).

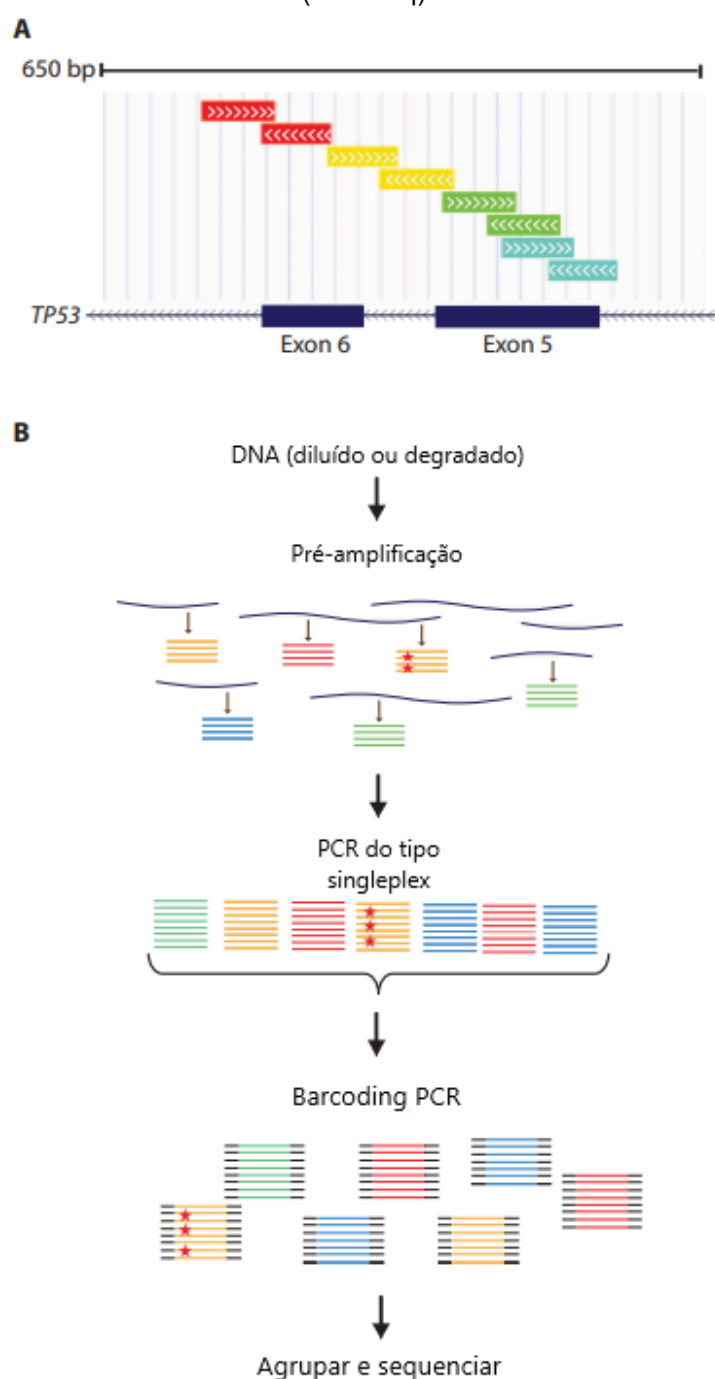
Tagged Amplicon Sequencing (TAm-seq)

Outra técnica de sequenciamento usada para a detecção de ctDNA é o TAm-seq ou *Targeted RNA-Seq (tagged amplicon sequencing)*. É uma técnica de sequenciamento de RNA que se concentra na análise de um conjunto específico de transcritos de RNA, em vez de sequenciar todo o transcriptoma. Utiliza sondas de captura para isolar transcritos de RNA específicos de interesse a partir de uma amostra. Essas sondas são projetadas para se ligar a regiões alvo do RNA, permitindo a captura e concentração dos transcritos desejados (Bohers, Vially, Jardin, 2021; Forshew *et al.*, 2012).

O RNA capturado é convertido em cDNA (DNA complementar) utilizando a transcriptase reversa. O cDNA é amplificado por PCR e, em seguida, sequenciado usando plataformas de sequenciamento de próxima geração (NGS). Consegue detectar ctDNA em baixas concentrações além de suas mutações garantindo uma alta sensibilidade e sem o ruído de dados desnecessários de transcritos não

relevantes. Também tem alta especificidade pelo uso de sondas específicas durante a amplificação. Esse método também tem a capacidade de detectar mutações e fusões gênicas em tipos específicos de câncer. Uma limitação existente é que o limite de detecção da técnica é inferior a outras que focam em lócus individuais (Bohers, Viailly, Jardin, 2021; Forshew *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2024). Uma visão geral da técnica TAM-seq é mostrada na figura 10.

FIGURA 10 - VISÃO GERAL DO SEQUENCIAMENTO PROFUNDO DE AMPLICON MARCADO (TAm-seq)



(A) Ilustração do design de amplicons. *Primers* foram projetados para amplificar regiões de interesse com amplicons curtos em sobreposição. O design do amplicon é ilustrado para uma região cobrindo os exons 5 a 6 do TP53. Barras coloridas, segmentadas para leituras diretas e reversas, mostram regiões cobertas por diferentes amplicons (excluindo regiões de primers). Adaptadores de sequenciamento são conectados em cada extremidade, de modo que uma leitura de extremidade única gera conjuntos separados de leituras diretas e reversas. Como os amplicons são em sua maioria menores que 200 pb, os resultados direto e reverso das leituras também se sobrepõem parcialmente. (B) Visão geral do fluxo de trabalho. Múltiplas regiões foram amplificadas em paralelo. Uma etapa inicial de pré-amplificação foi realizada por 15 ciclos utilizando um conjunto de pares de iniciadores específicos do alvo para preservar a representação de todos os alelos no material modelo. O diagrama esquemático mostra moléculas de DNA que carregam mutações (estrelas vermelhas) sendo amplificadas ao lado de moléculas do tipo selvagem. As regiões de interesse no material pré-amplificado foram então amplificadas seletivamente em uma PCR individual (single-plex), excluindo assim produtos não específicos. Finalmente, adaptadores de sequenciamento e códigos de barras específicos da amostra foram anexados aos amplicons colhidos em uma PCR adicional.

FONTE: Adaptada de Forshew *et al.* (2012)

Cancer Personalized Profiling by Deep Sequencing (CAPP-seq)

Cancer Personalized Profiling by Deep Sequencing (CAPP-seq) é uma técnica avançada de sequenciamento que realiza um enriquecimento das regiões genômicas de interesse antes do sequenciamento pelo uso de hibridização de regiões alvo com oligonucleotídeos antisense. Esse método de preparação consegue realizar a detecção de poucas quantidades de DNA, pelo uso de um seletor que consiste de oligonucleotídeos de DNA, que então focam em regiões que possuem mutação de interesse. Por ser capaz de detectar ctDNA em baixas concentrações, garante uma alta sensibilidade e fornece informações detalhadas sobre a heterogeneidade genética dos tumores. Em conjunto também apresenta uma alta especificidade pelo uso de *primers* específicos. Essa técnica também apresenta um baixo custo de operação (Bratman *et al.*, 2015; Newman *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2024).

Whole Genome Sequencing (WGS)

Whole genome sequencing ou WGS é uma técnica de sequenciamento que prevê o sequenciamento completo do DNA a partir das amostras obtidas. As amostras de DNA sofrem o preparo de biblioteca no qual são isolados, fragmentados e em sequência são ligados a adaptadores. Os fragmentos de DNA depois de preparados seguem para o sequenciador onde vão passar por uma amplificação e sequenciamento. Sinais fluorescentes são emitidos por esses fragmentos e geram dados que são transferidos para um computador de alta performance que realiza a

leitura e gera os resultados (Bagger *et al.*, 2024). Por ser um método que faz a análise completa do genoma, é possível obter informações sobre mutações, inserções, deleções e outros. Apesar do preço do sequenciamento estar diminuindo com o passar dos anos, o custo ainda pode ser um fator limitante para a sua empregabilidade *na rotina laboratorial* (Heitzer *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2016).

Whole Exome Sequencing (WES)

Similar ao WGS, a técnica do *whole exome sequencing* (WES) foca em analisar o exoma, ou seja, apenas a parte codificadora do genoma. O exoma compreende cerca de 1-2% do genoma humano, mas contém aproximadamente 85% das variantes conhecidas associadas a doenças genéticas (Choi *et al.*, 2009; Kumar, Cowley, Davis, 2019). Levando em conta que mutações genéticas podem ser responsáveis por diversas doenças, inclusive as neoplasias, a utilização dessa técnica pode ser uma ótima ferramenta no diagnóstico dos pacientes. Da mesma forma que o WGS, o processo segue as etapas de extração da amostra, isolamento do DNA, fragmentação, ligação a marcadores, sequenciamento e por fim a análise dos resultados. Por focar no sequenciamento das regiões codificantes do DNA, é uma abordagem eficiente e econômica para identificar variantes que têm um impacto funcional significativo, além de permitir a caracterização de mutações somáticas em tumores, ajudando na identificação de alvos terapêuticos (Bartha, Györffy, 2019; Hintzsche, Robinson, Tan, 2016; Wang *et al.*, 2024).

2.3.2.2 Aplicações clínicas

O uso de ctDNA como ferramenta de diagnóstico já é assistida por diretrizes para diversos tipos de câncer, pois é possível obter o material para análise de forma não invasiva, e pode gerar informações importantes em relação ao diagnóstico tumoral precoce e ao tratamento. A possibilidade de análise do material genético do ctDNA e suas alterações o torna uma ferramenta importante no diagnóstico precoce (Wang *et al.*, 2024). Além disso, estudos demonstram que o ctDNA pode ser usado como uma ferramenta de prognóstico e progressão tumoral, e de análise da eficácia terapêutica. Uma vez que a meia-vida do ctDNA na circulação é menor que duas horas, a análise do marcador consegue fornecer uma imagem genética recente do

tumor, refletindo a resposta tumoral ao tratamento em tempo real (Cheng, Su, Qian, 2016).

2.3.3 Vesículas Extracelulares (VEs)

Vesículas extracelulares (VEs) são formadas de uma bicamada lipídica semelhante a parede celular da qual ela inicialmente se origina, formando corpos que podem variar de tamanho. São liberadas para o meio extracelular por praticamente todos os tipos celulares. De acordo com a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), as VEs podem ser classificadas com base no seu tamanho em pequenas, médias e grandes (Théry *et al.*, 2018), e também podem ser classificadas de acordo com sua origem intracelular em, exossomos, corpos apoptóticos e microvesículas (Andaloussi *et al.*, 2013). Essas vesículas possuem uma heterogeneidade que reflete em seu tamanho, conteúdo, origem celular e também seu impacto funcional nas células em que atua (Kalluri, Lebleu, 2020; Théry, Zitvogel, Amigorena, 2002). As vesículas extracelulares podem conter material genético da célula de origem como RNA e DNA e também proteínas (Kalluri, 2016; Valadi *et al.*, 2007). Informações sobre a origem, tamanho e conteúdo das principais tipos de vesículas podem ser encontradas na tabela 1.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Tipos de vesículas	Características			
	Origem	Tamanho	Marcadores	Conteúdo
Exossomos	Via endolisossomal; brotamentos intraluminais de corpos multivesiculares e fusão de um corpo multivesicular com a membrana celular	40-120nm	Tetraspaninas (como TSPAN29 e TSPAN30), componentes da ESCRT, PDCD6IP, TSG101, flotilina, MFGE8	mRNA, microRNA (miRNA) e outros RNAs não codificantes; proteínas citoplasmáticas e de membrana incluindo receptores e moléculas do complexo principal de histocompatibilidades (MHC)
Microvesículas	Superfície celular; brotamento externo da membrana celular	50-1,000nm	Integrinas, selectinas, ligantes CD40	mRNA, miRNA, RNAs não codificantes, proteínas citoplasmáticas e de membrana, incluindo receptores
Corpos apoptóticos	Superfície celular; bolha externa da membrana de uma célula apoptótica	500-2,000nm	Grandes quantidades de fosfatidilserinas	Frações nucleares, organelas celulares

ESCRT, endosomal sorting complex required for transport, MFGE8, milk fat globule-EGF factor 8 protein; PDCD6IP, programmed cell death 6 interacting protein (also known as ALIX); TSG101, tumour susceptibility gene 101 protein; TSPAN29, tetraspanin 29.

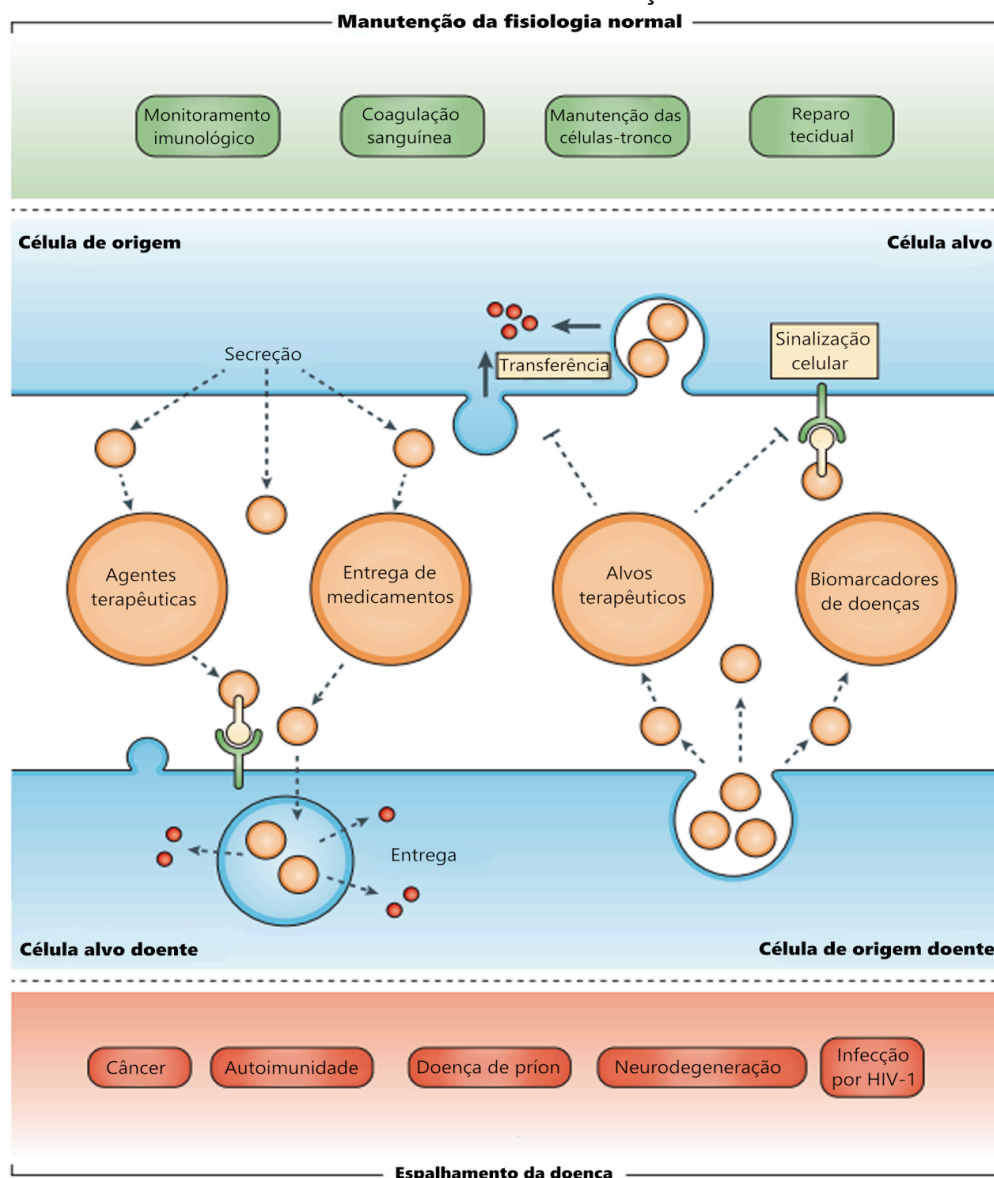
FONTE: Adaptado de Andaloussi *et al.* (2013)

Por meio de proteínas de superfície e ligantes lipídicos bioativos, as VEs tem a capacidade de ativar os receptores de membrana celulares e por meio da fusão das membranas, liberar moléculas efetoras que conseguem controlar diversas funções biológicas e celulares tendo uma função importante na manutenção da fisiologia natural (Andaloussi *et al.*, 2013). Um resumo das funções das VEs é apresentado na figura 11. As VEs podem ter influência direta no desenvolvimento de neoplasias, crescimento tumoral, metástase e também na possível resistência à terapia (Kalluri, Lebleu, 2020). Levando em conta o conteúdo dessas vesículas, e a possibilidade de encontrá-las em diversos fluidos (Wang *et al.*, 2024), se tornam uma ferramenta importante dentro da biópsia líquida para avaliar o conteúdo molecular relacionado ao *status* da doença (Marar, Starich, Wirtz, 2021; Wang *et al.*, 2024).

O uso de VEs na biópsia líquida tem diversas aplicações, portanto os métodos de identificação e separação devem possuir repetibilidade e efetividade. Os métodos para análise do conteúdo das vesículas vão ser baseados em métodos moleculares como PCR e sequenciamento. Enquanto os métodos de separação vão

se basear na diferença da origem e tamanho das vesículas, e para cada objetivo se usa um método diferente (Wang *et al.*, 2024).

FIGURA 11 - FUNÇÕES DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NA FISIOLÓGIA NORMAL E NA PATOGÊNESE DA DOENÇA



As vesículas extracelulares podem ser consideradas como sinalossomas para vários processos biológicos essenciais. Por exemplo, as vesículas extracelulares podem ativar respostas imunes ou suprimir a inflamação de uma forma forma tolerogênica, participando assim da vigilância imunológica. Na circulação sanguínea, as vesículas extracelulares participam da cascata de coagulação, fornecendo uma superfície para a montagem de fatores de coagulação. No cérebro, os neurônios podem se comunicar através da secreção de vesículas extracelulares, que contribuem para a plasticidade sináptica local e distal. Vesículas extracelulares também participam da manutenção e plasticidade das células-tronco, e parecem ter um papel essencial na reparação de lesões teciduais devido às suas características neo angiogênicas, antiapoptóticas e estimuladoras da proliferação celular. Esses efeitos poderiam ser adaptados em terapias usando vesículas extracelulares como agentes terapêuticos. Além disso, o fato de as vesículas extracelulares serem secretadas pela maioria das células, serem ricas em RNAs e serem capazes de transferir seu conteúdo para células receptoras indica que seriam candidatos altamente adequados para entrega de medicamentos, particularmente entrega terapêutica de ácidos nucleicos. No entanto, as mesmas propriedades das

vesículas extracelulares que acentuam os seus importantes papéis na manutenção da fisiologia normal podem levar ao seu envolvimento em condições patológicas. Por exemplo, vesículas extracelulares podem auxiliar o crescimento tumoral e patologias relacionadas ao tumor, induzindo tolerância imunológica, disseminação de oncogenes (por exemplo, MET), ativação de programas angiogênicos e promovendo metástases. No caso do desenvolvimento de doença autoimune, vesículas extracelulares podem induzir respostas imunológicas contra antígenos próprios. A transferência de proteínas de príon e agregados de proteínas tóxicas mediada por vesículas extracelulares também pode modular a progressão de doenças neurodegenerativas; além disso, a transferência de material viral ligado a vesículas extracelulares têm sido associado à infecção pelo HIV-1. Devido ao seu envolvimento na progressão da doença, as vesículas extracelulares podem ser consideradas alvos para intervenção terapêutica, bem como úteis para doenças biomarcadores.

FONTE: Adaptada de Andaloussi *et al.* (2013)

2.3.3.1 Métodos de separação

Ultracentrifugação

Considerado como o método padrão ouro para extração e separação de vesículas, a ultracentrifugação realiza esse trabalho por meio da diferença entre tamanho e densidade dos componentes presentes na amostra. É dividida em duas principais etapas: inicialmente se faz uma série contínua de centrifugação com velocidade média ou baixa com intuito de remover células mortas, restos celulares e vesículas maiores; em seguida é feita uma nova centrifugação com velocidades maiores para separar as vesículas do tamanho desejado, nesse caso, exossomos (40-120 nm). Ainda é feita uma lavagem para retirar algumas impurezas como proteínas (Zhang *et al.*, 2020). Além do método ser simples e de fácil execução, ele também consegue recuperar uma grande quantidade de vesículas. Porém, é um processo demorado, que possui um custo elevado e pode causar dano estrutural nas vesículas por conta das centrifugações repetidas (Yang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Muitas vezes também é usada a centrifugação por gradiente de densidade em conjunto com a ultracentrifugação. Essa técnica vai ter uma função maior na purificação das VEs, porém apresenta um problema relacionado a velocidade de sedimentação das vesículas resultando num maior tempo de espera (Ford, Graham, Rickwood, 1994; Zhang *et al.*, 2020).

Precipitação Polimérica

A precipitação polimérica usa o polietilenoglicol como o mediador na reação, por levar a diminuição da solubilidade de pequenas VEs sob a condição de centrifugação, possibilitando a extração das vesículas (Zhang *et al.*, 2020). Esse método possui uma facilidade em sua operação e um tempo curto de análise,

favorecendo seu uso para um número de amostras maiores, mas possui problemas relacionados a pureza e o número de vesículas recuperadas, podendo gerar até mesmo falsos positivos. O polímero usado também leva a uma dificultada na sua retirada, impedindo análises experimentais subsequentes (Rider, Hurwitz, Meckes Jr, 2016; Zhang *et al.*, 2020).

Ultrafiltração e Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC)

As técnicas de isolamento baseado em tamanho são duas, a ultrafiltração e cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). A ultrafiltração usa membranas com diferentes cortes de pesos moleculares que conseguem separar de forma seletiva as amostras, utilizando normalmente tubos para separar as VEs sem afetar a sua atividade e garantindo um baixo custo e alto enriquecimento da amostra (Zhang *et al.*, 2020). A ultrafiltração apresenta problemas relacionados à baixa pureza (Zhang *et al.*, 2020) e sem os filtros ideais pode apresentar um número de recuperação baixo para as vesículas (Vergauwen *et al.*, 2017). O segundo método se utiliza do princípio da cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), no qual é montado um sistema cromatográfico com um gel poroso que vai segurar moléculas pequenas que conseguem entrar pelos poros e evitando a entrada de moléculas maiores, que são eluídas juntas da fase móvel. As moléculas que ficam nos poros posteriormente são eluídas pela fase móvel e separadas (Zhang *et al.*, 2020). Essa técnica apresenta uma taxa de recuperação considerável, consegue realizar remoção quase completa de contaminantes, de forma rápida, podendo levar menos de 20 minutos, com baixo custo e facilidade de manuseio (Boing *et al.*, 2014). O principal problema se encontra na diminuição da pureza encontrada, pois os poros podem abrigar outras moléculas pequenas que podem estar presentes na amostra final (Boing *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2020).

Cromatografia por Imunoafinidade

Outro método usado para isolamento das vesículas é a cromatografia de imunoafinidade (IAC). Essa cromatografia se baseia no uso de anticorpos específicos que em uma coluna cromatográfica ou esferas magnéticas vão se ligar a antígenos presentes nas vesículas, principalmente proteínas de superfície e evitar que sejam eluídos pela fase móvel. Esse método permite o isolamento seletivo de vesículas garantindo uma maior pureza do isolado, além de alta sensibilidade e pode

ter um alto rendimento também. Porém a IAC possui um alto custo associado com seus reagentes, tornando-o um método pouco custo eficiente para grande número de amostras (Li *et al.*, 2017; Moser, Hage, 2010; Tschuschke *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

Microfluídos

Técnicas de isolamento baseadas em microfluídos, estão ainda em fase inicial de desenvolvimento, mas contam com algumas vantagens que podem torná-la amplamente utilizada no futuro. Essas técnicas se baseiam nas propriedades físicas e bioquímicas de subtipos específicos de vesículas. Ainda podem ser divididas em três categorias: imunoafinidade, uso de superfícies porosas para isolamento e uso de “peneiras” para diferenciar moléculas por seu tamanho. Apresenta vantagens como baixas quantidades de reagentes necessários, baixo tempo de processamento e isolados com alta pureza. Mas surgem problemas quando se trata da eficiência na extração de números suficientes de vesículas durante esses processos (Tschuschke *et al.*, 2020).

2.3.3.2 Métodos de análise

Após o isolamento das EVs é necessário realizar a detecção e análise do seu conteúdo. Esse conteúdo é composto principalmente por material genético como DNA, RNA e proteínas (Kalluri, 2016). Dentro desses, o miRNA, mRNA e as proteínas são os marcadores principais analisados em VEs (Wang *et al.*, 2024). Na sequência, serão abordados os principais métodos de detecção para o conteúdo das EVs.

PCR quantitativo em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR)

A técnica de RT-qPCR produz milhares de cópias de DNA complementar que são mensuradas utilizando fluorescência, gerando um resultado em tempo real (Bustin, Nolan, 2020). Esse método tem a capacidade de detectar o conteúdo das vesículas com alta especificidade e sensibilidade. Entretanto, não é capaz de detectar RNA não codificante e pode ter algum nível de interferência de substâncias endógenas (Wang *et al.*, 2024).

Sequenciamento Genético

O sequenciamento genético também pode ser usado para detecção do conteúdo das vesículas. Com alta sensibilidade e especificidade consegue detectar pequenas diferenças em vesículas, além de mutações genéticas, fusões e metilação, podendo identificar e categorizar as vesículas. Porém esse método tem alto custo experimental e necessita de pessoal altamente treinado (Wang *et al.*, 2024).

Proteômica

Para a análise de proteínas é usado o método da análise proteômica. Inicialmente é feito o isolamento das VEs e subsequente extração das proteínas para análise. Essas proteínas são analisadas seguindo critérios estabelecidos e é possível detectar e quantificar proteínas em baixas concentrações. Também é possível avaliar alterações nas proteínas expressas nas vesículas. O maior problema vem nas limitações e dificuldade do isolamento e purificação das VEs, podendo sofrer interferência de outras proteínas. Também é necessário levar em conta a quantidade de dados gerados pela análise, necessitando de pessoal capacitado para interpretá-los. (Ferreira *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2024).

2.3.3.3 Aplicações clínicas das VEs

As VEs podem ser obtidas de forma não invasiva, estão presentes em todos os líquidos biológicos e são secretadas por todas as células. Estudos mostraram que miRNAs podem estar presentes no conteúdo vesicular, e muitas vezes podem estar associados com a presença tumoral, podendo auxiliar no diagnóstico precoce do câncer. As proteínas também podem ser usadas como marcadores. As VEs também estão sendo estudadas como ferramentas de tratamento, principalmente pela sua função carreadora, podendo levar a terapia medicamentosa diretamente ao local ou células de interesse. Além disso, VEs também podem ser usadas como ferramentas em terapia gênica pela sua capacidade de carregar o material genético utilizado (Wang *et al.*, 2024).

2.4 APLICAÇÕES CLÍNICAS E LIMITAÇÕES DA BIÓPSIA LÍQUIDA

A biópsia líquida pode ser utilizada para diagnóstico de câncer em estágios iniciais da doença, assim como para melhorar a eficácia do diagnóstico em situações nas quais a biópsia tecidual não consegue fornecer informações suficientes (Shebeer, Robadi, 2024). A análise de biomarcadores tumorais, permite a identificação do material derivado do tumor antes do aparecimento de sintomas, em estágios iniciais quando o tumor ainda está pequeno (Galos *et al.*, 2022). A análise dos biomarcadores também fornece informações sobre a presença do tumor, evolução tumoral e informações moleculares (Li *et al.*, 2022 apud Shebeer, Robadi, 2024).

A análise dos biomarcadores pode dar informações moleculares sobre mutações ou outras alterações que se tornam muito importantes quando falamos sobre seleção de tratamento da malignidade. Existem diversas drogas com a capacidade de direcionar sua ação em células que possuam alguma mutação específica, chamadas de terapias direcionadas utilizadas na medicina de precisão. Em conjunto, a biópsia líquida tem a capacidade de analisar os biomarcadores presentes nos fluídos corporais para gerar informações em tempo real sobre a resposta tumoral ao tratamento. Os biomarcadores ainda conseguem fornecer informações sobre a recidiva do câncer- é chamado de recidiva ou recorrência quando o câncer que inicialmente havia sido eliminado, apresenta novo crescimento, podendo ser no mesmo local ou em outros sítios. Analisando CTCs ou ctDNA, a biópsia líquida consegue gerar informações sobre uma possível recidiva (Shebeer, Robadi, 2024).

Por conta das diversas técnicas existentes para isolar e identificar os marcadores, o uso da biópsia líquida apresenta diversas limitações envolvidas com esses processos. Inicialmente, a especificidade e sensibilidade, que são importantes medidas da precisão do resultado dos testes, vão variar muito dependendo de qual marcador é analisado e de qual técnica é usada tanto para extração quanto para a análise. Outro fator que interfere é o custo-efetividade do processo, pois esse varia de acordo com diversos fatores como o cenário clínico do paciente, custo do teste a ser realizado, uma vez que cada técnica possui equipamentos e reagentes diferentes que resultam em valores finais diferentes, necessitando analisar o impacto

no desfecho clínico do paciente. Nesse caso, é possível fazer a comparação direta com a biópsia tecidual e seus custos (Shebeer, Robadi, 2024).

A biópsia tecidual possui custos elevados, dependendo da origem do tecido, associados com seu processo, além dos riscos relacionados ao paciente durante e após o procedimento. Entretanto, dependendo da análise realizada pela biópsia líquida, o custo-efetividade ainda pode ser inferior à biópsia tecidual, sendo necessário analisar caso a caso. O uso das técnicas também fica limitado de acordo com a disponibilidade de equipamentos e materiais dentro dos centros diagnósticos. Muitos procedimentos que precisam de equipamentos mais avançados, podem ser inviáveis para alguns laboratórios. Avaliar a capacidade financeira do paciente para a realização desses exames é fundamental (Shebeer, Robadi, 2024).

Todos esses fatores limitantes levam a necessidade da padronização das técnicas e protocolos usados para garantir a precisão e repetibilidade. A falta da padronização leva a diferentes laboratórios usarem diferentes técnicas de coleta, processamento e análise da amostra, gerando resultados que variam de forma significativa, prejudicando o uso dessas informações como dados de comparação (Shebeer, Robadi, 2024).

2.5 BIÓPSIA TECIDUAL X BIÓPSIA LÍQUIDA

A biópsia tecidual é considerada o padrão ouro usado no diagnóstico e tratamento de câncer. Durante décadas esse método se manteve como referência em testes tumorais, por conta da possibilidade de gerar informações importantes relacionados com características moleculares do tumor, que podem ajudar no diagnóstico e na escolha de tratamento. Porém, a biópsia tecidual apresenta diversas limitações quando se trata de uma ferramenta de monitoramento a longo termo. Primeiramente, por se tratar de um procedimento invasivo, pode levar dor e desconforto ao paciente, e também traz complicações existentes em procedimentos cirúrgicos, além do custo elevado por conta da necessidade de pessoal treinado, uma sala de cirurgia disponível e também o longo tempo de recuperação (Tomar *et al.*, 2023).

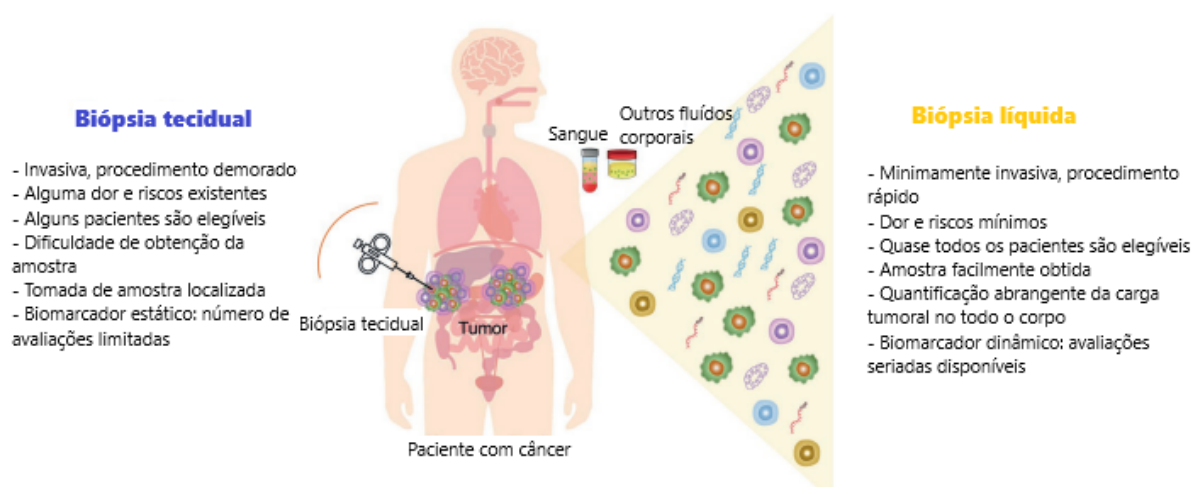
Muitas vezes, o tumor está em um local de difícil acesso, tornando a tomada de amostra impossível para a biópsia tecidual. Analisando novamente como um método cirúrgico e invasivo, a repetibilidade desse teste torna-se inviável. Outro

risco, mesmo que raro, associado à biópsia tecidual, é a possibilidade de lesões metastáticas derivadas do procedimento (Marrugo-Ramírez, Mir, Samitier, 2018; Robertson, Baxter, 2011; Tomar *et al.*, 2023).

O tumor é muito complexo e apresenta diversas camadas de heterogeneidade, tanto entre tumores de mesmo subtipo em pacientes diferentes, quanto em um mesmo tumor. A heterogeneidade intratumoral mostra que o tumor primário pode ter diferenças dentro de seu espaço geográfico, assim como diferenças entre o tumor primário e suas metástases. As células tumorais, por conta do estresse ambiental e por resultado do tratamento, podem evoluir durante a progressão da doença (Gilson, Merlin, Harlé, 2022). Por conta da heterogeneidade tumoral, para se ter uma imagem completa das características tumorais, seria necessário retirar amostras tanto do tumor primário, quanto das metástases. E seria necessário repetir essa retirada de amostras para se manter as informações atualizadas levando em conta a possível evolução da malignidade. Considerando todas as limitações da biópsia tecidual citadas anteriormente, esse nível de análise e acompanhamento torna-se inviável. Por conta disso, métodos ópticos, de radiologia e outros como tomografia de ressonância eletromagnética (MRI), são usados para obtenção de informações, mas possuem também seus riscos e limitações (Marrugo-Ramírez, Mir, Samitier, 2018).

A biópsia líquida é considerada um método de análise do tumor ou seus produtos, retirados do sangue ou outros fluidos corporais, de forma pouco invasiva ou até mesmo não-invasiva dependendo do material coletado (Tomar *et al.*, 2023). A capacidade da biópsia líquida em conseguir as amostras de forma pouco invasiva, permite que o acompanhamento do estado tumoral não assuma todos os riscos existentes com um procedimento cirúrgico. Por utilizar diversos tipos de fluidos corporais, permite o acesso a marcadores quando o tumor não é acessível. A capacidade de repetir a coleta de amostras sem riscos ao paciente, permite que a imagem molecular tumoral possa ser acompanhada durante todo o processo, garantindo a obtenção de informações mais completas e atualizadas do tumor, podendo superar as limitações impostas pela heterogeneidade tumoral (Marrugo-Ramírez, Mir, Samitier, 2018; Rodríguez *et al.*, 2021; Shebeer, Robadi, 2024).

FIGURA 12 - BIÓPSIA LÍQUIDA EM UM PACIENTE COM CÂNCER



FONTE: Adaptada de Han, Lee (2023)

2.6.COMBINAÇÃO DA BIÓPSIA LÍQUIDA COM OUTRAS FERRAMENTAS PARA DIAGNÓSTICO

A biópsia líquida pode auxiliar no diagnóstico e tratamento de diversos tipos de câncer, principalmente se associada aos métodos estabelecidos para o diagnóstico dessas neoplasias. A principal utilidade da biópsia líquida é analisar os biomarcadores presentes no fluidos dos pacientes de forma a gerar mais informações que possam garantir um diagnóstico mais preciso, além de permitir o acompanhamento da condição dos pacientes, conforme o tratamento é aplicado (Anitha *et al.*, 2024). Estudos mostram que a biópsia líquida pode ser usada em conjunto com mamografias para diagnóstico de câncer de mama (Tay, Tan, 2021), complementação da colonoscopia no diagnóstico de câncer colorretal (Cayrefourcq *et al.*, 2015), no diagnóstico de câncer de pulmão auxiliando a tomografia computadorizada a descobrir se nódulos encontrados são cancerosos (Groheux *et al.*, 2016; Santarpia *et al.*, 2018) e também complementando o exame de papanicolau no diagnóstico de câncer de colo de útero (Ghani *et al.*, 2022).

2.7 EXPECTATIVAS E FUTURO DA BIÓPSIA LÍQUIDA

A biópsia líquida potencialmente pode gerar um impacto em diversas áreas associadas com câncer, pois tem a capacidade de abordar e possivelmente contornar as principais limitações existentes relacionadas com as técnicas de

diagnóstico e acompanhamento tradicionais. A técnica é associada com a possibilidade de uso de biomarcadores para detecção molecular de alterações genéticas e outros marcadores específicos para determinados cânceres. A facilidade de obtenção de amostras possibilita o acompanhamento do tumor, garantindo um panorama contínuo da resposta tumoral ao tratamento e evitando limitações relacionadas à heterogeneidade tumoral, que normalmente são associadas a outras técnicas para monitoramento. A análise molecular possibilita também a administração de tratamentos personalizados para os pacientes, garantindo que a resposta ao tratamento seja melhor. Ainda, a biópsia líquida consegue realizar o monitoramento do paciente pós-tratamento, verificando possíveis recidivas (Anitha *et al.*, 2024; Giunta *et al.*, 2022; Lehrich *et al.*, 2024). Uma vez que a biópsia líquida possui diversas vantagens associadas, conforme ocorra o avanço tecnológico, a sensibilidade, especificidade e custos relacionados vão ser refinados em conjunto com o descobrimento de novos marcadores, fazendo com que a técnica possa vir a ser amplamente utilizada na prática clínica (Anitha *et al.*, 2024).

3 CONCLUSÃO

A biópsia líquida é uma técnica que utiliza amostras de diversos fluidos corporais para extrair biomarcadores como CTCs, VEs e ctDNA. Esses marcadores carregam informações genéticas muito importantes que podem ser utilizadas em diversas etapas no acompanhamento do paciente com câncer. Possui funções relacionadas com diagnóstico, acompanhamento do estado tumoral, no auxílio da escolha e observação da resposta tumoral à terapia, análise de metástases e acompanhamento para verificar recidivas. Por se tratar de uma técnica pouco invasiva e até não-invasiva, dependendo da amostra a ser coletada, e que permite repetições das coletas e análises, muitas das limitações que acompanham a biópsia tecidual podem ser contornadas.

Esse trabalho teve como objetivo realizar uma análise da bibliografia existente sobre a biópsia líquida para averiguar qual sua utilidade clínica como ferramenta de diagnóstico e acompanhamento do paciente com câncer.

A partir das informações coletadas, é possível afirmar que essa técnica apresenta diversas vantagens e desvantagens se comparada com as técnicas existentes na clínica. Conforme novos estudos são realizados, mais conhecimento sobre a técnica, seus marcadores e as ferramentas de análise são gerados. Com o passar do tempo, soluções para as principais limitações da biópsia líquida podem surgir, facilitando a entrada e permanência da biópsia líquida na prática clínica, podendo auxiliar e complementar as técnicas utilizadas nos dias de hoje. Dessa forma a biópsia líquida se mostra uma ferramenta promissora na prática clínica do diagnóstico e manejo do câncer.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, C.A. *et al.* CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES POR CITOMETRIA DE FLUXO DE NOVA GERAÇÃO EM TUMORES SÓLIDOS PEDIÁTRICOS: BIÓPSIA LÍQUIDA PARA DIAGNÓSTICO E SEGUIMENTO. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 46, p. 196-197, out. 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.329>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S253113792400662X>. Acesso em: 29 out. 2024.

ADAN, A. *et al.* Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, ed. 2, p. 163-176, mar. 2017. DOI 10.3109/07388551.2015.1128876. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26767547/>. Acesso em: 3 nov. 2024

ALUNNI-FABBRONI, M.; SANDRI, M. T. Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. **Methods**, v. 50, ed. 4, abr. 2010. DOI 10.1016/j.ymeth.2010.01.027. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20116432/>. Acesso em: 23 out. 2024.

ANDALOUSSI, S. EL *et al.* Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, ed. 5, p. 347-357, maio 2013. DOI 10.1038/nrd3978. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23584393/>. Acesso em: 3 nov. 2024.

ANITHA, K. *et al.* Liquid biopsy for precision diagnostics and therapeutics. **Clinica Chimica Acta**, v. 554, 1 fev. 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117746>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000989812300548X?via%3Di> hub. Acesso em: 24 out. 2024.

BAGGER, F.O. *et al.* Whole genome sequencing in clinical practice. **BMC Medical Genomics**, v. 17, n. 39, 29 jan. 2024. DOI <https://doi.org/10.1186/s12920-024-01795-w>. Disponível em: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-024-01795-w>. Acesso em: 15 out. 2024.

BANKÓ, P. *et al.* Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 12, n. 48, 14 maio 2019. DOI <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0735-4>. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-019-0735-4>. Acesso em: 25 set. 2024.

BARBOSA, E.B. *et al.* Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, ed. 3, jun. 2012. DOI <https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000300019>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/rbzzwDkg4gWNqCPSLNMK6wD>. Acesso em: 2 nov. 2024.

BARTHA, A.; GYÖRFFY, B. Comprehensive Outline of Whole Exome Sequencing Data Analysis Tools Available in Clinical Oncology. **Cancers (Basel)**, v. 11, 4 nov. 2019. DOI 10.3390/cancers11111725. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6895801/>. Acesso em: 18 out. 2024.

BOHERS, E.; VIAILLY, P.; JARDIN, F. CfDNA Sequencing: Technological Approaches and Bioinformatic Issues. **Pharmaceuticals**, v. 14, ed. 6, 21 jun. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/ph14060596>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/6/596>. Acesso em: 12 out. 2024.

BOING, A.N. *et al.* Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, ed. 1, 8 set. 2014. DOI <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>. Disponível em: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3402/jev.v3.23430>. Acesso em: 20 out. 2024.

BRASIL. Saúde de A a Z: Câncer. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer>. Acesso em: 26 out. 2024.

BRATMAN, S.V. *et al.* Potential clinical utility of ultrasensitive circulating tumor DNA detection with CAPP-Seq. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 15, ed. 6, p. 715-719, 16 mar. 2015. DOI <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1019476>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737159.2015.1019476>. Acesso em: 12 out. 2024.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3004, ed. 8, 24 abr. 2020. DOI 10.3390/ijms21083004. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7215906/>. Acesso em: 20 out. 2024.

CAYREFOURQ, L. *et al.* Establishment and Characterization of a Cell Line from Human Circulating Colon Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 75, ed. 5, p. 892-901, 1 mar. 2015. DOI <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2613>. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/75/5/892/606506/Establishment-and-Characterization-of-a-Cell-Line>. Acesso em: 22 out. 2024.

CHENG, F.; SU, L.; QIAN, C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. **Oncotarget**, v. 7, p. 48832-48841, 19 maio 2016. DOI <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9453>. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/article/9453/text/>. Acesso em: 19 out. 2024.

CHOI, M. *et al.* Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. **Biological Sciences**, v. 106, ed. 45, p. 19096-19101, 10 nov. 2009. DOI <https://doi.org/10.1073/pnas.0910672106>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0910672106>. Acesso em: 1 nov. 2024.

COHEN, J.D. *et al.* Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. **Science**, v. 359, ed. 6378, p. 926-930, 18 jan. 2018. DOI

10.1126/science.aar3247. Disponível em:
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aar3247>. Acesso em: 26 out. 2024.

CROWLEY, E. *et al.* Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. **Nature Reviews**, v. 10, 9 jul. 2013. DOI <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.110>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2013.110>. Acesso em: 15 set. 2024.

DIAZ JR., L.A. *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. **Nature**, v. 486, p. 537-540, 28 jun. 2012. DOI 10.1038/nature11219. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3436069/>. Acesso em: 14 set. 2024.

DIEHL, F. *et al.* Analysis of Mutations in DNA Isolated From Plasma and Stool of Colorectal Cancer Patients. **Gastroenterology**, v. 135, ed. 2, p. 489-498, 15 maio 2008. DOI 10.1053/j.gastro.2008.05.039. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2820386/>. Acesso em: 10 out. 2024.

DUNCAN, D.L.; ZEIDNER, J.F.; MONTGOMERY, N.D. Assessing Measurable Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. **Advances in Molecular Pathology**, v. 2, ed. 1, p. 45-58, nov. 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.yamp.2019.07.003>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2589408019300043>. Acesso em: 5 nov. 2024.

EL-FALOUJI, A. I. *et al.* Rapid Detection of Recurrent Non-Muscle Invasive Bladder Cancer in Urine Using ATR-FTIR Technology. **Molecules**, v. 27, 14 dez. 2022. DOI 10.3390/molecules27248890. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9785428/>. Acesso em: 15 set. 2024.

FERREIRA, M.M.; RAMANI, V.C.; JEFFREY, S.S. Circulating tumor cell technologies. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 3, p. 374-394, 28 jan. 2016. DOI 10.1016/j.molonc.2016.01.007. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5528969/>. Acesso em: 25 set. 2024.

FRABLE, W.J. Fine-needle Aspiration Biopsy: A Review. **Human Pathology**, v. 14, n. 1, jan. 1986. DOI [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(83\)80042-2](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(83)80042-2). Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0046817783800422>. Acesso em: 14 set. 2024.

FORD, T.; GRAHAM, J.; RICKWOOD, D. Iodixanol: A Nonionic Iso-osmotic Centrifugation Medium for the Formation of Self-Generated Gradients. **Analytical Biochemistry**, v. 220, ed. 2, p. 360-366, 1 ago. 1994. DOI <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1350>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269784713509?via%3Di> hub. Acesso em: 19 out. 2024.

FORSHEW, T. *et al.* Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA. **Science Translational Medicine**, v. 4, ed. 136, 30 maio 2012. DOI 10.1126/scitranslmed.3003726. Disponível em:

<https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3003726>. Acesso em: 12 out. 2024.

GALOS, D. *et al.* Clinical Applications of Liquid Biopsy in Colorectal Cancer Screening: Current Challenges and Future Perspectives. **Cells**, v. 11, n. 3493, ed. 21, 4 nov. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/cells11213493>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/21/3493>. Acesso em: 20 out. 2024.

GARCÍA-FONCILLAS, J. *et al.* Incorporating BEAMing technology as a liquid biopsy into clinical practice for the management of colorectal cancer patients: an expert taskforce review. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 12, p. 2943–2949, 4 set. 2017. DOI 10.1093/annonc/mdx501. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5834030/>. Acesso em: 8 out. 2024.

GHANI, M.A. *et al.* Imaging Biomarkers and Liquid Biopsy in Assessment of Cervical Cancer. **Journal of Computer Assisted Tomography**, v. 46, ed. 5, p. 707-715, set/out 2022. DOI 10.1097/RCT.0000000000001358. Disponível em: https://journals.lww.com/jcat/abstract/2022/09000/imaging_biomarkers_and_liquid_biopsy_in_assessment.7.aspx. Acesso em: 23 out. 2024.

GILSON, P.; MERLIN, J.; HARLÉ, A. Deciphering Tumour Heterogeneity: From Tissue to Liquid Biopsy. **Cancers**, v. 14, n. 1384, ed. 6, 8 mar. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/cancers14061384>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/6/1384>. Acesso em: 21 out. 2024.

GIUNTA, E.F. *et al.* Blood-based liquid biopsy in advanced prostate cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 194, fev. 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2023.104241>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1040842823003293?via%3Dihub>. Acesso em: 25 out. 2024.

GROHEUX, D. *et al.* FDG PET-CT for solitary pulmonary nodule and lung cancer: Literature review. **Diagnostic and Interventional Imaging**, v. 97, ed. 10, p. 1003-1017, out. 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.diii.2016.06.020>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211568416301747>. Acesso em: 22 out. 2024.

GODFREY, T. E.; KELLY, L. A. Development of Quantitative Reverse Transcriptase PCR Assays for Measuring Gene Expression. *In: METHODS in Molecular Biology: Molecular Toxicology Protocols*. 1. ed., 2005. v. 291, p. 423-445. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-840-4:423>. Acesso em: 9 dez. 2024.

GONG, T. *et al.* Analysis and Performance Assessment of the Whole Genome Bisulfite Sequencing Data Workflow: Currently Available Tools and a Practical Guide to Advance DNA Methylation Studies. **Small Methods**, v. 6, 22 jan. 2022. DOI 10.1002/smt.202101251. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35064762/>. Acesso em: 12 out. 2024.

HAN, H.S.; LEE, K. Liquid Biopsy: An Emerging Diagnostic, Prognostic, and Predictive Tool in Gastric Cancer. **Journal of Gastric Cancer**, v. 24, ed. 1, jan. 2024. DOI <https://doi.org/10.5230/jgc.2024.24.e5>. Disponível em: <https://jgc-online.org/search.php?where=aview&id=10.5230/jgc.2024.24.e5&code=1100JGC&vmode=FULL>. Acesso em: 5 nov. 2024.

HAO, S. *et al.* Size-based separation methods of circulating tumor cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 125, p. 3-20, 1 fev. 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.01.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X18300024?via%3Dihub>. Acesso em: 25 set. 2024.

HEITZER, E. *et al.* Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. **Genome Medicine**, v. 5, n. 30, 5 abr. 2013. DOI <https://doi.org/10.1186/gm434>. Disponível em: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/gm434>. Acesso em: 17 out. 2024.

HINTZSCHE, J.D.; ROBINSON, W.A.; TAN, A.C.A Survey of Computational Tools to Analyze and Interpret Whole Exome Sequencing Data. **International Journal of Genomics**, 14 dez. 2016. DOI <https://doi.org/10.1155/2016/7983236>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2016/7983236>. Acesso em: 18 out. 2024.

HORN, L. *et al.* Monitoring Therapeutic Response and Resistance: Analysis of Circulating Tumor DNA in Patients With ALK+ Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 14, ed. 11, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.08.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1556086419306653>. Acesso em: 15 set. 2024.

JUNQUEIRA-NETO, S. *et al.* Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. **Acta Cytologica**, v. 63, ed. 6, 15 fev. 2019.

KALLURI, R. The biology and function of exosomes in cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 126, p. 1208-1215, 1 abr. 2016. DOI [10.1172/JCI81135](https://doi.org/10.1172/JCI81135). Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/81135>. Acesso em: 19 out. 2024.

KALLURI, R.; LEBLEU, V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. **Science**, v. 367, ed. 6478, 7 fev. 2020. DOI [10.1126/science.aau6977](https://doi.org/10.1126/science.aau6977). Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aau6977>. Acesso em: 19 out. 2024.

KREBS, M.G. *et al.* Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 2, ed. 6, p. 351-365, nov. 2010. DOI [10.1177/1758834010378414](https://doi.org/10.1177/1758834010378414). Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3126032/>. Acesso em: 23 out. 2024.

KUMAR, K.R.; COWLEY, M.J.; DAVIS, R.L. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 45, ed. 07, p. 661-673, 16 maio de 2019. DOI [10.1055/s-0039-1688446](https://doi.org/10.1055/s-0039-1688446). Disponível em:

<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0039-1688446>. Acesso em: 1 nov. 2024.

LEHRICH, B.M. *et al.* Battle of the biopsies: Role of tissue and liquid biopsy in hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 80, ed. 3, p. 515-530, mar. 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.11.030>. Disponível em: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(23\)05307-2/fulltext](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(23)05307-2/fulltext). Acesso em: 25 out. 2024.

LEYGO, C. *et al.* DNA Methylation as a Noninvasive Epigenetic Biomarker for the Detection of Cancer. **Disease Markers**, v. 2017, 5 set. 2017. DOI 10.1155/2017/3726595. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5605861/>. Acesso em: 2 nov. 2024.

LI, H. *et al.* Circulating tumor DNA detection: A potential tool for colorectal cancer management (Review). **Oncology Letters**, v. 17, p. 1409-1416, 5 dez. 2018. DOI <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9794>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.9794#b6-ol-0-0-9794>. Acesso em: 8 out. 2024

LI, M. *et al.* BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. **Nature Methods**, v. 3, p. 95-97, 23 jan. 2006. DOI <https://doi.org/10.1038/nmeth850>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmeth850>. Acesso em: 5 nov. 2024.

LI, P. *et al.* Progress in Exosome Isolation Techniques. **Theranostics**, [s. l.], v. 7, p. 789-804, 26 jan. 2017. DOI 10.7150/thno.18133. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5327650/>. Acesso em: 20 out. 2024.

LI, W. *et al.* Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 25, 20 jan. 2022. DOI 10.1186/s12943-022-01505-z. Disponível em: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-022-01505-z>. Acesso em: 4 out. 2024.

LIN, C. *et al.* Liquid Biopsy, ctDNA Diagnosis through NGS. **Life**, v. 11, ed. 9, 28 ago. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/life11090890>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-1729/11/9/890>. Acesso em: 4 out. 2024.

LONE, S.N. *et al.* Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. **Mol Cancer**, v. 21, n. 79, ed. 1, 18 mar. 2022. DOI 10.1186/s12943-022-01543-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8932066/>. Acesso em: 11 set. 2024.

MA, X; LIU, X; YANG, L.; OU, K. Application progress of liquid biopsy in gastric cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 15 set. 2022. DOI 10.3389/fonc.2022.969866. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9521037/>. Acesso em: 15 set. 2024.

MANDEL, P.; METAIS, P. [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. **Comptes rendus des seances de la societe de biologie et de ses filiales**, v. 142, 1948. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18875018/>. Acesso em: 23 out. 2024.

MARAR, C.; STARICH, B.; WIRTZ, D. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. **Nature Immunology**, v. 22, p. 560-570, 22 mar. 2021. DOI <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00899-0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41590-021-00899-0>. Acesso em: 19 out. 2024.

MARRUGO-RAMÍRES, J.; MIR, M.; SAMITIER, J. Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2877, ed. 10, 21 set. 2018. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms19102877>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/10/2877>. Acesso em: 21 out. 2024.

MEDRADO, L. Carcinogênese - **Desenvolvimento, Diagnóstico e Tratamento das Neoplasias**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2015. E-book. ISBN 9788536520827. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536520827/>. Acesso em: 30 ago. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). SECRETÁRIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia**. Brasília: 2014. 356 p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_clinicos_diretrizes_terapias_oncologia.pdf. Acesso em: 26 out. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). INCA. **Deteção Precoce do Câncer**. Rio de Janeiro: 2021. 72 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/deteccao-precoc-e-do-cancer.pdf>. Acesso em: 26 out. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **ESTIMATIVA 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 9 dez. 2024.

MOORE, L.D.; LE, T.; FAN, G. DNA Methylation and Its Basic Function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, p. 23-38, 11 jul. 2012. DOI <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/npp2012112>. Acesso em: 8 out. 2024

MOSER, A.C.; HAGE, D.S. Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. **Bioanalysis**, v. 2, p. 769-790, abr. 2010. DOI [10.4155/bio.10.31](https://doi.org/10.4155/bio.10.31). Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2903764/>. Acesso em: 20 out. 2024.

MOULIERE, F. *et al.* Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. **Science Translational Medicine**, v. 10, ed. 466, 7 nov. 2018. DOI [10.1126/scitranslmed.aat49](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat49). Disponível em:

<https://www.science.org/doi/full/10.1126/scitranslmed.aat4921>. Acesso em: 4 out. 2024.

MUCHLINSKA, A. *et al.* Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells Using Imaging Flow Cytometry: A Perspective Study. **Cancers**, v. 14, ed. 17, 29 set. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/cancers14174178>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/17/4178>. Acesso em: 2 out. 2024.

NEWMAN, A.M. *et al.* An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. **Nature Medicine**, v. 20, ed. 5, p. 548-554, 6 abr. 2016. DOI 10.1038/nm.3519. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4016134/>. Acesso em: 12 out. 2024.

OHAN, N.W.; HEIKKILA, J.J. Reverse Transcription-polymerase chain reaction: an overview of the technique and its applications. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 13-29, 1993. DOI [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(93\)90408-F](https://doi.org/10.1016/0734-9750(93)90408-F). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/073497509390408F>. Acesso em: 3 nov. 2024.

ORZAN, F. *et al.* Liquid Biopsy of Cerebrospinal Fluid Enables Selective Profiling of Glioma Molecular Subtypes at First Clinical Presentation. **Clinical Cancer Research**, v. 29, 17 jan. 2023. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-22-2903. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10068436/>. Acesso em: 17 set. 2024.

PAN, B.T.; JOHNSTONE, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. **Cell**, v. 33, ed. 3, p. 967-78, 1983. DOI 10.1016/0092-8674(83)90040-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6307529/>. Acesso em: 23 out. 2024.

PATERLINI-BRECHOT, P.; BENALI, N.L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. **Cancer Letters**, v. 253, ed. 2, p. 180-204, 19 ago. 2007. DOI 10.1016/j.canlet.2006.12.014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17314005/>. Acesso em: 23 out. 2024.

PERAKIS, S.; SPEICHER, M. R. Emerging concepts in liquid biopsies. **BMC Med**, v. 15, n. 75, ed. 1, 6 abr. 2017. DOI 10.1186/s12916-017-0840-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5382440/>. Acesso em: 11 set. 2024.

RIDER, M.A.; HURWITZ, S.N.; MECKES JR., D. G. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 23978, 12 abr. 2016. DOI <https://doi.org/10.1038/srep23978>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep23978>. Acesso em: 20 out. 2024.

ROBERTSON, E.G.; BAXTER, G. Tumour seeding following percutaneous needle biopsy: The real story!. **Clinical Radiology**, v. 66, ed. 11, p. 1007-1014, nov. 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.crad.2011.05.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009926011002376>. Acesso em: 21 out. 2024.

ROBERTSON, K.D. DNA methylation and human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 597-610, ago. 2005. DOI 10.1038/nrg1655. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16136652/>. Acesso em: 10 out. 2024.

RODRÍGUEZ, J. *et al.* When Tissue is an Issue the Liquid Biopsy is Nonissue: A Review. **Oncology and Therapy**, v. 9, p. 89-110, 10 mar. 2021. DOI <https://doi.org/10.1007/s40487-021-00144-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40487-021-00144-6>. Acesso em: 22 out. 2024.

SABATH, D.E. *et al.* Clinical Validation of a Circulating Tumor Cell Assay Using Density Centrifugation and Automated Immunofluorescence Microscopy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 158, ed. 2, 23 abr. 2022. DOI <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqac040>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article/158/2/270/6573265>. Acesso em: 2 out. 2024.

SANTARPIA, M. *et al.* Liquid biopsy for lung cancer early detection. **Journal of Thoracic Disease**, v. 10, ed. 7, 18 abr. 2018. DOI 10.21037/jtd.2018.03.81. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211568416301747>. Acesso em: 22 out. 2024.

SATO, K. Microdevice in Cellular Pathology: Microfluidic Platforms for Fluorescence in situ Hybridization and Analysis of Circulating Tumor Cells. **Analytical Sciences**, v. 31, 10 set. 2015.

SAURA, C. *et al.* Early-Stage Breast Cancer Detection in Breast Milk. **Cancer discovery**, v. 13, 5 out. 2023. DOI 10.1158/2159-8290.CD-22-1340. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10551665/>. Acesso em: 18 set. 2024.

SHBEER, A.M.; ROBADI, I.A. Liquid biopsy holds a promising approach for the early detection of cancer: Current information and future perspectives. **Pathology - Research and Practice**, v. 254, fev. 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.155082>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0344033823007835?via%3Dihub>. Acesso em: 24 out. 2024.

SIRAVEGNA, G.; MARSONI, S.; SIENA, S.; BARDELLI, A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, Set 2017. DOI 10.1038/nrclinonc.2017.14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28252003/>. Acesso em: 21 set. 2024.

STEVENS, G.L.; SCHEER, W.D.; LEVINE, E.A. Detection of tyrosinase mRNA from the blood of melanoma patients. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 5, ed. 4, p. 293-296, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8722221/>. Acesso em: 23 out. 2024.

SULAIMAN, R. *et al.* A Laboratory-Friendly CTC Identification: Comparable Double-Immunocytochemistry with Triple-Immunofluorescence. **Cancers**, v. 14, ed.

12, 10 jun. 2022. DOI 10.3390/cancers14122871. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/12/2871>. Acesso em: 2 out. 2024.

SUZUKI, M. *et al.* Whole-genome bisulfite sequencing with improved accuracy and cost. **Genome Research**, v. 28, ed. 9, p. 1364–1371, Set. 2018. DOI 10.1101/gr.232587.117. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6120621/>. Acesso em: 16 dez. 2024.

SWARUP, N. *et al.* Multi-faceted attributes of salivary cell-free DNA as liquid biopsy biomarkers for gastric cancer detection. **Biomarker Research**, v. 11, 10 out. 2023. DOI 10.1186/s40364-023-00524-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10566128/>. Acesso em: 17 set. 2024.

TAY, T.K.Y.; TAN, P.H. Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Focused Review. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 145, ed. 6, p. 687-686, 11 fev. 2020. DOI <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0559-RA>. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/145/6/678/427493/Liquid-Biopsy-in-Breast-Cancer-A-Focused-Review>. Acesso em: 22 out. 2024.

THÉRY, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, ed. 1, 23 nov. 2018. DOI <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>. Disponível em: <https://isevjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1080/20013078.2018.1535750>. Acesso em: 19 out. 2024.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 569-579, 1 ago. 2002. DOI <https://doi.org/10.1038/nri855>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri855>. Acesso em: 20 out. 2024.

TOMAR, U. *et al.* Liquid biopsy and its significance in tumour – Detection in the field of pathology. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 27, ed. 1, p. 195-200, 21 mar. 2023. DOI 10.4103/jomfp.jomfp_251_22. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10207190/>. Acesso em: 21 out. 2024.

TRUFELLI, D.M. *et al.* ANÁLISE DO ATRASO NO DIAGNÓSTICO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA EM UM HOSPITAL HOSPITAL PÚBLICO. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, ed. 1, 2008. DOI <https://doi.org/10.1590/S0104-42302008000100024>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/vkwMGcTSY3sWZmJYVpXCQ7L/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 11 set. 2024.

TSCHUSCHKE, M. *et al.* Inclusion Biogenesis, Methods of Isolation and Clinical Application of Human Cellular Exosomes. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, ed. 2, 6 fev. 2020. DOI 10.3390/jcm9020436. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7074492/>. Acesso em: 20 out. 2024.

VALADI, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, p. 654-659, 7 maio 2007. DOI <https://doi.org/10.1038/ncb1596>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncb1596>. Acesso em: 19 out. 2024.

VALLEDOR, L.; JORRÍN, J. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **Journal of Proteomics**, v. 74, ed. 1, p. 1-18, 1 jan. 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.07.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874391910002113?via%3Dihub>. Acesso em: 2 nov. 2024.

VERGAUWEN, G. *et al.* Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research. **Scientific Reports**, v. 7, n. 2704, 2 jun. 2017. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02599-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-02599-y>. Acesso em: 20 out. 2024.

WANG, X. *et al.* Research progress of CTC, ctDNA, and EVs in cancer liquid biopsy. **Frontiers in Oncology**, v. 14, 24 jan. 2024. DOI <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1303335>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2024.1303335/full>. Acesso em: 2 nov. 2024.

WARDENAAR, R. *et al.* Evaluation of MeDIP-chip in the context of whole-genome bisulfite sequencing (WGBS-seq) in Arabidopsis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1067, p. 203-224, 2013. DOI [10.1007/978-1-62703-607-8_13](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-607-8_13). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23975794/>. Acesso em: 12 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer Control. Knowledge into Action. **WHO Guide for Effective Programmes: Early detection**. Geneva: 2007. Disponível em: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43743/9241547338_eng?sequence=1. Acesso em: 14 set. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Globocan**. International Agency for Research on Cancer. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today/en/fact-sheets-populations>. Acesso em: 10 set.2024

WU, J. *et al.* Whole genome sequencing and its applications in medical genetics. **Quantitative biology**, [s. l.], v. 4, ed. 2, p. 115-128, 1 maio 2016. DOI <https://doi.org/10.1007/s40484-016-0067-0>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1007/s40484-016-0067-0?mssockid=0f26813d27ee698f3c95901726376873>. Acesso em: 17 out. 2024.

YANG, X. *et al.* New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. **Journal of Controlled Release**, v. 308, p. 119-129, 28 ago. 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365919304080>. Acesso em: 24 out. 2024.

YU, M. *et al.* Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. **Journal of Cell Biology**, v. 193, 7 fev. 2011. DOI 10.1083/jcb.201010021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3101098/>. Acesso em: 24 set. 2024

YU, M. *et al.* Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. **Science**, v. 345, ed. 6193, 11 jul. 2014. DOI 10.1126/science.1253533. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1253533>. Acesso em: 24 set. 2024.

ZHANG, B. *et al.* Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring EGFR gene mutation. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 9, ed. 4, p. 1383-1388, 27 jan. 2015. DOI <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2221>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2015.2221>. Acesso em: 7 out. 2024.

ZHANG, L. *et al.* Meta-Analysis of the Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 20, p. 5701-5710, 14 out. 2012. DOI <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1587>. Disponível em: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/18/20/5701/77720/Meta-Analysis-of-the-Prognostic-Value-of>. Acesso em: 16 out. 2024.

ZHANG, Y. *et al.* Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2020, ed. 15, p. 6917-6934, 22 set. 2020. DOI <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>. Disponível em: <https://www.dovepress.com/exosome-a-review-of-its-classification-isolation-technique-s-storage-di-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>. Acesso em: 19 out. 2024.

ZHANG, X. *et al.* Exosomal miRNA-profiling of pleural effusion in lung adenocarcinoma and tuberculosis. **Frontiers in surgery**, v. 9, 6 jan. 2023. DOI 10.3389/fsurg.2022.1050242. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9852630/>. Acesso em: 19 set. 2024.

ZHAO, H. *et al.* Factors influencing the diagnostic and prognostic values of circulating tumor cells in breast cancer: a meta-analysis of 8,935 patients. **Frontiers in Oncology**, v. 13, 26 nov. 2023. DOI <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1272788>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2023.1272788/full>. Acesso em: 16 out. 2024.