

CAPÍTULO 19

A BIÓPSIA LÍQUIDA NA ONCOLOGIA DE PRECISÃO

Mariano Zalis

Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento na OC Precision Medicine –
Grupo Oncoclínicas, Rio de Janeiro

Carolina Bustamante Fernandes

Especialista em Genética Molecular na OC Precision Medicine –
Grupo Oncoclínicas, Rio de Janeiro

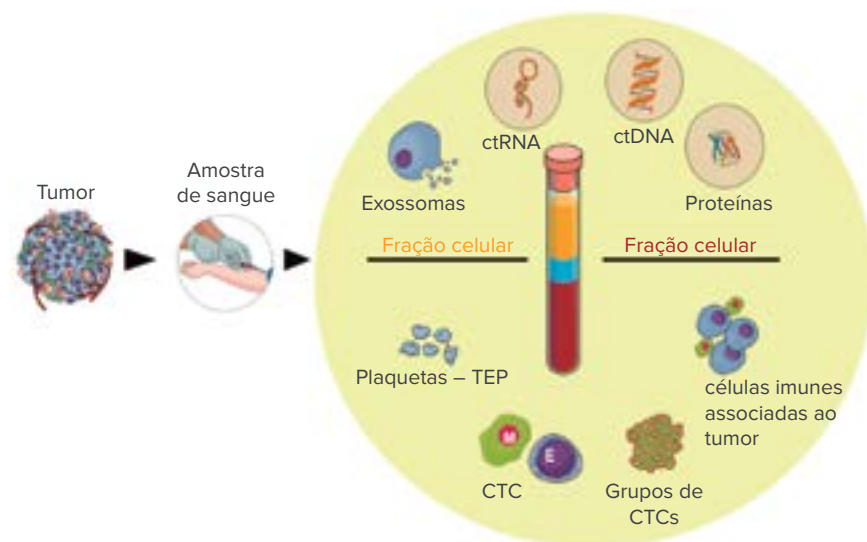
Introdução

O conceito de Oncologia de Precisão continua a evoluir, assim como os desafios e as demandas no que se refere ao diagnóstico, ao prognóstico e à detecção de resistência ao tratamento. Embora a descoberta de drogas-alvo capazes de atingir mudanças genômicas específicas em pacientes com câncer metastático tenha revolucionado o atendimento ao paciente, a heterogeneidade tumoral e a capacidade de detectar tumores em estágios iniciais continuam a ser obstáculos para os oncologistas que necessitam otimizar regimes terapêuticos baseados no genoma do câncer de um indivíduo¹.

As biópsias de tecido, que ainda representam atualmente o padrão de diagnóstico de tumor, apenas refletem um único ponto no tempo de um determinado sítio tumoral. Esse método de amostragem é, portanto, inadequado para a caracterização abrangente do tumor de um paciente, uma vez que foi demonstrado que várias áreas dentro do tumor primário ou metástases podem, de fato, abrigar diferentes perfis genômicos². Por sua vez, a diversidade genética molecular dentro de um tumor também pode alterar ao longo da evolução do mesmo, tornando as futuras decisões de tratamento com base em informações históricas de biópsia potencialmente imprecisas e subótimas. Além disso, um procedimento de biópsia cirúrgica apresenta reprodutibilidade limitada e pode ser inviabilizado devido à idade do paciente, a comorbidades, aos custos e ao tempo, potencialmente gerando complicações clínicas³. Por conseguinte, a biópsia líquida na Oncologia de Precisão foi introduzida como um novo conceito de diagnóstico, baseado na amostragem e na análise de células tumorais circulantes (CTCs), de DNA tumoral livre (ctDNA) e de RNA em tecido biológico não sólido, como sangue, urina, líquido cefalorraquidiano e outros fluidos⁴ (figura 1). Já foram desenvolvidos ensaios de biópsia líquida altamente sensíveis, que agora podem ser aplicados para detectar variantes genéticas, mudanças epigenéticas, detecção precoce do câncer e caracterizar a doença residual mínima (DRM), que reflete a presença de células tumorais disseminadas da lesão primária a órgãos distantes em pacientes que não possuem sinais clínicos ou radiológicos de metástase ou células tumorais residuais após a terapia local, que eventualmente levam à recidiva local. A DRM é a nova fronteira da análise de biópsia líquida, que é desafiada pelas baixas concentrações de CTCs e ctDNA em amostras de sangue e, por consequência, o sequenciamento do ctDNA para o rastreamento do câncer e para o diagnóstico precoce enfrenta grandes obstáculos. Em primeiro lugar, a concentração de ctDNA é de cerca de 1ng/ml a 10ng/ml em indivíduos assintomáticos⁵. Portanto, para atingir 95% de sensibilidade, foi demonstrado que cerca de 150ml a 300ml de amostra de sangue por teste são necessários para o rastreamento do câncer de mama⁶. Em segundo lugar, além das células tumorais, as células saudáveis normais e as células hematopoiéticas também contribuem para o ctDNA no sangue, resultando

em aumento de falso-positivos ao aplicar ensaios ctDNA para diagnóstico de câncer⁷. No entanto, a tecnologia tem avançado para atender aos requisitos de sensibilidade e especificidade no rastreamento do câncer e no diagnóstico precoce^{4,8,9}. Com isso, diversos ensaios de ctDNA já podem alcançar maior sensibilidade e especificidade do que os antígenos padrões derivados do câncer, como antígeno específico da próstata, antígeno carcinoembrionário, antígeno (CA) 19-9, CA 15-3 e CA-125¹⁰.

Figura 1. Biomarcadores encontrados na biópsia líquida



Moléculas e células são liberadas na circulação pelo tumor. O tubo simboliza a amostra de sangue coletada, da qual, após a centrifugação, a fração plasma/soro (amarelo, superior) é separada da fração celular (vermelho, inferior). Na amostra de sangue, diferentes biomarcadores de circulação complementar podem ser detectados, isolados e caracterizados. No plasma ou soro podem ser detectados exossomos, proteínas, ctRNA (RNA livre de células circulante) e ctDNA. Na fração celular, podemos detectar a fração da célula tumoral com células tumorais circulantes (CTCs) únicos e grupos de CTCs constituídos com apenas CTCs ou com CTCs escoltados por células imunes, como neutrófilos e TEPs (plaquetas educadas por tumor).

Alguns estudos de coorte têm demonstrado que o ctDNA pode ser utilizado para o diagnóstico precoce de câncer de pulmão (estádio I ou II) e pode alcançar sensibilidade e especificidade relativamente altas¹¹. Mutações nos genes KRAS e TP53 podem ser detectadas em amostras armazenadas de escarro até um ano antes do diagnóstico de câncer¹². Em outro estudo prospectivo, mutações nestes mesmos genes foram detectadas no ctDNA de indivíduos saudáveis até dois anos antes do diagnóstico de câncer¹³. Além da detecção de mutações no DNA, a quantificação dos níveis de ctDNA¹⁴ e a da metilação de DNA⁷ podem ser combinadas para fornecer resultados robustos e consistentes.

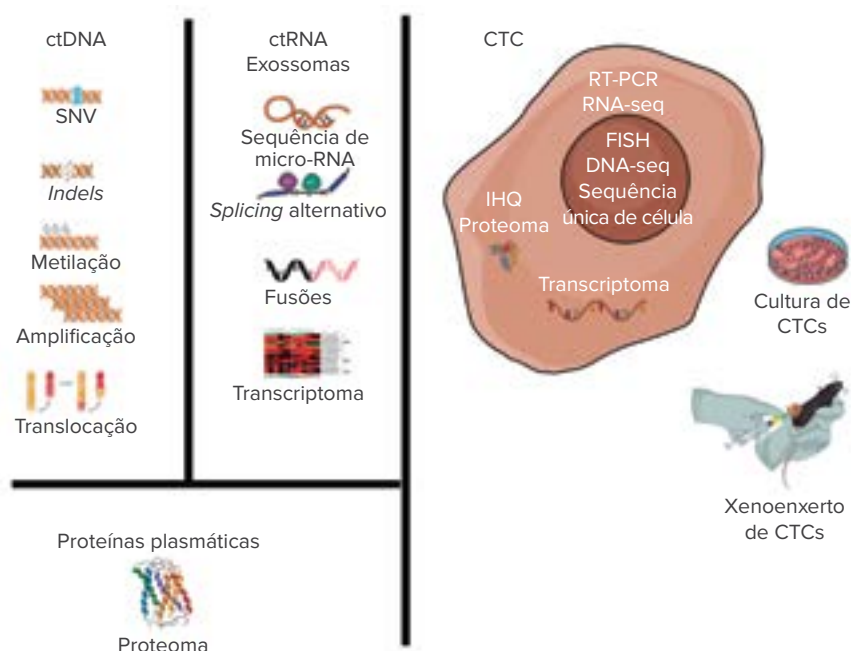
A detecção de metilação genética SEPT9 é o primeiro teste de triagem baseado em sangue aprovado pelo FDA para câncer colorretal (CRC)¹⁵ e apresentou maior sensibilidade e especificidade do que marcadores proteicos.

A meia-vida do ctDNA na circulação é entre 16 minutos e 2,5 horas¹⁶. É por isso que o ctDNA pode ser considerado um marcador “em tempo real” para refletir a evolução geral das lesões¹⁷. Isso permite o acompanhamento em tempo real e em longo prazo do efeito do tratamento, permitindo ajuste viável no tratamento e melhor prognóstico. Além disso, o ctDNA facilita o monitoramento dinâmico da evolução clonal e ajuda a identificar o surgimento de subclones resistentes¹⁸. Até agora, a EMA (Agência Europeia de Medicamentos) e o FDA aprovaram testes de mutação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) usando ctDNA para orientação terapêutica entre pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC)¹⁹. Além disso, algumas imunoterapias recém-aprovadas são conhecidas por produzir padrões diferentes de resposta ao tumor de outros tratamentos sistêmicos. Com isso, o uso da prática regular de monitoramento da eficácia terapêutica pode não ser mais apropriada, visto que o ctDNA mostrou-se um marcador precoce de eficácia terapêutica e poderia prever melhor os desfechos de sobrevida em pacientes tratados com inibidores dos pontos de controle imunológico para CPNPC²⁰.

A doença residual e o risco de recaída, mesmo quando o tratamento é bem-sucedido, ainda são ameaças significativas para muitos pacientes com câncer, sendo difícil detectar a doença precocemente utilizando exames de imagem ou a biópsia tecidual. Além disso, poucos marcadores eficazes e confiáveis estão disponíveis atualmente. Estudos recentes demonstraram que os ensaios de ctDNA foram capazes de detectar doenças residuais várias semanas antes da imagem radiológica²¹. Adicionalmente, o ctDNA positivo em pacientes apresentou maior risco de recaída e pior resultado (como menor sobrevida geral e menor sobrevida livre de doença) em comparação com o grupo ctDNA negativo⁶. Ademais, foi demonstrado que o perfil filogenético de ctDNA poderia ser usado para rastrear a natureza subclonal da recaída do câncer de pulmão e da metástase²².

As células tumorais circulantes (CTCs), consideradas como um componente da biópsia líquida, são células que escapam dos tumores sólidos primários e das metástases para a circulação sanguínea²³. As CTCs preservam a heterogeneidade tumoral primária e mimetizam propriedades tumorais, podendo ser consideradas como biomarcadores clínicos, pré-clínicos e alvos terapêuticos. Vários estudos foram realizados com CTCs para a análise da expressão gênica dos tumores e no sequenciamento genômico de uma única célula (*single cell genome sequencing*)¹² (figura 2).

Figura 2: Tecnologias para caracterização de ctDNA, ctRNA e CTCs



ctDNA e CTCs podem ser isolados simultaneamente da mesma amostra de sangue. ctDNA no plasma: a detecção quantitativa de ctDNA baseia-se na identificação de diversas variantes genéticas específicas do tumor ou marcas epigenéticas em amostras de DNA livre de células plasmáticas, principalmente através do sequenciamento de DNA por NGS. CTCs na fração celular: para discriminar CTCs das células imunes normais no sangue, é necessário o enriquecimento dos CTCs utilizando: (1) Propriedades biológicas: os CTCs podem ser selecionados positivamente *in vitro* ou *in vivo* usando anticorpos para proteínas epiteliais e/ou mesenquimais (como ePCAM e/ou citoqueratinas e vimentina mesenquimal ou N-caderina) ou selecionados negativamente através do esgotamento de leucócitos usando anticorpos anti-CD45. (2) Propriedades físicas: o enriquecimento positivo dos CTCs também pode ser realizado *in vitro* usando ensaios baseados nas características do CTC, incluindo tamanho, deformabilidade, densidade e carga elétrica. Detecção: após o enriquecimento, os CTCs isolados podem ser identificados usando ensaios imunológicos, moleculares ou funcionais. Imunocitologia: com plataformas imunocitológicas, os CTCs são identificados por coloração de membrana e/ou intracitoplasmática com anticorpos para marcadores epiteliais, mesenquimais, específicos do tecido ou tumores associados.

Veja esse conteúdo na íntegra
acessando a OC Academia:
<http://ocacademia.com>

