

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fármaco e Medicamentos)

Área Produção e Controle de Fármacos

Avaliação do DNA circulante na detecção de recorrência no câncer  
colorretal: revisão sistemática e meta-análise

Isadora Bernardo David de Oliveira

Tese para obtenção do título de  
Doutora em Ciências

Orientador: Profa. Dra. Valentina  
Porta.

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fármaco e Medicamentos)

Área Produção e Controle de Fármacos

Avaliação do DNA circulante na detecção de recorrência no câncer  
colorretal: revisão sistemática e meta-análise

Isadora Bernardo David de Oliveira

Versão Corrigida

Tese para obtenção do título de  
Doutora em Ciências

Orientador: Profa. Dra. Valentina  
Porta.

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

048a Oliveira, Isadora Bernardo David de  
Avaliação do DNA circulante na detecção de  
recorrência no câncer colorretal: revisão  
sistemática e meta-análise / Isadora Bernardo David  
de Oliveira. - São Paulo, 2023.  
104 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação  
em Fârmaco e Medicamentos.  
Orientador: Porta, Valentina

1. DNA circulante. 2. Câncer colorretal. 3.  
Revisão sistemática. 4. Meta-análise. 5. Acurácia.  
I. T. II. Porta, Valentina, orientador.

Isadora Bernardo David de Oliveira

Avaliação do DNA circulante na detecção de recorrência no câncer colorretal: revisão  
sistemática e meta-análise

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências

Profa. Dra. Valentina Porta

Orientadora/Presidente

---

1º. Examinador

---

2º. Examinador

---

3º. Examinador

---

4º. Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.

## RESUMO

OLIVEIRA, I. B. D. **Avaliação do DNA circulante na detecção de recorrência no câncer colorretal: revisão sistemática e meta-análise.** 2023. 104 p. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo), São Paulo, 2023.

O câncer colorretal (CCR) tem altas taxas de incidência e de mortalidade. Seu diagnóstico hoje se baseia em exames de imagem e na dosagem sérica do antígeno carcinoembriogênico (CEA). O último de baixa sensibilidade e especificidade na detecção de recorrências. Entre biomarcadores periféricos em estudo destaca-se o DNA circulante (cDNA). Aqui avaliamos a acurácia da quantificação do cDNA na detecção de recorrência em pacientes com CCR. Uma revisão sistemática foi conduzida com estudos publicados até janeiro de 2022. Dados foram coletados permitindo agregar a sensibilidade (S), especificidade (E) e razão de chances diagnósticas (DOR), assim como apresentar uma curva ROC sumária (sROC) para os estudos incluídos. Foram incluídos 127 estudos para a etapa qualitativa que mostraram dois principais biomarcadores de cDNA: a quantificação total de DNA (cfDNA) e a quantificação de mutações alvo (ctDNA). Desses, 59 foram incluídos na meta-análise e apresentaram  $S = 62,7\%$  (IC95% 54,9 – 69,8),  $E = 81,6\%$  (IC95% 75,1 – 86,7) e  $DOR = 7,427$  (IC95% 5,052 – 10,917). A melhor performance diagnóstica foi encontrada no subgrupo de estudos ctDNA, que incluíram pacientes não metastáticos  $S = 69,1\%$  (IC95% 52,9 – 81,7),  $E = 88,1\%$  (IC95% 81,4 – 97,7) e  $DOR = 16,63$  (IC95% 8,557 – 32,319). Biomarcadores, que quantificam mutações relacionadas a doença (e.g KRAS, BRAF, PIK3CA), demonstram um melhor poder na identificação de recorrências. Apesar da performance aceitável do cDNA, a partir das evidências disponíveis, não foi possível demonstrar uma performance diagnóstica melhor ou comparável àquela da dosagem do CEA ( $> 5\mu\text{g/ml}$ ) na detecção de recorrência do câncer colorretal.

Palavras-chave: DNA circulante, câncer colorretal, sensibilidade, especificidade, meta-análise, revisão sistemática.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, I. B. D. **Assessment of circulating DNA in the diagnosis of recurrence in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis.** 2023. 104 p. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo), São Paulo, 2023.

Colorectal cancer (CRC) has high incidence and mortality rates. Its diagnosis is currently based on imaging tests and serum levels of carcinoembryogenic antigen (CEA). The latter of low sensitivity and specificity in detecting recurrences. Among the peripheral biomarkers being studied, circulating DNA (cDNA) stands out. Here we evaluated the accuracy of cDNA quantification in detecting recurrence in patients with CRC. A systematic review was conducted with studies published up to January 2022. Data were collected, allowing the aggregation of sensitivity (S), specificity (E) and diagnostic odds ratio (DOR), as well as presenting a summary ROC curve (sROC) for the studies included. 127 studies were included for the qualitative stage that showed two main cDNA biomarkers: total DNA quantification (cfDNA) and quantification of target mutations (ctDNA). Of these, 59 were included in the meta-analysis and presented  $S = 62.7\%$  (95%CI 54.9 – 69.8),  $E = 81.6\%$  (95%CI 75.1 – 86.7) and  $DOR = 7.427$  (95%CI 5.052 - 10.917). The best diagnostic performance was found in the subgroup of ctDNA studies that included non-metastatic patients'  $S = 69.1\%$  (95%CI 52.9 – 81.7),  $E = 88.1\%$  (95%CI 81.4 – 97.7) and  $DOR = 16.63$  (95%CI 8.557 – 32.319). Biomarkers that quantify disease-related mutations (e.g. KRAS, BRAF, PIK3CA) demonstrate better power in identifying recurrences. Despite the acceptable performance of the cDNA, based on the available evidence, it was not possible to demonstrate a better or comparable diagnostic performance to that of the CEA dosage ( $> 5\mu\text{g/ml}$ ) in the detection of CRC recurrence.

Keywords: circulating DNA, colorectal cancer, sensitivity, specificity, meta-analysis, systematic review.

*À minha mãe com amor, admiração e gratidão por sua presença, exemplo e apoio ao longo da minha trajetória acadêmica.*

*Ao meu esposo com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.*

*Ao meu filho com muito amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Valentina, pela orientação que, nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À Profa. Dra. Patrícia Aguiar, Profa. Dra. Daniela Melo e Profa. Dra. Rosário Hirata, pela atenção e apoio durante o processo de definição do projeto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado em Fármacos e Medicamentos.

À equipe de pesquisa sem a qual a execução e publicação deste projeto não seria possível.

Aos times de handebol universitário dos quais participei que muito contribuíram na motivação e manutenção da saúde física e mental ao longo do período de trabalho.

À Associação Atlética Acadêmica de Farmácia e Bioquímica e à Liga Atlética Acadêmica da Universidade de São Paulo pelo incansável trabalho no incentivo ao esporte universitário.



*“A história de todas as grandes civilizações galácticas tende a atravessar três fases distintas e identificáveis – as da sobrevivência, da interrogação e da sofisticação, também conhecidas como as fases do como, do por quê e do onde. Por exemplo, a primeira fase é conhecida pela pergunta: “Como vamos poder comer?” A segunda, pela pergunta: “Porque comemos?” E a terceira, pela pergunta: “Onde vamos almoçar?””*

Douglas Adams

*In: O Restaurante no Fim do Universo*

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	13
1.2 OBJETIVOS .....	18
<b>CAPÍTULO II: REVISÃO SISTEMÁTICA.....</b>	<b>18</b>
2.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
2.1.1 Registro no PROSPERO.....	19
2.1.2 Busca de artigos .....	19
2.1.2.1 Pergunta da pesquisa.....	19
2.1.2.2 Estratégia de busca .....	20
2.1.2.3 Bases de dados .....	20
2.1.3 Seleção dos estudos e critérios de elegibilidade .....	20
2.1.4 Extração de dados .....	22
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
2.2.1 Registro no PROSPERO.....	22
2.2.2 Busca de artigos e seleção dos estudos.....	23
2.2.3 Análise qualitativa dos dados extraídos.....	25
2.2.3.1 Metodologia do estudo clínico.....	25
2.2.3.2 Estadiamento do CCR.....	26
2.2.3.3 Características socio-demográficas da população (idade, sexo, histórico médico, comorbidades).....	26
2.2.3.4 Tamanho amostral do estudo; o número de pacientes submetidos ao teste índice .....	26
2.2.3.5 Tratamentos e cuidados aos pacientes durante o seguimento.....	27
2.2.3.6 Tempo de seguimento .....	27
2.2.3.7 Unidade de medida do biomarcador .....	27
2.2.3.8 Teste referência e seus métodos; .....	28

2.2.3.9 Aspectos técnicos da realização do teste índice (método analítico); .....	29
2.2.3.10 Desfechos.....	30
2.2.3.11 Perda de dados e presença de viés .....	31
<b>CAPÍTULO III: META-ANÁLISE .....</b>	<b>31</b>
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1.1 Critérios de elegibilidade, seleção dos estudos e extração dos dados	31
3.1.2 Testes estatísticos.....	33
3.1.3 Avaliação da qualidade metodológica .....	37
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.2.1 Seleção dos estudos e extração dos dados .....	38
3.2.2 Testes estatísticos.....	39
3.2.2.1 Estatística .....	39
3.2.2.2 Curva sROC .....	40
3.2.2.3 Análise de subgrupos .....	41
3.2.2.4 Análise de sensibilidade .....	42
3.2.2.5 Estatística para o grupo cfDNA .....	43
3.2.2.6 Curva sROC para o grupo cfDNA.....	44
3.2.2.7 Análise de subgrupos para o grupo cfDNA.....	44
3.2.2.8 Análise de sensibilidade para o grupo cfDNA.....	45
3.2.2.9 Estatística: Análise do <i>threshold effect</i> (efeito do ponto de corte, tradução livre) em cfDNA .....	45
3.2.2.10 Curva sROC: Análise do <i>threshold effect</i> (efeito do ponto de corte, tradução livre) em cfDNA .....	46
3.2.2.11 Estatística para o grupo ctDNA .....	47
3.2.2.12 Curva sROC para o grupo ctDNA.....	48
3.2.2.13 Análise de subgrupos para o grupo ctDNA .....	49
3.2.2.14 Análise de sensibilidade ctDNA .....	50

3.2.3 Avaliação da qualidade metodológica .....	50
<b>CAPÍTULO IV: CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO III .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO IV .....</b>	<b>101</b>

## CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

### 1.1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer com maior número de mortes: 935 mil mortes no mundo em 2020. No Brasil, estima-se que ocorram 55.102 novos casos por ano (27.346 homens e 27.756 mulheres), sendo que 26.170 desses casos resultam em morte (13.142 homens e 13.028 mulheres) (SUNG *et al.*, 2021).

Alguns sinais e sintomas podem indicar o aparecimento do CCR, tais como (INCA, 2021):

- a) anemia de origem indeterminada;
- b) suspeita de perda crônica de sangue;
- c) mudança no hábito intestinal (diarreia ou prisão de ventre);
- d) desconforto abdominal com gases ou cólicas;
- e) sangramento nas fezes;
- f) sangramento anal;
- g) sensação de que o intestino não se esvaziou após a evacuação.

Entretanto, a evolução do CCR é lenta ao longo dos anos, o que dificulta o seu diagnóstico precoce.

No Brasil, o diagnóstico de câncer colorretal é estabelecido pelo exame histopatológico de espécime tumoral (biopsia), obtido através da colonoscopia ou do exame de peça cirúrgica, situações em que o tumor sólido pode ser detectado. A colonoscopia é o método preferencial de diagnóstico, pois permite o exame de todo o intestino grosso e a remoção ou biopsia de pólipos que possam estar localizados fora da área de ressecção da lesão principal. A investigação de possíveis metástases intra-abdominais e pélvicas deve ser feita alternativamente por meio de exame ultrassonográfico, tomografia computadorizada ou ressonância magnética, a critério médico (SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2014b).

O sistema de classificação mais comum do CCR é o sistema TNM (INCA., 2023), que leva em consideração três fatores principais: tamanho do tumor primário (T), comprometimento dos linfonodos (N) e a presença de metástases (M). Quando as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas, ficam distribuídas em estádios que variam de I a IV, conforme definições:

- a) estágio 0 (carcinoma *in situ*): O câncer está presente apenas na camada mais interna do revestimento do cólon ou reto e não se espalhou para as camadas mais profundas do órgão ou para outras partes do corpo;
- b) estágio I: O câncer cresceu através da camada mais interna do revestimento do cólon ou reto e invadiu a camada muscular, mas ainda não se espalhou para os linfonodos ou para outras partes do corpo;
- c) estágio II: O câncer cresceu através da parede do cólon ou reto, invadindo as camadas mais profundas e pode ter se espalhado para os linfonodos próximos, mas não se espalhou para outras partes do corpo;
- d) estágio III: O câncer se espalhou para os linfonodos próximos, mas ainda não se espalhou para outras partes do corpo;
- e) estágio IV: O câncer se espalhou para outras partes do corpo, como fígado, pulmões, peritônio (a membrana que reveste os órgãos abdominais) ou outros órgãos distantes.

Além do sistema TNM, também pode haver variações na classificação do câncer colorretal em alguns sistemas de classificação, como o Dukes, que divide em três estágios (A, B e C), ou a classificação de Astler-Coller, que divide em quatro estágios (A, B1, B2 e C) (SARMA, 1986).

Entretanto, tumores sólidos detectados clinicamente já completaram a maior parte de seu ciclo de vida. Essa é uma das grandes dificuldades na detecção e tratamento precoce do CCR, justificando o acompanhamento constante dos pacientes para evitar uma nova progressão após tratamento primário, além da busca por marcadores periféricos, que viabilizem a abordagem precoce da doença e de eventuais recorrências (BURRELL *et al.*, 2013).

Segundo diretrizes do Ministério da Saúde (SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2014b), o objetivo do seguimento dos pacientes com câncer colorretal é diagnosticar precocemente a recorrência, as lesões pré-malignas ou uma segunda neoplasia colorretal. Portanto, recomendam-se:

- a) consultas médicas regulares, a cada 3-6 meses, nos primeiros três anos após o tratamento; e, a cada 6 meses até o quinto ano;
- b) dosagem sérica do CEA (antígeno carcinoembriogênico) a cada três meses, nos primeiros três anos após o término do tratamento, para pacientes tratados nos estágios II ou III;
- c) tomografia computadorizada do tórax e do abdomen, anualmente, nos primeiros três anos; e, tomografia da pelve para pacientes que não receberam radioterapia;

- d) colonoscopia, a se realizar pelo menos um ano após a cirurgia; se normal, repetir a intervalos de 5 anos; se anormal, repetir em um ano. Doentes com maior risco para síndromes hereditárias associadas ao câncer colorretal necessitam periodicidade mais frequente deste exame;
- e) retossigmoidoscopia flexível, anualmente, por cinco anos, indicada para doentes com câncer de reto no estágio II e III; ou, semestralmente por cinco anos para pacientes que não receberam irradiação pélvica.

O estudo molecular da biopsia é considerado essencial para complementar o diagnóstico, avaliar a fase da progressão e a gravidade do CCR, e pode identificar mutações em oncogenes de interesse relacionadas com prognóstico. Adicionalmente, achados científicos atuais demonstram o valor prognóstico de alguns biomarcadores moleculares, tais como a dosagem sérica do CEA, atualmente preconizada nas diretrizes de acompanhamento terapêutico do CCR.

O CEA é uma glicoproteína de alto peso molecular pertencente à superfamília de moléculas de imunoglobulina e está envolvida em alguns processos biológicos incluindo a adesão celular, a imunidade e a apoptose. Devido ao seu envolvimento na adesão homofílica e heterofílica, o CEA foi relacionado à metástase no câncer (NICHOLSON *et al.*, 2015).

Segundo o Serviço Nacional de Saúde do Reino Unido (NHS, 2010), o CEA pode ser solicitado:

- a) no pré-operatório, em pacientes com carcinoma colorretal conhecido ou com adenocarcinoma de origem desconhecida;
- b) imediatamente no pré-operatório, em pacientes com massa abdominal não identificada;
- c) no monitoramento pós-operatório, para detecção precoce de recorrência (em pacientes com resultado positivo pré-operatório):
  - recorrência oculta em pacientes sintomáticos sem evidência radiológica ou endoscópica;
  - monitoramento da resposta à terapia paliativa.

O CEA é utilizado em conjunto com outras ferramentas diagnósticas para a detecção de recorrência. Uma revisão sistemática com meta-análise Cochrane teve como objetivo avaliar a dosagem de CEA para detecção de recorrência no CCR. De acordo com a conclusão dos autores:

O CEA não é suficientemente sensível para ser usado isoladamente, mesmo com um baixo limiar. É, portanto, essencial o aumento do

monitoramento por CEA com outra modalidade diagnóstica com o intuito de evitar a perda de casos. Tentar melhorar a sensibilidade adotando um limiar mais baixo é uma estratégia ruim devido ao aumento de alarmes falsos gerados. Nós recomendamos, portanto, o monitoramento de recorrência para o câncer colorretal com mais de uma modalidade diagnóstica, mas aplicando o maior ponto de corte de CEA avaliado (10 µg/L). ((NICHOLSON *et al.*, 2015), tradução nossa).

O uso do limiar de 10 µg/L para CEA prevê uma sensibilidade de 68% e especificidade de 97% (NICHOLSON *et al.*, 2015). Para esta aplicação clínica, a especificidade tem maior benefício clínico sobre a sensibilidade, pois evitar falsos resultados positivos no caso do acompanhamento do paciente com CCR significa um menor custo ao sistema de saúde e menor impacto na qualidade de vida do paciente. Falsos positivos, geram a necessidade de exames complementares complexos e invasivos como colonoscopia e tomografia.

Em contrapartida, o DNA circulante (cDNA) e outros ácidos nucleicos circulantes vêm sendo amplamente avaliados como potenciais biomarcadores de diversas patologias, por serem uma alternativa minimamente invasiva para o acompanhamento terapêutico. O primeiro teste de cDNA aprovado pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) visa à detecção de mutações de sensibilização e resistência a EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) em câncer de pulmão de células não escamosas (KOMATSUBARA; SACHER, 2017). O caso do câncer de pulmão, em que 20% dos pacientes têm impedimento para a biopsia do tecido, estimula a discussão sobre a implementação do cDNA como um teste diagnóstico de rotina (BERNABÉ *et al.*, 2017).

O cDNA é, predominantemente, de origem endógena e apresenta-se *in vivo* envolvido por complexos com lipídeos e proteínas ou por membranas, que o protegem da degradação por nucleases ou do reconhecimento pelo sistema imune.

O cDNA pode ser gerado por morte celular (apoptose ou necrose), liberação por macrófagos, seguindo o processo de absorção de células rompidas, e liberação direta por células viáveis, na forma de virtossomos constituídos por DNA com lipoproteínas e DNA polimerases DNA-dependente (RYKOVA *et al.*, 2012). Em indivíduos saudáveis, o cDNA está presente em concentrações estáveis e baixas (1-27 ng/ml) e é imunologicamente inativo. Pacientes com câncer e outras doenças nas quais há aumento da taxa de morte celular apresentam concentrações aumentadas de cDNA (RYKOVA *et al.*, 2012).

No câncer, a liberação de ácidos nucleicos na corrente sanguínea está relacionada a processos apoptóticos e necróticos das células cancerígenas no microambiente tumoral. A



secreção ativa por estas células também é uma fonte potencial de cDNA tumoral. Considerando que massas tumorais possuem uma heterogeneidade genômica, durante a progressão tumoral são encontrados concomitantemente na circulação tanto o cDNA derivado de células tumorais tipo selvagem, quanto do tipo mutadas (SCHWARZENBACH; HOON; PANTEL, 2011).

No processo de extração do cDNA é importante diferenciar o DNA livre de células do DNA celular. A contaminação com o último pode diminuir a sensibilidade de algumas metodologias analíticas e poluir resultados quantitativos. Considerando a amostra biológica, o processo de coagulação para obtenção do soro pode causar lise celular, expondo DNA celular no soro que não se relaciona com o DNA circulante. Dessa forma, é indicado que metodologias analíticas para quantificar o DNA circulante utilizem plasma como amostra biológica, o que evita a contaminação por DNA celular (EL MESSAOUDI *et al.*, 2013).

A contribuição de cDNA no acompanhamento de vários tipos de câncer, inclusive CCR, é continuamente avaliada por meio de estudos clínicos randomizados (LECOMTE *et al.*, 2010). Nestes, utilizam-se uma variedade de modelos experimentais, materiais biológicos e métodos analíticos o que, por muito tempo, dificultou o agrupamento desses estudos para uma análise mais robusta, como uma revisão sistemática com meta-análise (SCHWARZENBACH; HOON; PANTEL, 2011).

O prognóstico de pacientes com câncer colorretal se beneficia tanto da quantificação de cDNA, quanto pelo seu uso na identificação de oncogenes. Este benefício não foi identificado para o diagnóstico da doença. A análise dos resultados preditivos de sobrevida e sobrevida sem progressão da doença após CCR indica que o uso do cDNA no prognóstico é promissor (OLIVEIRA; HIRATA, 2018).

Em Basnet *et al* (2016) uma revisão sistemática com meta-análise foi conduzida visando esclarecer o significado prognóstico do cDNA em pacientes com CCR. Foram incluídos nove estudos clínicos, totalizando 1022 pacientes. Os autores concluíram que o cDNA é um bom biomarcador para sobrevida livre de doença e sobrevida geral em pacientes com CCR. Dentre as limitações do estudo, os autores indicaram alguns fatores de confusão que provavelmente levaram a inconsistências entre os estudos clínicos incluídos na meta-análise, como métodos, tipo de marcador e estágio tumoral (BASNET *et al.*, 2016). Apesar das limitações do estudo, o número de evidências clínicas acerca do uso do cDNA cresce a cada ano, possibilitando análises de sensibilidade para avaliar o impacto dos fatores de confusão apresentados por este estudo, aumentando assim o valor da evidência científica.

Ainda, uma revisão sistemática com meta-análise englobando apenas pacientes com CCR metastático agrupou 10 estudos clínicos abrangendo 1076 pacientes. Os resultados desta

publicação mostraram uma sobrevida favorável para o grupo de pacientes com valores de cDNA abaixo da mediana (razão de risco = 2,39 IC 95% 2,03-2,82,  $p < 0,0001$ ) (SPINDLER *et al.*, 2017).

Atualmente, existem necessidades não atendidas no acompanhamento do câncer colorretal. Os exames são invasivos e não compreendem a totalidade de biomarcadores relevantes ou não fornecem sensibilidade e especificidade ideais. A quantificação do cDNA possui correlação com a sobrevida de pacientes com CCR de maneira semelhante àquela dos biomarcadores utilizados hoje no acompanhamento terapêutico. Entretanto, revisões sistemáticas anteriores não avaliaram a acurácia deste biomarcador, comumente apresentada com as variáveis diagnósticas de sensibilidade e especificidade. Portanto, o biomarcador cDNA que se refere apenas a quantificação do DNA presente na circulação, total ou mutado, será objeto da presente pesquisa que tem como o objetivo determinar a acurácia do cDNA na detecção de recorrência no acompanhamento terapêutico de pacientes com CCR.

## **1.2 OBJETIVOS**

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a precisão apresentada pelo biomarcador DNA circulante na detecção de recorrência de doença em pacientes com câncer colorretal em comparação à de outros biomarcadores empregados atualmente.

## **CAPÍTULO II: REVISÃO SISTEMÁTICA**

### **2.1 MATERIAL E MÉTODOS**

A revisão sistemática foi construída conforme a metodologia de relato PRISMA (Figura 1) para a elaboração de revisões sistemáticas e meta-análise, publicada em 2009 (MOHER *et al.*, 2009b), de forma a garantir seleção homogênea e padronizada dos estudos incluídos, evitando-se viés.

A seleção dos estudos e extração de dados foi feita de maneira independente por dois revisores. Foi calculado o coeficiente *kappa* de concordância entre os revisores para as etapas de seleção. Nos casos de divergências, os revisores foram capazes de chegar a um comum acordo. Dessa forma, um terceiro revisor para auxiliar no processo de divergências não foi necessário na presente revisão.

Dentre as ferramentas disponíveis para revisores em projetos de revisão sistemática e conforme orientação de colegas pesquisadores e outros projetos semelhantes na instituição, o *software* Rayyan® (OUZZANI; HAMMADY; FEDOROWICZ, 2016) foi escolhido e utilizado pelos revisores durante todas as etapas de seleção e inclusão (Figura 1).

### **2.1.1 Registro no PROSPERO**

Em consulta a literatura e a base de registros de revisões em andamento (PROSPERO), não foram encontradas revisões sistemáticas que avaliam a acurácia do cDNA na detecção de recorrência em pacientes com CCR. Trabalhos similares estudaram o uso do cDNA para diagnóstico inicial de CCR avaliando sua integridade, metilação e presença de mutações (PETIT *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018).

Conforme diretrizes científicas, a pesquisa foi registrada na base PROSPERO e atualizada conforme a progressão das etapas da pesquisa, permitindo visibilidade a outros grupos de pesquisa.

### **2.1.2 Busca de artigos**

#### **2.1.2.1 Pergunta da pesquisa**

A pergunta da pesquisa foi elaborada segundo o formato PIRO (**P**opulação, **T**este **Í**ndice, **T**este **R**referência e **D**esfecho (ou *Outcome*), comumente utilizado para revisões sistemáticas de métodos diagnósticos (SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2014a), onde:

- a) população: Pacientes com diagnóstico de CCR indicados para acompanhamento terapêutico após terapia primária (cirúrgica e/ou quimioterapia e radioterapia);
- b) teste Índice: Quantificação do cDNA;
- c) teste Referência: Conforme guias de prática clínica, não existe um único teste referência, padrão-ouro, para detecção de recorrências nesses pacientes. Dessa forma, este critério não foi adicionado na estratégia de busca, permitindo máxima captura de dados;
- d) desfecho (*Outcome*): Acurácia (sensibilidade e especificidade) na detecção de recorrência de doença primária ou metástase.

Segundo definições acima, a pergunta da presente revisão sistemática foi definida como:

“Qual a precisão do cDNA na detecção de recorrência de doença primária ou metástase em pacientes indicados para acompanhamento terapêutico, após terapia primária para câncer colorretal?”.

### 2.1.2.2 Estratégia de busca

Existe uma grande heterogeneidade nas nomenclaturas para o cDNA, nos desenhos dos estudos, e ainda, um baixo número de publicações quando comparado ao número de publicações de estudos de intervenção para a mesma patologia (OLIVEIRA; HIRATA, 2018). Adicionalmente o acompanhamento terapêutico é feito através de mais de uma modalidade diagnóstica (exames de imagem e laboratoriais). Dessa forma, a estratégia de busca utilizada e apresentada de forma detalhada no ANEXO I foi construída para garantir maior sensibilidade na captura de artigos sem prejudicar a carga de trabalho e o cronograma do projeto (HIGGINS *et al.*, 2011).

### 2.1.2.3 Bases de dados

A busca inicial de trabalhos publicados visa encontrar as principais publicações nacionais e internacionais relacionadas à pergunta da pesquisa. Foram utilizadas as bases de dados PubMed, Embase, Web of Science. Foram incluídas também as bases de dados Lilacs e Scielo para maior captura de dados da América Latina. Os temas da pesquisa, assim como o tamanho do grupo de pesquisa, limitam a possibilidade de uso da literatura cinzenta. Dessa forma, esta não foi explorada na presente pesquisa.

Inicialmente, foram selecionados artigos publicados até dezembro de 2019. Uma etapa de repescagem dos artigos publicados nos anos de 2020 e 2021 foi conduzida no primeiro semestre de 2022.

A retirada das duplicatas seguiu as etapas estabelecidas por Bramer *et al.* (2016), utilizando o *software* gerenciador de bibliografias EndNote (BRAMER *et al.*, 2016).

### 2.1.3 Seleção dos estudos e critérios de elegibilidade

Os critérios apresentados abaixo foram aplicados tanto na etapa de seleção com a leitura do título e resumo, quanto na etapa de inclusão com a leitura do texto completo. Sendo critérios de inclusão:

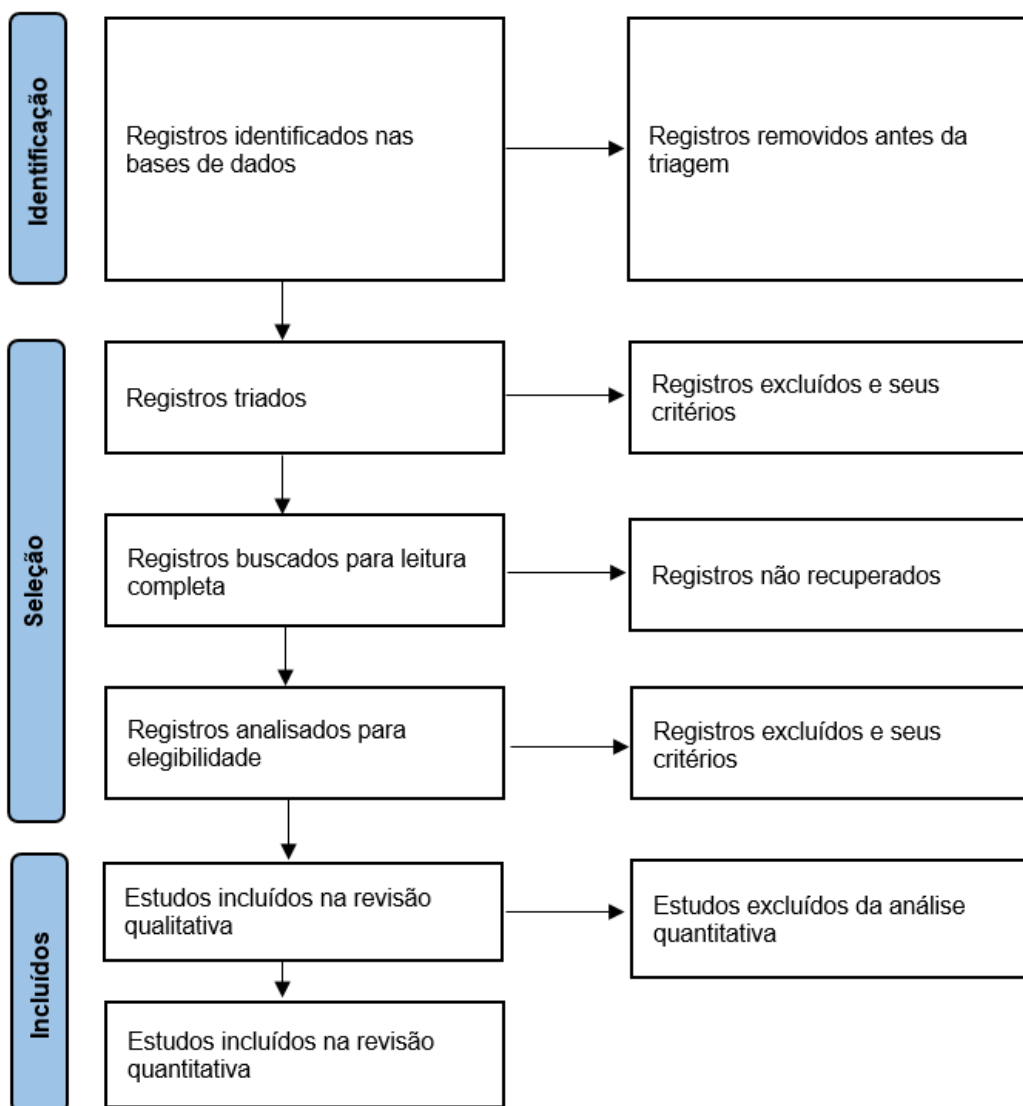
- a) artigos em que o material biológico para análise de cDNA foi o plasma;
- b) artigos em que houve quantificação de cDNA em pacientes diagnosticados com câncer colorretal, em todos os estágios da doença;
- c) artigos que incluem descrição do método de extração do DNA da amostra biológica;
- d) artigos que incluem descrição do método de quantificação do cDNA;
- e) artigos em que o tempo de seguimento dos pacientes é determinado;

- f) artigos publicados em inglês, português ou espanhol.
- g) artigos sem característica de revisão ou revisão sistemática, incluindo ou não meta-análise.

E critérios de exclusão:

- a) impossibilidade de coletar informações mínimas para a avaliação qualitativa dos textos publicados, materiais suplementares e contato com os autores.

Figura 1 - Fluxograma da seleção dos estudos conforme a diretriz de reporte PRISMA.



Fonte: adaptado de MOHER *et al.*, (2009a).

O formulário de seleção dos estudos, presente no ANEXO II foi elaborado para auxiliar e padronizar o processo de seleção dos estudos entre os revisores. Uma planilha foi elaborada e utilizada pelos revisores para facilitar a visualização da avaliação dos artigos nas etapas de

seleção, com a leitura do título e do resumo dos trabalhos, e, na inclusão, com a leitura completa dos artigos, em que cada pergunta dos formulários do ANEXO II está representada em uma coluna da planilha.

#### **2.1.4 Extração de dados**

Foram coletados os seguintes dados:

- a) a metodologia do estudo clínico;
- b) o estadiamento do CCR;
- c) as características sociodemográficas da população (idade, sexo, histórico médico, comorbidades);
- d) o tamanho amostral do estudo;
- e) os tratamentos e cuidados aos pacientes durante o seguimento;
- f) o número de pacientes submetidos ao teste índice;
- g) o tempo de seguimento;
- h) a unidade de medida do biomarcador;
- i) o teste referência do estudo e seus métodos;
- j) os aspectos técnicos da realização do teste índice (método analítico);
- k) os desfechos;
- l) a perda de dados;
- m) a presença de viés (ex.: influência na escolha do teste);
- n) o tipo e o valor do ponto de corte.

Quando foram necessários dados mais específicos ou dados não apresentados nos artigos, os autores dos manuscritos foram contatados. Infelizmente, não obtivemos retornos nestes casos e não foi possível obter as informações necessárias desses estudos. Quando as informações eram essenciais nas análises propostas, o estudo foi excluído da revisão sistemática.

## **2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.2.1 Registro no PROSPERO**

O registro da presente revisão foi aprovado e publicado em dezembro de 2019 na base de dados PROSPERO (“PROSPERO”, 2019), sob o identificador CRD42019121899. Conforme recomendações, que pretendem evitar revisões duplicadas sobre o mesmo tema (MOHER; BOOTH; STEWART, 2014), a seleção dos estudos e a extração de dados foram conduzidas, após data de publicação deste protocolo, na base de dados britânica PROSPERO.

Um artigo de revisão acerca dos registros da base PROSPERO identificou, a partir de 195 registros, uma taxa média de rendimento de 3% entre os registros encontrados nas bases de dados e os artigos incluídos, onde 76% dos estudos indicados para a leitura completa do texto não são incluídos nas análises quantitativas e qualitativas (BORAH *et al.*, 2017). Ainda, tais revisões levaram em média 67 semanas para serem publicadas, a contar da data do registro. Essas informações variam bastante conforme o tema da pesquisa e o número de revisores. Os resultados desta publicação aplicados a presente pesquisa estimam que aproximadamente 300 artigos seriam encaminhados para a leitura completa e destes aproximadamente 70 artigos seriam incluídos nas análises.

### **2.2.2 Busca de artigos e seleção dos estudos**

Estão apresentados a seguir os dados compilados da etapa inicial de busca e da etapa de repescagem.

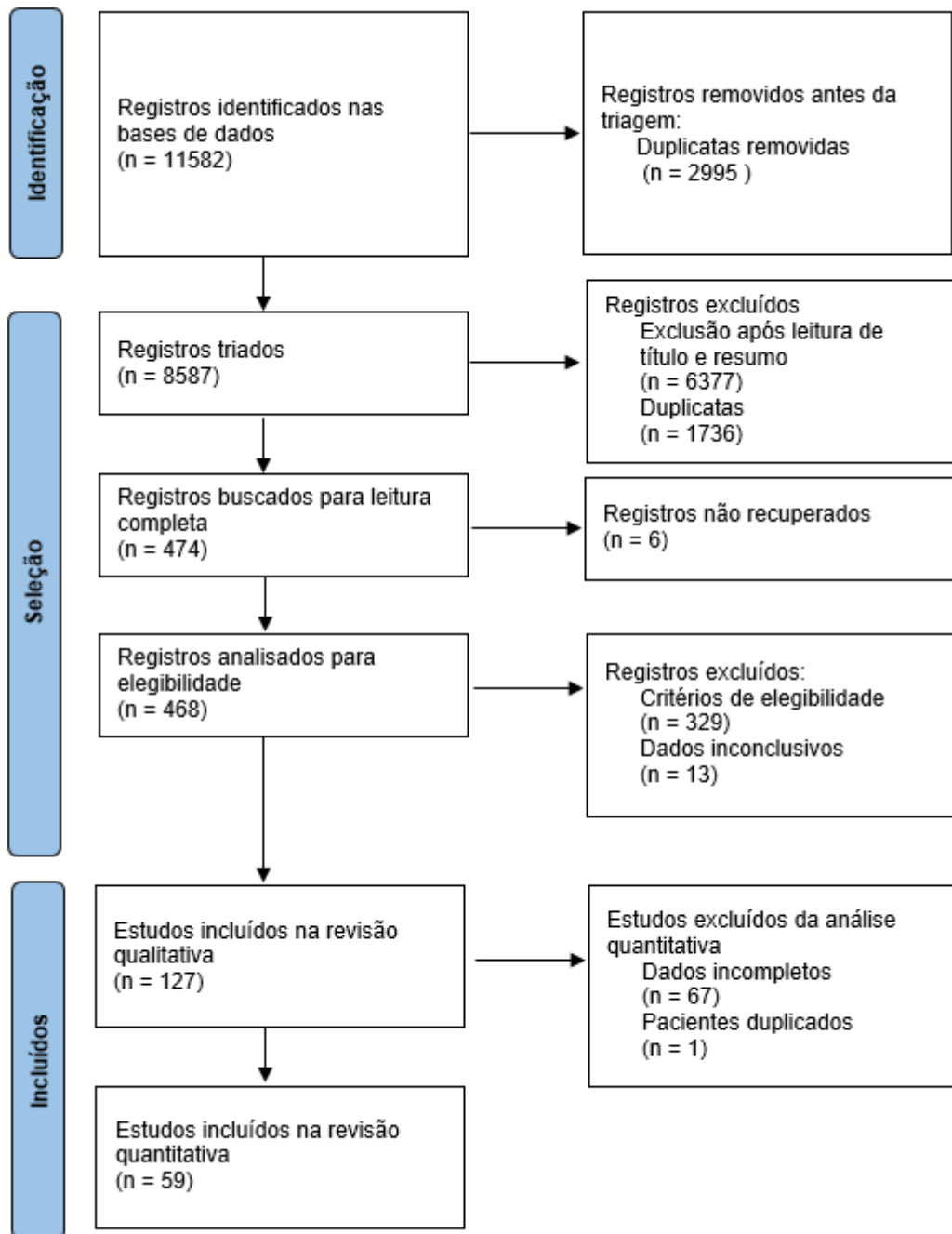
Utilizando os critérios de busca do ANEXO I, foram identificados 11582 registros nas bases de dados. Antes da triagem, foram excluídos 2995 registros duplicados. Os 8587 registros restantes foram triados na plataforma RAYYAN.

Conforme critérios de elegibilidade, 6377 registros não foram selecionados para leitura completa do texto e 1736 duplicatas adicionais foram encontradas. Em seis registros dos 474 selecionados, não foi possível a obtenção do texto completo para leitura, restando 468 para etapa de inclusão.

A seguir, conforme critérios de elegibilidade, 329 não foram incluídos e 13 foram excluídos por falta de dados relevantes a pesquisa. Por fim, 127 estudos foram incluídos nesta revisão sistemática, um alto número quando comparado a outras revisões sistemáticas no mesmo tema. Estes números finais são compatíveis com a média encontrada por Borah *et al.* discutido anteriormente.

Durante a resolução de conflitos da etapa de seleção, o acordo entre os revisores aconteceu visando preservar aqueles registros onde havia algum indício da confirmação de inclusão no texto completo, favorecendo a exclusão de artigos com palavras-chave e expressões que indicavam a não confirmação dos critérios. Por exemplo, artigos em que o objetivo principal era a detecção de mutações, sem indicativos de outros objetivos ou medidas com o DNA circulante, foram excluídos. Em contrapartida, artigos que poderiam conter a quantificação de DNA circulante, a partir da interpretação dos desfechos, foram incluídos.

Figura 2 - Fluxograma de seleção dos estudos incluídos, totalizando todas as etapas da revisão.



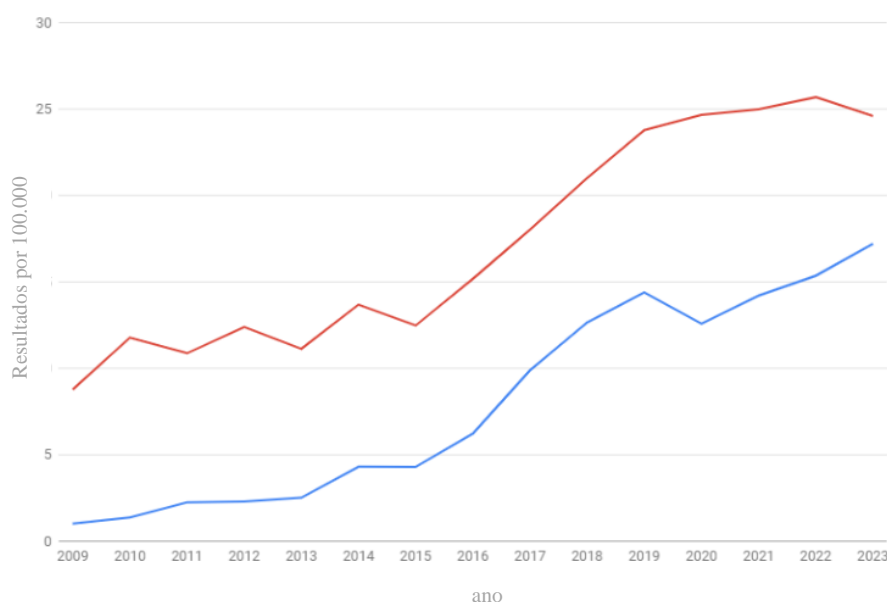
Fonte: do autor baseado em MOHER *et al.*, (2009a)

A concordância entre revisores foi moderada com um coeficiente de *kappa* calculado de 0.58 e um taxa de concordância de 96,1% (PAES, 2008). O coeficiente kappa encontrado para a etapa de seleção foi moderado. Antes da leitura completa do texto, foram selecionados registros em que a confirmação de um critério de inclusão não estava diretamente expressa no título ou no *abstract*, sob o critério “indeterminado” (ANEXO II), o que impacta diretamente a divergência das decisões dos revisores.



A etapa de repescagem proposta teve como objetivo manter a publicação do trabalho atualizada na literatura. Ao comparar o número de publicações que foram incluídas nesta revisão no período referente a repescagem (n=59, período 2020-2021) e o número de publicações incluídas anteriormente (n=81, período 1975-2019), percebe-se um claro aumento da relevância do tema nos últimos anos. É possível notar essa tendência do tema da pesquisa na Figura 3. O aumento da relevância do tema nos últimos anos pode se justificar pela crescente incidência de CCR assim como a redução nos custos das análises metodológicas utilizadas nestas pesquisas.

Figura 3 - Resultados da busca do tema da pesquisa no PubMed em citações em 100.000 por ano



Fonte: SPERR, (2023) PubMed by Year. Disponível em: <https://esperr.github.io/pubmed-by-year/>. Acesso em 19/04/2023. Resultados por 100.000 citações no pubmed segundo estratégia de busca do ANEXO I (vermelho) e busca simples dos termos para cDNA e CCR (azul).

### 2.2.3 Análise qualitativa dos dados extraídos

Os dados completos extraídos para revisão qualitativa foram organizados e agrupados em 8 tabelas distintas para melhor visualização e interpretação dos dados, e podem ser encontrados no ANEXO III. A seguir, expõe-se um resumo dos achados qualitativos e evidencia-se o número de estudos, onde as informações não estavam disponíveis.

#### 2.2.3.1 Metodologia do estudo clínico

Foram encontrados 113 estudos prospectivos e 14 retrospectivos. O baixo número de estudos retrospectivos se justifica pelo seu importante viés em estudos diagnósticos, onde o

conhecimento do resultado do desfecho antes do resultado do teste e vice-versa pode enviesar as decisões da pesquisa em relação ao ponto de corte, por exemplo. Observando o biomarcador cDNA, no qual o material genético pode ser conservado por longos períodos de tempo, existe a possibilidade da dosagem do biomarcador quantitativo em qualquer momento futuro, podendo, portanto, o avaliador do biomarcador ter conhecimento do desfecho clínico do paciente no momento da análise. Em desenhos prospectivos, os riscos de viés relacionados ao cegamento dos examinadores e tempo de coleta dos testes índice e referência é menor.

Quanto a origem dos grupos de pesquisa, 70 (55%) eram estudos europeus, 38 (29%) asiáticos e 13 (10%) na América do Norte. Apesar da inclusão de bases de dados regionais apenas um estudo foi conduzido na América Latina. Podemos interpretar que a falta de estudos relacionados com o tema sugere uma baixa utilização de algumas tecnologias nacionalmente.

#### **2.2.3.2 Estadiamento do CCR**

O diagnóstico dos pacientes é uma variável crítica para inclusão do estudo, portanto, a informação foi extraída de todos os estudos incluídos. Sessenta e quatro (49%) estudos avaliaram pacientes com CCR metastático (mCRC) e nos demais foram incluídos pacientes CCR independente do estadiamento (CRC). Observou-se, portanto, uma proporção equivalente entre estudos com pacientes mCRC e CRC.

#### **2.2.3.3 Características socio-demográficas da população (idade, sexo, histórico médico, comorbidades)**

As características socio-demográficas estavam disponíveis em 105 estudos; nestes, 59,4% (33-85) dos pacientes eram do sexo masculino com idade média agregada de 64 anos. Estes achados condizem com a epidemiologia do CCR. Tais valores condizem com a epidemiologia da doença que é mais prevalente em homens do que em mulheres no Brasil (SUNG *et al.*, 2021) e não aparentam representar um viés na inclusão dos pacientes nos estudos.

Informações acerca do histórico médico e comorbidades não estavam claras na maioria dos trabalhos e não foi julgada uma variável crítica pelos revisores, portanto, não foram apresentados dados acerca dessas variáveis.

#### **2.2.3.4 Tamanho amostral do estudo; o número de pacientes submetidos ao teste índice**

O número mediano de pacientes com avaliação de biomarcadores foi de 42 (1-1017). Foi possível obter este dado em todos os estudos. Observamos uma variação grande no tamanho amostral dos estudos incluídos. Sendo 15 estudos com 10 pacientes ou menos e 35 estudos acima de 100 pacientes. Além do cDNA ser um biomarcador em desenvolvimento, o desenho

dos estudos não foi um critério de elegibilidade, portanto, pesquisas exploratórias com um baixo número de pacientes ou até pesquisa complementar dentro de estudos clínicos maiores foram os principais tipos de estudos encontrados. Era esperado encontrar alguns estudos com um alto número amostral, derivados de tais estudos clínicos de intervenção clínica, e números baixos provenientes de pesquisa iniciais de prova de conceito.

#### **2.2.3.5 Tratamentos e cuidados aos pacientes durante o seguimento**

Não foi possível extrair esta informação em 18 estudos. Esta variável não foi julgada crítica para a pesquisa, e, portanto, os estudos seguiram para inclusão.

Em 33 estudos (25%), o tratamento foi cirúrgico e envolveu a ressecção tumoral. Os demais utilizaram uma variedade de opções de tratamento como: quimioterapia, quimiorradioterapia e imunoterapia. A correlação entre o estadiamento encontrado nos estudos e o tratamento empregado correspondeu as premissas das diretrizes terapêuticas, onde a terapia adjuvante (profilática ou pós-operatória) é indicada nos estágios II ou III do CCR, assim como a terapia neoadjuvante (pré-cirúrgico ou prévio). A terapia paliativa para paciente estágio IV no diagnóstico ou recidiva considerada inoperável. Tratamento com imunoterapia foi encontrado em 26 estudos, 24 em pacientes com mCRC. Observa-se, portanto, que tais tecnologias, continuam a reservar-se para doenças mais graves.

#### **2.2.3.6 Tempo de seguimento**

O tempo de seguimento dos pacientes é uma variável importante para as avaliações quantitativas dos estudos, entretanto ele não estava disponível em 19 dos estudos incluídos. O tempo de acompanhamento dos pacientes nesses estudos variou de 5 dias a 7 anos. Novamente a natureza ampla dos critérios de elegibilidade gerou uma variação considerável nas características dos estudos. Alguns estudos tinham como objetivo a avaliação pós-cirúrgica nos estágios iniciais da doença e outros com longo tempo de acompanhamento após intervenção. Em média os estudos tinham um tempo de acompanhamento de 24 meses. Uma avaliação minuciosa desta variável foi conduzida nos estudos incluídos na meta-análise, pois, o tempo de acompanhamento pode influenciar diretamente o resultado do biomarcador, como será discutido adiante.

#### **2.2.3.7 Unidade de medida do biomarcador**

Ao avaliar os estudos incluídos, segundo os critérios amplos de elegibilidade da pesquisa, foram encontrados três grupos principais tipos de biomarcadores de cDNA:

- a) cfDNA, que corresponde a quantificação do cDNA total, comumente mensurado em ng/ml (também alelos/ml ou cópias/ml);
- b) ctDNA, que corresponde a quantificação de mutações encontradas no cfDNA, comumente mensurada pela frequência ou fração do DNA total (%);
- c) a razão de duas variáveis do cfDNA (ex.: quantificação da expressão de genes Alu 133 e 247).

Unidades de medida como alelos/ml, GE/ml e ng/ml permearam os dois subgrupos ctDNA e cfDNA. Unidade de medida de fração como fração de alelo mutante (MAF) e fração do alelo variante (VAF) foram encontradas exclusivamente nos estudos ctDNA.

Esta variável também estava intimamente ligada aos critérios de elegibilidade, e, portanto, foi possível extraí-la de todos os estudos.

### **2.2.3.8 Teste referência e seus métodos;**

Noventa e seis estudos apresentaram descrição do teste referência. Em 78 destes estudos, o teste referência foi feito com exames de imagem (tomografia computadorizada, ressonância magnética e ultrassonografia). Para definição de doença, 48 estudos utilizaram os critérios RECIST 1.1 (EISENHAUER *et al.*, 2009).

RECIST é a sigla em inglês para "*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*" (Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos, em tradução livre). É um conjunto de critérios utilizado para avaliar a resposta ao tratamento e evolução de doença em tumores sólidos, como cânceres de pulmão, mama, cólon, entre outros. Aqui encontram-se diretrizes claras e objetivas para a avaliação de imagens de tumores obtidas por métodos de imagem e categorizam-se as respostas em resposta completa (RC), resposta parcial (RP), estável ou progressão da doença (PD).

Um estudo utilizou os critérios PERCIST para avaliação da progressão da doença (WAHL *et al.*, 2009). PERCIST é a sigla em inglês para "*PET Response Criteria in Solid Tumors*" (Critérios de Resposta PET em Tumores Sólidos, em tradução livre). É utilizado para avaliar a resposta a tratamentos antitumorais em tumores sólidos, usando tomografia por emissão de pósitrons (PET).

Nesse estudo, consideram-se mudanças na atividade metabólica medida pelo PET em relação ao nível basal, antes do tratamento em uma medida quantitativa da captação do radiotraçador pelo tumor. Os critérios PERCIST categorizam as respostas em diferentes níveis, incluindo resposta metabólica completa (CMR), resposta metabólica parcial (PMR), estável metabólica (SMD) ou progressão metabólica (PMD).

O PERCIST é uma ferramenta útil para avaliar a resposta ao tratamento em tumores sólidos usando PET, e é frequentemente utilizado em ensaios clínicos e na prática clínica para complementar outras ferramentas de avaliação, como o RECIST, proporcionando uma abordagem mais abrangente e precisa na avaliação da resposta ao tratamento em oncologia.

Outro critério encontrado em 14 estudos foi o TRG, sigla em inglês para "*Tumor Regression Grade*" (Gradação de Regressão do Tumor, em tradução livre). É um sistema de classificação utilizado para avaliar a resposta patológica de tumores colorretais após a terapia neoadjuvante. Após a ressecção tumoral, o espécime cirúrgico é examinado histopatologicamente e avalia-se a resposta do tumor à terapia.

O sistema de classificação TRG é geralmente baseado em uma escala numérica que varia de acordo com a instituição ou sistema específico utilizado. Uma pontuação mais baixa ou uma categoria de regressão maior geralmente indica uma resposta melhor ao tratamento, com menos células tumorais remanescentes e uma maior regressão do tumor. É frequentemente utilizado para determinar a resposta ao tratamento e prognóstico dos pacientes com câncer colorretal.

#### **2.2.3.9 Aspectos técnicos da realização do teste índice (método analítico);**

Outra variável relevante do ponto de vista da meta-análise é o tempo de coleta do teste índice. Este não foi um critério de elegibilidade, e, portanto, o tempo de coleta não estava disponível em 22 estudos. Informações de manuseio da amostrarelevantes para a preservação do DNA não estavam disponíveis em 25 estudos.

A maioria dos estudos (n=72) utilizou tubo de EDTA para coleta de sangue e após um ou dois processos de centrifugação, as amostras foram armazenadas a -80°C. Esta informação não estava disponível em 26 estudos. Uma variedade de kits de extração de DNA QIAGEN® apareceu em 97 estudos para o método de extração de DNA.

Os kits de extração da QIAGEN® para extração de DNA circulante se baseiam na utilização de colunas de sílica para a purificação do DNA circulante. O DNA é lavado e, em seguida, eluído a partir da coluna com um tampão de eluição específico. Ao comparar as metodologias disponíveis para a extração do cDNA, o *QIAamp circulating nucleic acid kit* se destaca na sensibilidade para detecção de cDNA (DIEFENBACH *et al.*, 2018) e foi o método mais empregado nos estudos incluídos (n=80). No entanto, é importante notar que a eficiência da extração pode ser afetada por diferentes fatores, como a qualidade da amostra, o método de coleta e o tempo de armazenamento.

Quanto à quantificação, 30 estudos utilizaram a fluorimetria, usualmente a metodologia Qubit<sup>®</sup> 2.0 e outros 36 estudos quantificaram o ctDNA através de *digital droplet* PCR (ddPCR).

A metodologia em destaque, principalmente para uso em ctDNA, o *digital droplet* PCR (ddPCR) é uma técnica altamente sensível e precisa, que permite a quantificação absoluta de DNA em uma amostra. Em comparação com a PCR em tempo real convencional (qPCR), a ddPCR tem a vantagem de permitir a detecção e a quantificação precisa de moléculas de DNA com baixa abundância em uma amostra complexa. O ddPCR envolve a divisão da amostra de DNA em pequenas gotas de reação individuais, onde a amplificação ocorre em cada gota de forma independente. As gotas amplificadas são posteriormente contadas, permitindo a quantificação absoluta do número de cópias de DNA presentes na amostra original.

No entanto, o ddPCR tem algumas desvantagens, como o custo elevado em comparação com outras técnicas de PCR, a complexidade do processo e a necessidade de equipamentos especializados. Além disso, a seleção adequada de sondas e *primers* para amplificação é essencial para garantir a especificidade e a sensibilidade da técnica (TAYLOR; LAPERRIERE; GERMAIN, 2017).

Destaca-se a metodologia de quantificação de cDNA, os kits de ensaio Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS e BR, projetados para uso com fluorômetros Qubit<sup>®</sup>, são altamente seletivos para DNA de fita dupla (dsDNA) sobre DNA de fita simples (ssDNA), RNA, proteína e nucleotídeos livres. Para o cDNA, o kit de ensaio Qubit dsDNA HS (alta sensibilidade) é o mais indicado e fornece um método preciso e seletivo para a quantificação de amostras de DNA. No entanto, resultados de qualidade comparável do ensaio QuBit com ddPCR, sugere que este método deve ser considerado em relação a outros métodos que são caros e demorados, como quando se tem uma biblioteca limpa e homogênea sem problemas de dímero de primer (ROBIN *et al.*, 2016).

### **2.2.3.10 Desfechos**

Cinquenta e nove estudos afirmaram ser a progressão de doença seu desfecho de recorrência, enquanto essa afirmação foi de recorrência em 32 estudos, resposta ao tratamento em 9 e morte em 17. Em 4 estudos foi considerado mais de um tipo de desfecho e em 6 estudos não foi possível coletar essa informação. Foi observado uma tendência menor do desfecho recorrência em estudos com pacientes metastáticos, sendo a progressão de doença seu desfecho mais comum. Não houve correlação observada entre esta variável e os grupos cfDNA e ctDNA.

### 2.2.3.11 Perda de dados e presença de viés

A perda de dados e a presença de viés quando identificadas no momento da extração dos dados foram capturadas. Entretanto, estes parâmetros foram novamente analisados na avaliação da qualidade metodológica através da ferramenta QUADAS 2 (WHITING *et al.*, 2011). Devido ao alto número de publicações e a tamanho do grupo de pesquisa, os comentários acerca da qualidade dos estudos, perda de dados e presença de viés se restringiram aos estudos incluídos na meta-análise.

## CAPÍTULO III: META-ANÁLISE

### 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1.1 Critérios de elegibilidade, seleção dos estudos e extração dos dados

O primeiro passo para realizar uma meta-análise de métodos diagnósticos é a obtenção dos valores de verdadeiro positivo (a), falso positivo (b), falso negativo (c) e falso negativo (d) para cada estudo (Tabela 1). Nesta pesquisa, as variáveis *a*, *b*, *c* e *d*, aqui em diante referenciadas como variáveis diagnósticas, foram definidas como:

- a) (a) verdadeiro positivo: número de pacientes com resultado superior ao limiar do biomarcador e com recorrência da doença ou morte no período de acompanhamento;
- b) (b) falso positivo: número de pacientes com resultado superior ao limiar do biomarcador e livres de doença no período de acompanhamento;
- c) (c) falso negativo: número de pacientes com resultado inferior ao limiar do biomarcador e com recorrência da doença ou morte no período de acompanhamento;
- d) (d) verdadeiro negativo: número de pacientes com resultado inferior ao limiar do biomarcador e livres de doença durante o período de acompanhamento.

Dos 127 estudos contidos na revisão sistemática, foram incluídos na meta-análise os artigos que contemplaram os critérios de elegibilidade listados. Sendo critérios de inclusão:

- a) estudos que disponibilizaram informações dos resultados quantitativos dos testes diagnósticos com cDNA e relação com os resultados de desfecho, para extração das variáveis diagnósticas (Tabela 1).

E critérios de exclusão:

- a) impossibilidade de obter as variáveis diagnósticas através dos dados publicados, do material suplementar ou do contato com o autor;
- b) impossibilidade de obter as variáveis diagnósticas por cálculo reverso dos demais parâmetros diagnósticos (Tabela 2) ou por cálculo derivado dos dados individuais dos pacientes.

Tabela 1 – Matriz de confusão com as definições das variáveis diagnósticas para a pesquisa.

		Desfecho (teste referência)	
		+	-
Teste índice	+	Verdadeiro Positivo (a)	Falso Positivo (b)
	-	Falso Negativo (c)	Verdadeiro Negativo (d)

(a) Número de pacientes com resultado superior ao limiar do biomarcador e com recorrência da doença ou morte no período de acompanhamento; (b) Número de pacientes com resultado superior ao limiar do biomarcador e livres de doença no período de acompanhamento; (c) Número de pacientes com resultado inferior ao limiar do biomarcador e com recorrência da doença ou morte no período de acompanhamento; (d) Número de pacientes com resultado inferior ao limiar do biomarcador e livres de doença durante o período de acompanhamento..

Para aqueles estudos que disponibilizaram dados individuais dos pacientes, o *software* R foi utilizado com o pacote *rocr* para calcular a respectiva curva ROC, para a escolha do melhor ponto de corte e conseqüente cálculo das variáveis diagnósticas. Nestes, o limiar de positividade (ponto de corte) foi definido como aquele que sugeria os maiores valores de produto e de soma dos valores de sensibilidade e especificidade.

Tabela 2 – Medidas de estimativa de precisão do teste diagnóstico (DE SOUSA; RIBEIRO, 2009).

Conceito	Definição	Equação
Especificidade (E)	probabilidade de não-desfecho em não-doentes	$E = \frac{d}{d + b}$
Sensibilidade (S)	probabilidade de desfecho nos doentes	$S = \frac{a}{a + c}$
Acurácia (A)	proporção de resultados corretos	$A = \frac{a + d}{a + b + c + d}$
Valor preditivo positivo (VPP)	probabilidade de desfecho em pessoas com teste positivo	$VPP = \frac{S \times p}{[(S \times p) + (1 - E) \times (1 - p)]}$
Valor preditivo negativo (VPN)	probabilidade de não-desfecho em pessoas com teste negativo	$VPN = \frac{E \times (1 - p)}{[(1 - S) \times p + E \times (1 - p)]}$
Razão de verossimilhança de	mede o quão mais provável ser o teste positivo nos	$RVP = \frac{S}{1 - E}$



Conceito	Definição	Equação
um teste positivo (LR+)	desfechos que em não-desfechos	
Razão de verossimilhança de um teste negativo (LR-)	mede o quão mais provável ser o teste negativo nos desfechos que em não-desfechos	$RVN = \frac{1 - S}{E}$
Razão de chances de diagnóstico (DOR)	desempenho global do teste	$DOR = \frac{RVP}{RVN}$
Fração de verdadeiro positivos (TPR)	total de exames positivos em desfechos	sensibilidade
Fração de falso positivos (FPR)	total de exames positivos em não-desfechos	1-especificidade
Curva ROC ( <i>receiver operator characteristic</i> )	gráfico de dispersão com eixo y = sensibilidade (FVP) e eixo x = 1-especificidade (FFP).	

p: prevalência da doença na população; a, b, c e d: definidas na Tabela 1.

### 3.1.2 Testes estatísticos

A meta-análise do teste diagnóstico proposto, cDNA, foi conduzida no *software* Meta-Disc 2.0 seguindo as diretrizes de utilização relacionadas (PLANA *et al.*, 2022).

Desde 2006, o *software* Meta-DiSc foi um dos programas estatísticos mais amplamente utilizados na meta-análise de dados diagnósticos, com mais de 600 citações em artigos científicos revisados por pares somente na base de dados PubMed. É uma ferramenta fácil de usar e disponível gratuitamente, que permite aos revisores aplicar métodos estatísticos para a meta-análise da precisão do teste diagnóstico dentro de uma estrutura de síntese de evidências. Este *software* implementou os métodos estatísticos recomendados, incluindo o modelo linear proposto por Littenberg e Moses, e o coeficiente de determinação  $I^2$  univariado para quantificar a heterogeneidade (ZAMORA *et al.*, 2006). O *software* foi atualizado em 2022 com modelos hierárquicos que são atualmente o método de escolha para superar as limitações das abordagens estatísticas anteriores (DEEKS JJ, HIGGINS JPT, 2022; PLANA *et al.*, 2022).

O novo *software* se baseia em uma plataforma R e realiza análise estatística de revisões de testes diagnósticos usando um modelo de efeitos aleatórios bivariado e a função *glmer* do pacote *lme4* para ajustar um modelo de efeito misto linear generalizado. Os pontos sumários (sensibilidade e especificidade médias) e os parâmetros são derivados para representar a curva sROC. As estimativas das razões de verossimilhança (LR) positivas e negativas e as estimativas da razão de chances de diagnóstico (DOR) são obtidas a partir dos parâmetros do modelo. O método Delta implementado no pacote *msm* é usado para calcular o erro padrão dos parâmetros

estimados. Forest plots e ROC plots foram implementados usando as funcionalidades dos pacotes *meta*, *ggplot2* e *plotly* (PLANA *et al.*, 2022).

Uma planilha com colunas referentes aos valores de verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falsos positivos e falsos negativos, além do identificador de cada estudo e demais variáveis relevantes extraídas na revisão sistemática, foi carregada na plataforma Meta-Disc 2.0.

No *software*, todas as análises foram obtidas no menu de meta-análise. Primeiramente foi ajustado o modelo bivariado de sensibilidade e especificidade. Tendo em vista, que o modelo de análise univariado não considera a relação entre sensibilidade e especificidade, e, por isso, pode não ser recomendado para meta-análise de variáveis diagnósticas, foi selecionado o modelo de análise bivariado. Em virtude das variações nos desenhos dos estudos selecionados, no espectro da doença e critérios de inclusão dos pacientes e outros fatores que concedem heterogeneidade à amostra de estudos (ex.: método analítico), o método de combinação foi realizado com efeitos aleatórios (DE SOUSA; RIBEIRO, 2009).

Em seguida, os resultados de performance do teste diagnóstico foram extraídos nas abas correspondentes:

- a) estatísticas;
- b) curva sROC;
- c) análise de subgrupo;
- d) análise de sensibilidade.

Na guia de estatísticas, encontram-se os resultados das estimativas de precisão agrupadas e intervalo de confiança (IC) de 95% correspondente. Sendo elas:

- a) sensibilidade;
- b) especificidade;
- c) razões de verossimilhança positiva e negativa (LR+ e LR-, respectivamente);
- d) razão de chances de diagnóstico (DOR);
- e) taxa de falso-positivo (FPR).

Ainda em estatísticas estão apresentados os valores de heterogeneidade, incluindo variações da sensibilidade e especificidade, a partir de regressão logística (logit), juntamente com as razões de chances medianas correspondentes (MOR), o coeficiente de determinação  $I^2$  bivariado e a área da elipse preditiva 95%.

A heterogeneidade dos estudos incluídos nas análises e subanálises foram avaliadas segundo o  $I^2$  bivariado e razão de chances mediana (MOR). O  $I^2$  bivariado também conhecido como coeficiente de determinação, é uma medida que quantifica a proporção da variação de

uma variável que pode ser explicada por outra variável em uma relação bivariada e leva em consideração simultaneamente as variâncias entre estudos de sensibilidade e especificidade, bem como a correlação entre ambos os índices. MOR por sua vez avalia a variabilidade entre unidades de amostragem quando essas unidades são grupos de indivíduos (PLANA; PÉREZ; ZAMORA, 2021). Para sensibilidade, MOR refere-se ao incremento nas chances de encontrar um "verdadeiro positivo" em um indivíduo doente, caso este mude de um estudo com menor sensibilidade para outro estudo com maior sensibilidade. Para especificidade, MOR refere-se ao incremento nas chances de encontrar um "verdadeiro negativo" em um indivíduo não doente, caso este mude de um estudo com menor especificidade para outro estudo com maior especificidade. Portanto, quando mais próximo de 1, mais homogênea a amostra de estudos. Quanto aos valores de razão de verossimilhança positiva e negativa, um LR+ acima de 10 e LR- abaixo de 0.1 são evidências fortes para o diagnóstico acurado na maioria das circunstâncias (DEEKS; ALTMAN, 2004).

Depois de visualizar esses resultados numéricos, foi extraído o resultado de resumo gráfico movendo para a próxima guia denominada curva sROC, que inclui:

- a) o ponto sumário: ponto na curva que representa a correlação dos valores de sensibilidade e especificidade médios encontrados na síntese das evidências;
- b) a elipse preditiva: ou região de previsão que fornece uma representação gráfica da variação potencial na precisão diagnóstica de um teste, quando aplicado a novos indivíduos, ou seja, representa a região onde se espera que a verdadeira curva ROC para observações futuras se encontre;
- c) a elipse 95%: ou elipse de confiança, que representa a incerteza ou variabilidade em torno da curva ROC estimada e foca na precisão e confiabilidade. É uma representação gráfica do intervalo de confiança em torno da curva ROC estimada;
- d) a curva ROC sumária estimada: representa a relação entre sensibilidade e especificidade médias ao longo de um contínuo de valores de ponto de corte;
- e) os resultados individuais dos estudos: ponto no plano ROC onde se encontram os resultados individuais de sensibilidade e especificidade dos estudos individuais com representação amostral conforme tamanho do círculo.

A seguir, a análise de subgrupo se ajusta a um novo modelo bivariado, incluindo parâmetros adicionais para avaliar se a sensibilidade e a especificidade diferem entre os subgrupos propostos. Depois de obter os coeficientes do modelo estimado para cada subgrupo, uma comparação formal entre os subgrupos foi feita usando meta-regressão, que mostra a

relação entre sensibilidade e especificidade, seus IC de 95% e valores-p de testes de razão de verossimilhança para comparar os subgrupos formados de acordo com a covariável selecionada. Foram aplicadas análises de subgrupos visando identificar e explicar possíveis diferenças nos resultados derivadas da heterogeneidade das amostras, no espectro das variáveis coletadas dos estudos a seguir:

- a) doença: diagnóstico da doença em variável dicotômica (mCRC vs CRC);
- b) tratamento: tipo de tratamento empregado no estudo (cirúrgico, radioquimioterapia, imunoterapia, combinado);
- c) população: tamanho amostral de cada estudo (acima e abaixo da mediana [n=35]);
- d) biomarcador: tipo do biomarcador conforme grupos definidos na revisão sistemática (ctDNA e cfDNA);
- e) unidade de medida: unidades de medida do biomarcador encontradas na revisão sistemática;
- f) coleta teste índice: tempo de coleta do teste índice em variável dicotômica (basal vs outros);
- g) coleta do teste referência: tempo de coleta do teste referência em variável dicotômica (acima ou abaixo da mediana [20 meses]).

A guia final de análise de sensibilidade foi usada para restringir a análise a determinados estudos específicos, selecionando o tipo da covariável que foi empregada como critério de inclusão, mostrando estimativas agrupadas, estatísticas de heterogeneidade e gráficos de floresta. As análises de sensibilidade foram conduzidas naquelas categorias de subgrupos com resultado do valor de  $p < 0,05$  indicando diferença significativa entre as categorias daquele subgrupo.

Buscando uma heterogeneidade e aplicabilidade clínica dos resultados, após a apresentação do resultado geral dos estudos incluídos na meta-análise, estes foram divididos em dois grupos: cfDNA e ctDNA. As etapas da meta-análise foram empregadas novamente para cada grupo.

A variação do ponto de corte entre os estudos meta-analisados tem grande impacto na heterogeneidade e é conhecido como *threshold effect* (efeito do ponto de corte, em tradução livre). A partir da revisão sistemática, foram identificados estudos com valor de ponto de corte igual ou similar, utilizando a mesma unidade de medida, dentro dos estudos do subgrupo cfDNA. Desta forma, uma terceira meta-análise foi conduzida neste subgrupo de estudos, para avaliar o efeito do ponto de corte e encontrar uma amostra mais homogênea.

### 3.1.3 Avaliação da qualidade metodológica

A qualidade metodológica dos artigos incluídos para a meta-análise foi avaliada utilizando os critérios QUADAS 2 (WHITING *et al.*, 2011), assim como suas ferramentas online disponíveis.

Essa ferramenta se divide em 4 domínios:

- a) seleção do paciente: compreende a descrição dos métodos de seleção dos pacientes do estudo (amostra consecutiva ou randômica, caso controle, exclusões impróprias) e a descrição dos pacientes incluídos (correspondentes ou não a pergunta da revisão);
- b) teste índice: compreende a descrição do teste índice e como foi conduzido e interpretado (resultados obtidos sem conhecimento do resultado do teste referência, ponto de corte pré-especificado) e correspondência com a pergunta da revisão;
- c) teste de referência: compreende a descrição do teste referência e como foi conduzido e interpretado (identifica a doença corretamente, resultados obtidos sem conhecimento do teste índice) e correspondência com a pergunta de revisão;
- d) fluxo e tempo: compreende a descrição dos pacientes que não receberam o teste índice e/ou referência, a descrição do intervalo de tempo e quaisquer intervenções entre a referência e o índice.

Cada domínio é avaliado em termos de risco de viés, e os 3 primeiros domínios também são avaliados em termos de aplicabilidade em relação a pergunta da revisão. Os revisores respondem a uma sequência de perguntas em cada domínio para auxiliar no julgamento do risco de viés.

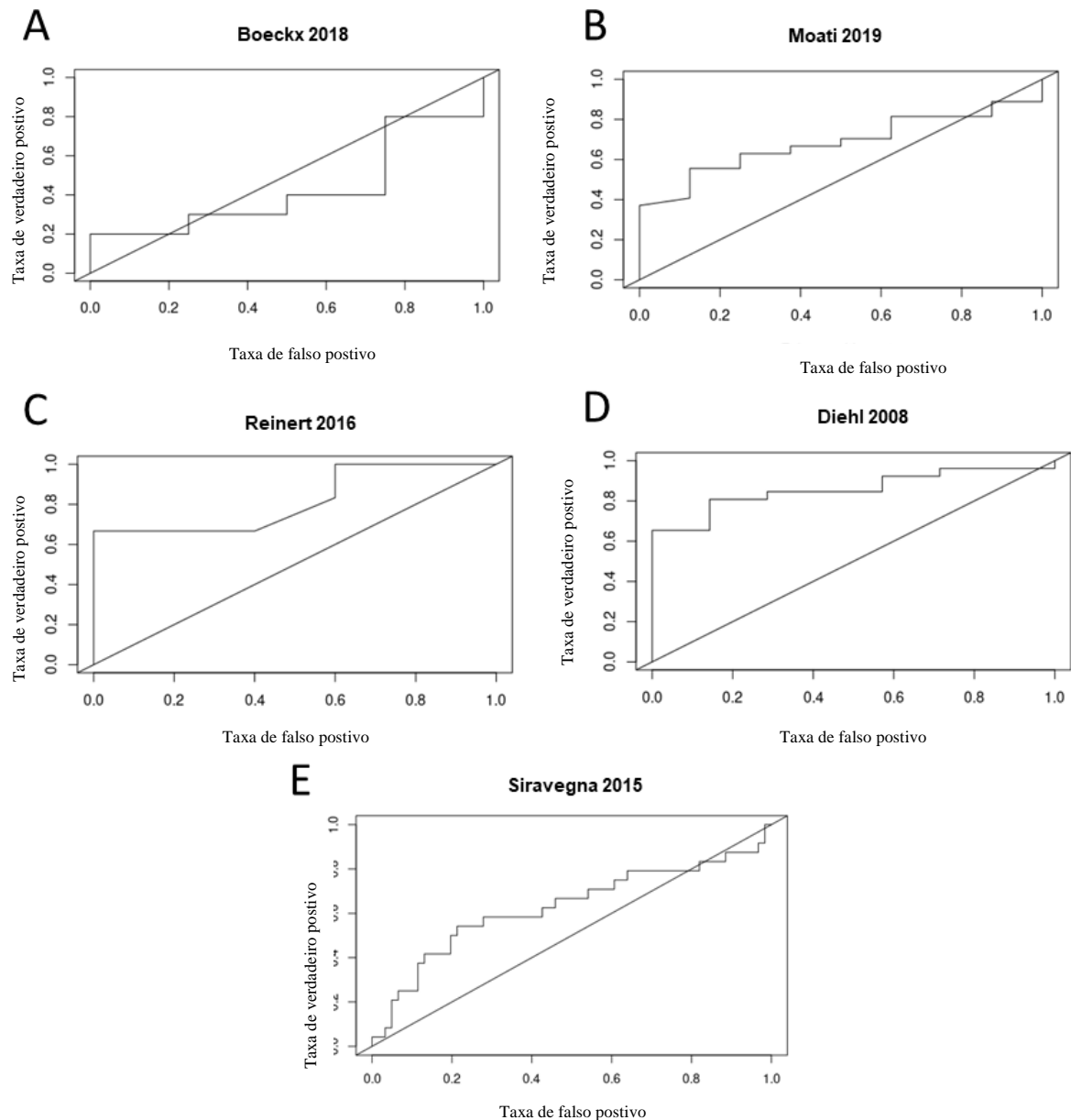
A base de dados disponível online e gratuitamente no formato de arquivo Access (.accdb) foi utilizada pelos revisores para registrar suas respostas e interpretações em cada domínio. A partir da planilha extraída dessa base de dados, os resultados foram exibidos no formato gráfico recomendado para publicações (UNIVERSITY OF BRISTOL, 2023)

Visando comparar os principais grupos de biomarcadores encontrados na revisão sistemática, a apresentação da avaliação metodológica foi separada entre os estudos cfDNA e os estudos ctDNA.

## 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.2.1 Seleção dos estudos e extração dos dados

Figura 4 – Apresentação gráfica das curvas ROC de 5 estudos que disponibilizaram dados individuais dos pacientes para obtenção das variáveis diagnósticas.



Fonte: do autor, a partir do *software* R. Resultado das curvas ROC para os estudos: (A) (BOECKX *et al.*, 2018); (B) (DIEHL *et al.*, 2008); (C) (MOATI *et al.*, 2020); (D) (REINERT *et al.*, 2016) (E) (SIRAVEGNA *et al.*, 2015).

Cinquenta e nove estudos foram incluídos na meta-análise (Figura 2). Os dados consolidados estão apresentados no ANEXO IV em duas tabelas separando os estudos cfDNA dos estudos ctDNA.

Inicialmente, as variáveis diagnósticas foram extraídas de 53 estudos. Em 5 estudos adicionais havia informação para calcular a curva ROC e obter um ponto de corte que viabilizasse a inclusão na meta-análise (Figura 4, Tabela 3). Outros 2 estudos apresentaram dados de sensibilidade, especificidade e número de doentes que possibilitou a obtenção reversa das variáveis diagnósticas e inclusão na meta-análise (JIA *et al.*, 2019; SYMONDS *et al.*, 2020).

Destes 60 estudos disponíveis, foi observada uma sobreposição de pacientes em dois registros (HENRIKSEN *et al.*, 2020; REINERT *et al.*, 2019) A publicação mais recente e com um maior número de pacientes foi mantida.

Tabela 3 –Pontos de corte do teste diagnóstico selecionados para cada um dos 5 estudos que disponibilizaram dados individuais dos pacientes, e os valores de sensibilidade e especificidade derivados.

<b>Referência</b>	<b>Ponto de corte</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>
(BOECKX <i>et al.</i> , 2018)	43.84% MAF	0.75	0.3
(MOATI <i>et al.</i> , 2020)	20.92 % MAF	0.87	0.55
(REINERT <i>et al.</i> , 2016)	200 GE/ml,	1	0.66
(DIEHL <i>et al.</i> , 2008)	42 moléculas/ml	0.85	0.80
(SIRAVEGNA <i>et al.</i> , 2015)	163292 GE/ml	0.78	0.54

MAF, fração dos alelos mutados; GE, equivalentes genômicos.

### 3.2.2 Testes estatísticos

A seguir, serão apresentados os resultados de performance do teste diagnóstico dos estudos incluídos na meta-análise, assim como análises de subgrupos de interesse e análises de sensibilidade.

#### 3.2.2.1 Estatística

Os resultados apresentados a seguir se referem aos 59 estudos, que incluíram 4382 pacientes. Destes, 1779 apresentarem recorrência ou morte durante o acompanhamento e 2603 não apresentaram recorrência ou morte durante o acompanhamento. Totalizando uma prevalência de 41% de recorrência nessa população.

A sensibilidade da amostra agrupada foi de 62,7% (IC95% 54,9 – 69,8) e a especificidade foi de 81,6% (IC95% 75,1 – 86,7). A razão de chances diagnósticas (DOR) foi de 7,427 (IC95% 5,052 – 10,917). Os dados de heterogeneidade da Tabela 4 demonstram grande heterogeneidade na amostra, tanto no espectro da sensibilidade, quanto da

especificidade (MOR sens  $>2$  e MOR spec  $> 2$ ). A área da elipse preditiva 95% ultrapassa os 50%, indicando heterogeneidade alta, assim como o valor de  $I^2$  bivariado.

Tabela 4 – Resultado da meta-análise com estimativas de precisão do teste diagnóstico e parâmetros de heterogeneidade

	Estimado	IC 95% inferior	IC 95% superior
Sensibilidade	0.627	0.549	0.698
Especificidade	0.816	0.751	0.867
DOR	7.427	5.052	10.917
LR+	3.399	2.555	4.522
LR-	0.458	0.381	0.55
FPR	0.184	0.133	0.249
Var logit(sen)	1.171		
Var logit(spe)	1.682		
MOR sensibilidade	2.807		
MOR especificidade	3.445		
$I^2$ bivariado	0.599		
Área da elipse preditiva 95%	0.53		

IC, intervalo de confiança; DOR, razão de chances diagnósticas; LR+, razão de verossimilhança positiva; LR-, razão de verossimilhança negativa; FPR, taxa de falso positivo; Var logit(sen), variações da sensibilidade do logit; Var logit (spe), variações da especificidade do logit; MOR, razões de chances medianas.

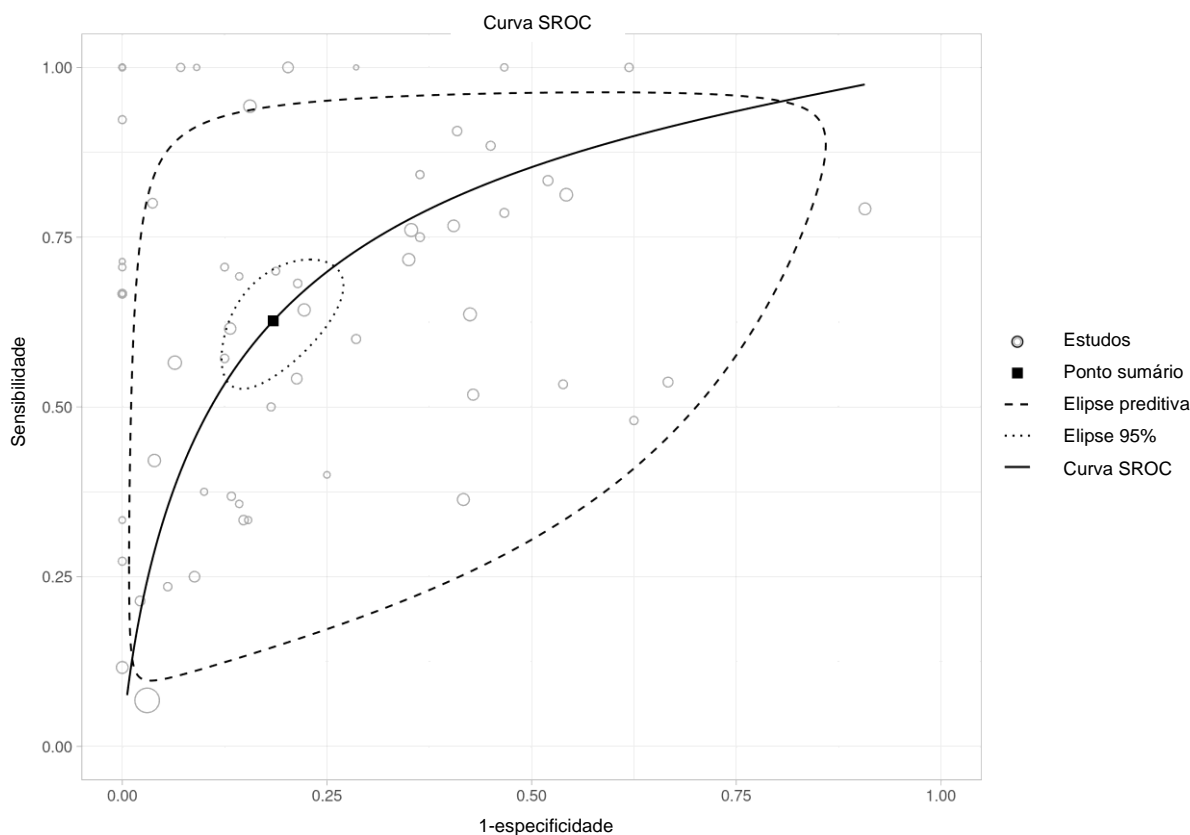
LR+ e LR- não se aproximaram de valores que representem evidências fortes para um diagnóstico acurado através deste teste diagnóstico, aqui representado pelo grupo total de estudos que quantificaram o cDNA. DOR é a variável que melhor representa a acurácia do teste diagnóstico e quanto maior seu valor melhor a precisão do teste diagnóstico. E será comparada entre as análises conduzidas a seguir.

### 3.2.2.2 Curva sROC

A curva ROC sumária dos estudos incluídos na meta-análise apresenta-se na Figura 5. É possível visualizar a heterogeneidade da amostra, aqui representada pela elipse preditiva que ocupa pouco mais de 50% do plano ROC (área da elipse preditiva 95% = 0.53). Cada estudo está representado por um círculo e o impacto do resultado de cada estudo para o ponto sumário pode ser percebido pelo tamanho dos círculos. A curva sROC representa a variação do ponto de corte conforme resultado agrupado dos estudos. A busca por um ponto de corte otimizado neste gráfico não seria bem interpretada, pois o mesmo contém estudos diversos em relação a unidade de medida e metodologia empregada.



Figura 5 – Resumo gráfico da meta-análise dos resultados de precisão do teste diagnóstico



Fonte: do autor em MetaDisc 2.0 (2023)

### 3.2.2.3 Análise de subgrupos

A partir da meta-regressão nos subgrupos apresentados anteriormente, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos de doença, de biomarcador, de coleta do teste referência ou de coleta do teste índice (dados não apresentados).

Considerando o possível impacto das características dos estudos nas estimativas de precisão do teste diagnóstico, seria esperado que um tempo de acompanhamento prolongado produziria uma especificidade maior em detrimento da sensibilidade e o inverso seria verdadeiro para um tempo de acompanhamento curto. Entretanto, aqui, as análises de meta-regressão destes subgrupos não demonstraram nenhuma diferença significativa.

Por outro lado, e inesperadamente, uma diferença significativa foi encontrada na análise dos subgrupos de população ( $p=0,04$ ) (Tabela 5), onde apresenta-se um desempenho diagnóstico melhor do biomarcador no grupo de estudos com um tamanho amostral abaixo da mediana.

Tabela 5 – Resultado da meta-regressão no subgrupo população (grupo de estudos acima ou abaixo da mediana de pacientes)

Parâmetro	Estimado	IC 95% inferior	IC 95% superior	valor de p
Sensibilidade relativa $\geq 35$ vs $< 35$	0.87	0.691	1.095	0.245
Especificidade relativa $\geq 35$ vs $< 35$	0.899	0.788	1.025	0.12
Comparação geral do teste				0.04

IC, intervalo de confiança.

### 3.2.2.4 Análise de sensibilidade

Ao selecionar apenas estudos com baixo número amostral ( $n=26$ ), a sensibilidade da amostra foi de 68,8% (IC95% 55,4 – 79,0) e a especificidade foi de 85,8% (IC95% 77,0 – 91,7). A razão de chances diagnósticas (DOR) foi de 13,361 (IC95% 6,577 – 27,142). (Tabela 6). Apesar do valor de DOR alto, os valores LR+ e LR- não se aproximaram de valores que representem evidências fortes para um diagnóstico acurado. Ainda, este resultado deve ser interpretado com cautela devido ao risco de viés destes estudos, com um baixo número de pacientes.

Os resultados agregados obtidos para o total dos estudos incluídos na meta-análise e suas sub-análises, possuem relevância científica pois demonstram a tendência de performance do biomarcador. Ao agregar os resultados de performance diagnóstica bastante heterogêneos da literatura, os resultados de sensibilidade e especificidade ficam abaixo do desejável para necessidade clínica em questão, a detecção de recorrência no câncer colorretal. Ainda que a especificidade tenha mais relevância para os sistemas de saúde em relação a sensibilidade, pois ao estabelecer com exatidão a não-doença evita-se o uso de métodos diagnósticos caros e invasivos, buscamos também um valor baixo de FPR.

Tabela 6 – Resultado das estimativas de precisão para o subgrupo população de 35

	Estimado	IC 95% superior	IC 95% inferior
Sensibilidade	0.688	0.564	0.79
Especificidade	0.858	0.77	0.917
DOR	13.361	6.577	27.142
LR+	4.858	2.937	8.033
LR-	0.364	0.254	0.52
FPR	0.142	0.083	0.23

IC, intervalo de confiança; DOR, razão de chances diagnósticas; LR+, razão de verossimilhança positiva; LR-, razão de verossimilhança negativa; FPR, taxa de falso positivo;

Os resultados, apresentados até aqui, tem pouca aplicabilidade clínica, pois englobam uma variedade extensa de biomarcadores e metodologias. A fim de melhorar a interpretação

dos resultados e consequente aplicabilidade clínica, apresenta-se a seguir as análises para cfDNA e ctDNA.

### 3.2.2.5 Estatística para o grupo cfDNA

Os resultados apresentados a seguir se referem aos 17 estudos do grupo cfDNA, que incluíram 905 pacientes, 429 com recorrência ou morte durante o acompanhamento e 476 sem recorrência ou morte durante o acompanhamento. Totalizando uma prevalência de 47% de recorrência nessa população.

A sensibilidade da amostra agrupada foi de 66,5% (IC95% 55,0 – 76,3) e a especificidade foi de 71,4% (IC95% 59,3 – 81,0). A razão de chances diagnósticas (DOR) foi de 4,94 (IC95% 2,89 – 8,41). Os dados de heterogeneidade da Tabela 7 demonstram grande heterogeneidade na amostra, tanto no espectro da sensibilidade, quanto da especificidade (MOR sens >2 e MOR spec > 2). A área da elipse preditiva 95% não ultrapassa os 50%, indicando heterogeneidade moderada, assim como o valor de  $I^2$  bivariado.

Tabela 7 - Resultado da meta-análise do grupo cfDNA com estimativas de precisão do teste diagnóstico e parâmetros de heterogeneidade

	Estimado	IC 95% inferior	IC 95% superior
Sensibilidade	0.665	0.55	0.763
Especificidade	0.714	0.593	0.81
DOR	4.94	2.899	8.418
LR+	2.322	1.651	3.265
LR-	0.47	0.353	0.626
FPR	0.286	0.19	0.407
Var logit(sen)	0.739		
Var logit(spe)	0.82		
MOR sensibilidade	2.271		
MOR especificidade	2.372		
$I^2$ bivariado	0.561		
Área da elipse preditiva 95%	0.413		

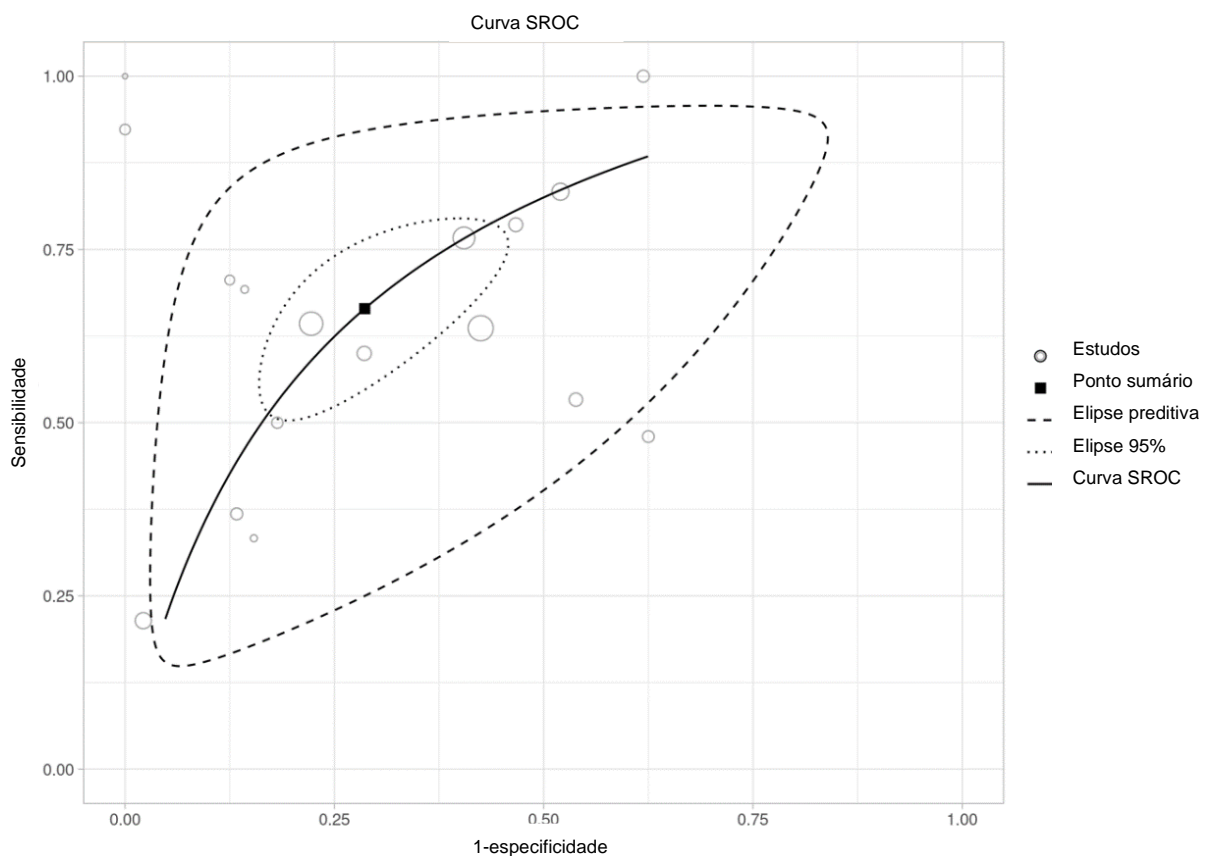
IC, intervalo de confiança; DOR, razão de chances diagnósticas; LR+, razão de verossimilhança positiva; LR-, razão de verossimilhança negativa; FPR, taxa de falso positivo; Var logit(sen), variações da sensibilidade do logit; Var logit (spe), variações da especificidade do logit; MOR, razões de chances medianas.

Infelizmente, os valores para este subgrupo não foram superiores aos encontrados anteriormente, indicando uma baixa performance do cfDNA na detecção de recorrência no câncer colorretal.

### 3.2.2.6 Curva sROC para o grupo cfDNA

A curva ROC sumária dos estudos incluídos na meta-análise do grupo cfDNA apresenta-se na Figura 6. É possível visualizar a heterogeneidade da amostra, aqui representada pela elipse preditiva que ocupa pouco menos de 50% do plano ROC (área da elipse preditiva 95% = 0.41). Cada estudo está representado por um círculo e o impacto do resultado de cada estudo para o ponto sumário pode ser percebido pelo tamanho dos círculos. A curva sROC representa a variação do ponto de corte conforme resultado agrupado dos estudos. Neste grupo a busca por um ponto de corte otimizado aproxima-se de uma aplicabilidade clínica relevante e será abordada adiante.

Figura 6 – Resumo gráfico da meta-análise dos resultados de precisão do teste diagnóstico no grupo cfDNA



Fonte: do autor em MetaDisc 2.0 (2023)

### 3.2.2.7 Análise de subgrupos para o grupo cfDNA

A partir da meta-regressão dos subgrupos apresentados anteriormente, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos de população e coleta do teste referência (dados não apresentados).

Uma diferença significativa foi encontrada entre os grupos de coleta do teste índice ( $p=0$ ) (Tabela 8). Entretanto, esta diferença também deve ser interpretada com cautela devido ao baixo número de estudos neste grupo, que não coletou o teste índice no momento basal ( $n=3$ ).

Interessante observar que não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos de doença (mCRC e CRC) apesar do fato de que em estágios mais avançados do câncer a liberação de DNA circulante é maior. Ou seja, valores mais altos de cfDNA não influenciam performance do biomarcador.

Tabela 8 – Resultado da meta-regressão no subgrupo coleta do teste índice (grupo de estudos com a coleta do teste índice basal ou outros)

Parâmetro	Estimado	IC 95% inferior	IC 95% superior	Valor p
Sensibilidade relativa não-basal vs basal	1.414	1.121	1.783	0.029
Especificidade relativa não-basal vs basal	1.382	1.146	1.666	0.031
Comparação geral do teste				0

IC, intervalo de confiança.

### 3.2.2.8 Análise de sensibilidade para o grupo cfDNA

Não foi possível fazer uma análise sobre os estudos com o tempo de coleta não-basal, devido ao baixo número de estudos ( $n=3$ ). A característica de um biomarcador de prognóstico como o cfDNA faz com que a maioria dos estudos encontrados na revisão sistemática e incluídos na meta-análise optem pela quantificação do DNA circulante no momento basal do acompanhamento, ante do início do tratamento proposto pelo estudo. Assim buscando uma correlação do valor encontrado do biomarcador com o desfecho daquele paciente independente do tratamento empregado e do estágio da doença.

### 3.2.2.9 Estatística: Análise do *threshold effect* (efeito do ponto de corte, tradução livre) em cfDNA

Visando diminuir a heterogeneidade amostral na subanálise dos estudos cfDNA, foi possível isolar 6 estudos com um ponto de corte em comum (20 ng/ml) e dessa forma minimizar o efeito do ponto de corte na meta-análise. Nesta amostra, os resultados apresentados se referem a 391 pacientes, 137 com recorrência ou morte durante o acompanhamento e 254 sem recorrência ou morte durante o acompanhamento. Totalizando uma prevalência de 35% de recorrência nessa população.

A sensibilidade da amostra agrupada foi de 62,0% (IC95% 38,0 – 81,2) e a especificidade foi de 62,5% (IC95% 49,0 – 74,2). A razão de chances diagnósticas (DOR) foi de 2,71 (IC95% 1,42 – 5,16). Os dados de heterogeneidade da Tabela 9 demonstram

heterogeneidade moderada na amostra, com maior importância no espectro da sensibilidade em relação a especificidade (MOR sens >2 e MOR spec < 2). A área da elipse preditiva 95% não ultrapassa os 50% indicando heterogeneidade baixa assim como o valor de  $I^2$  bivariado.

Apesar dos menores valores de heterogeneidade encontrados até então, o DOR também foi o mais baixo até agora. Podemos interpretar que o resultado desta amostra, composta por estudos extremamente similares entre si, pode ser interpretado como uma boa aplicabilidade clínica. Infelizmente as estimativas de precisão para o teste diagnóstico neste subgrupo não foram favoráveis.

Tabela 9 - Resultado da meta-análise do grupo cfDNA com ponto de corte igual a  $20 \pm 3$  ng/ml em estimativas de precisão do teste diagnóstico e parâmetros de heterogeneidade

	Estimado	IC 95% inferior	IC 95% superior
Sensibilidade	0.62	0.38	0.812
Especificidade	0.625	0.49	0.742
DOR	2.714	1.426	5.165
LR+	1.651	1.304	2.091
LR-	0.609	0.383	0.966
FPR	0.375	0.258	0.51
Var logit(sen)	1.175		
Var logit(spe)	0.296		
MOR sensibilidade	2.812		
MOR especificidade	1.68		
$I^2$ bivariado	0		
Área da elipse preditiva 95%	0.235		

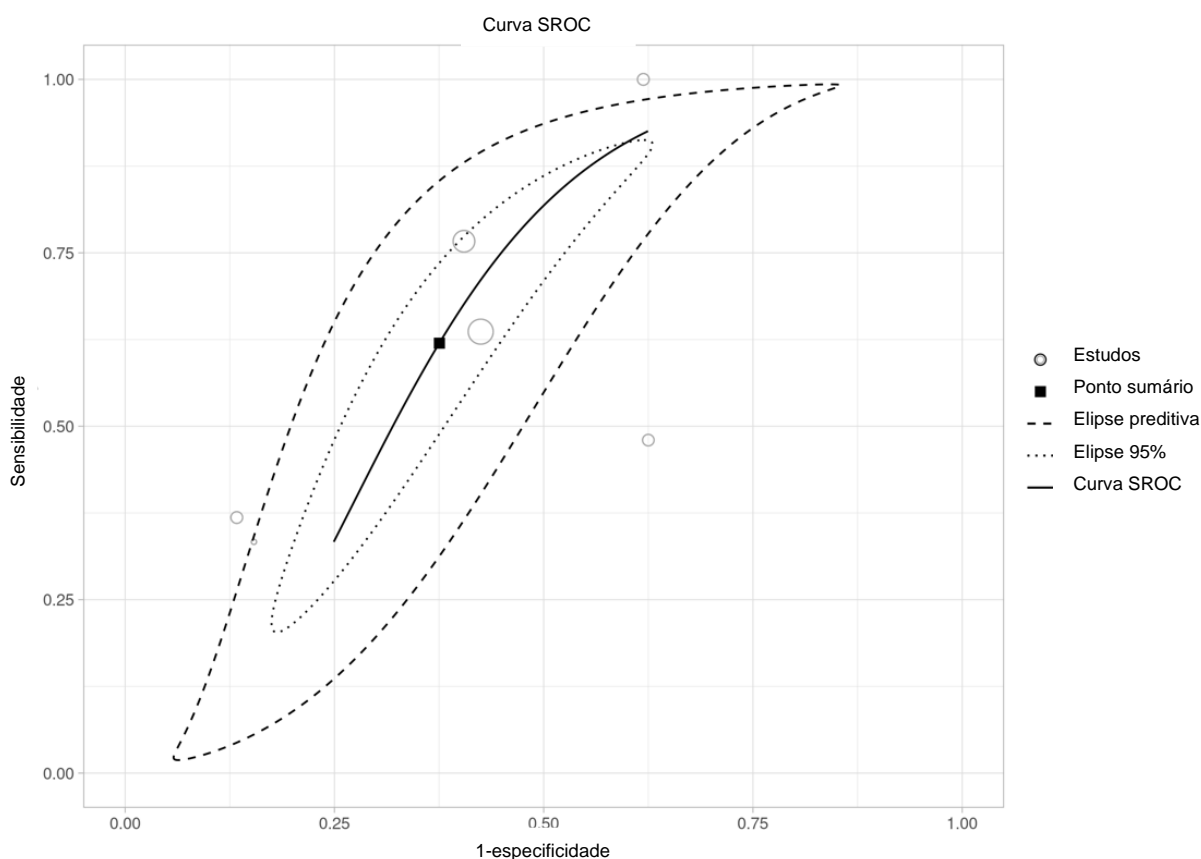
IC, intervalo de confiança; DOR, razão de chances diagnósticas; LR+, razão de verossimilhança positiva; LR-, razão de verossimilhança negativa; FPR, taxa de falso positivo; Var logit(sen), variações da sensibilidade do logit; Var logit (spe), variações da especificidade do logit; MOR, razões de chances medianas.

### 3.2.2.10 Curva sROC: Análise do *threshold effect* (efeito do ponto de corte, tradução livre) em cfDNA

A curva ROC sumária dos estudos incluídos na meta-análise do grupo cfDNA com ponto de corte de  $20 \pm 3$  ng/ml apresenta-se na Figura 7. É possível visualizar a heterogeneidade da amostra, aqui representada pela elipse preditiva que ocupa bem menos de 50% do plano ROC (área da elipse preditiva 95% = 0.23). Cada estudo está representado por um círculo e o impacto do resultado de cada estudo para o ponto sumário pode ser percebido pelo tamanho dos círculos. A curva sROC representa a variação do ponto de corte conforme resultado agrupado dos estudos.

Como seria esperado, ao isolar os estudos com ponto de corte equivalentes, e consequentemente metodologias similares, encontramos os valores mais baixos de heterogeneidade. Esta amostra pode ser visualizada na Figura 7, que além de ocupar pouco espaço do plano ROC, se assemelha em formato a curva sROC estimada.

Figura 7 - Resumo gráfico da meta-análise dos resultados de precisão do teste diagnóstico no grupo cfDNA, com ponto de corte de  $20 \pm 3$  ng/ml (n=6)



Fonte: do autor em MetaDisc 2.0 (2023)

Não foram aplicáveis análises de subgrupo e de sensibilidade para esse grupo de estudos, devido o pequeno número de estudos (n=6).

### 3.2.2.11 Estatística para o grupo ctDNA

Os resultados apresentados a seguir se referem aos 42 estudos do grupo ctDNA, que incluíram 3477 pacientes, 1350 com recorrência ou morte durante o acompanhamento e 2127 sem recorrência ou morte durante o acompanhamento. Totalizando uma prevalência de 39% de recorrência nessa população.

A sensibilidade da amostra agrupada foi de 61,0% (IC95% 51,2 – 70,0) e a especificidade foi de 84,6% (IC95% 77,1 – 90,0). A razão de chances diagnósticas (DOR) foi

de 8,618 (IC95% 5,278 – 14,073). Os dados de heterogeneidade da Tabela 10 demonstram grande heterogeneidade na amostra, tanto no espectro da sensibilidade, quanto da especificidade (MOR sens >2 e MOR spec > 2). A área da elipse preditiva 95% ultrapassa os 50%, indicando heterogeneidade alta, assim como o valor de  $I^2$  bivariado.

Tabela 10 - Resultado da meta-análise do grupo ctDNA, com estimativas de precisão do teste diagnóstico e parâmetros de heterogeneidade

	Estimado	IC 95% inferior	IC 95% superior
Sensibilidade	0.61	0.512	0.7
Especificidade	0.846	0.771	0.9
DOR	8.618	5.278	14.073
LR+	3.97	2.717	5.801
LR-	0.461	0.368	0.577
FPR	0.154	0.1	0.229
Var logit(sen)	1.287		
Var logit(spe)	1.918		
MOR sensibilidade	2.951		
MOR especificidade	3.748		
$I^2$ bivariado	0.58		
Área da elipse preditiva 95%	0.558		

IC, intervalo de confiança; DOR, razão de chances diagnósticas; LR+, razão de verossimilhança positiva; LR-, razão de verossimilhança negativa; FPR, taxa de falso positivo; Var logit(sen), variações da sensibilidade do logit; Var logit (spe), variações da especificidade do logit; MOR, razões de chances medianas.

A performance do grupo ctDNA foi melhor quando comparada ao grupo cfDNA (DOR = 8,61 vs 4,94, respectivamente). Podemos comentar algumas diferenças entre os métodos que podem explicar a diferença encontrada. O ctDNA, por quantificar uma mutação conhecida, relacionada a doença, e possivelmente previamente identificada no paciente, aproxima-se da prática de medicina personalizada. Aqui, vemos uma das vantagens deste tipo de abordagem na prática clínica, pois encontramos valores maiores das estimativas de precisão do método. Entretanto, a abordagem da medicina personalizada gera também um custo ao sistema. Podemos interpretar que a abordagem do método cfDNA é mais simples e menos custosa, e infelizmente, não foi mais efetiva na precisão do método.

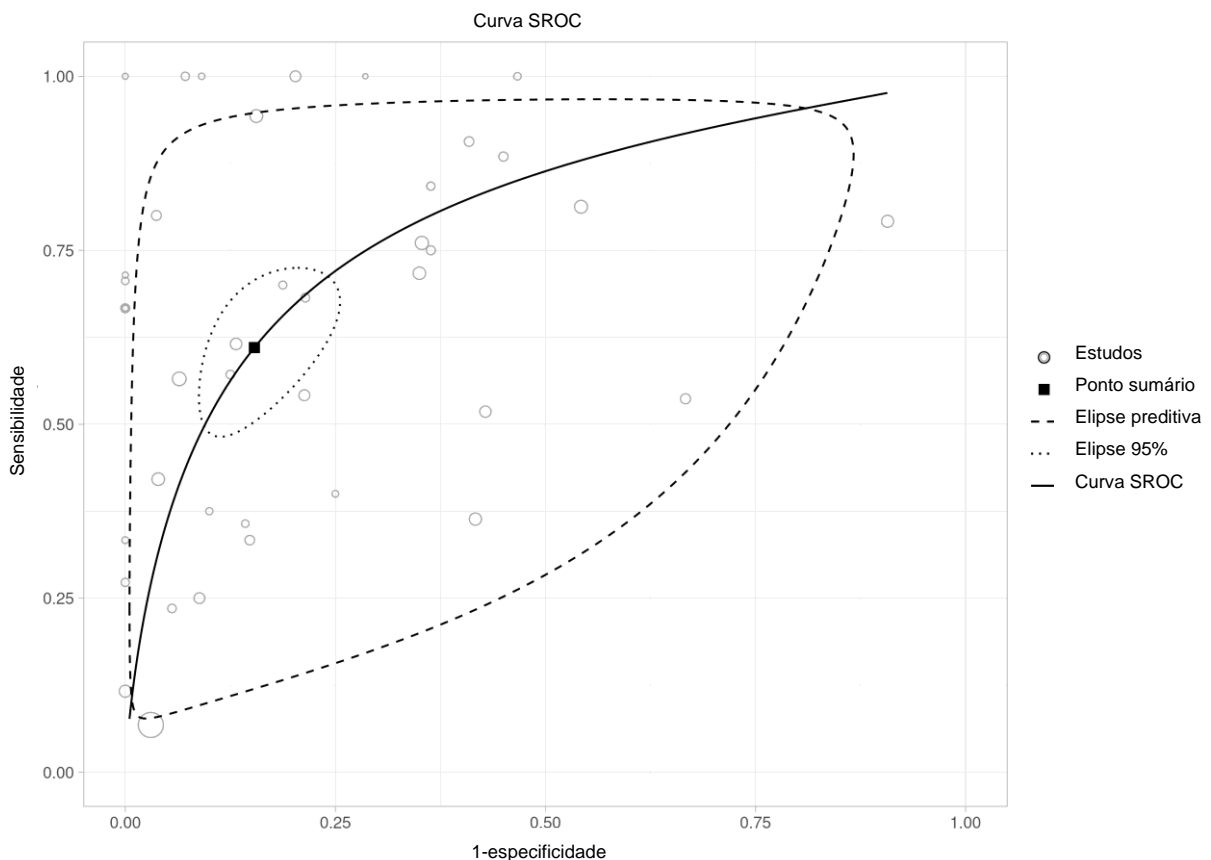
### 3.2.2.12 Curva sROC para o grupo ctDNA

A curva ROC sumária dos estudos incluídos na meta-análise no grupo ctDNA apresenta-se na Figura 8. É possível visualizar a heterogeneidade da amostra, aqui representada pela elipse preditiva que ocupa mais de 50% do plano ROC (área da elipse preditiva 95% = 0.55), o maior valor encontrado dentre as análises. Cada estudo está representado por um círculo e o impacto



do resultado de cada estudo para o ponto sumário pode ser percebido pelo tamanho dos círculos. A curva sROC representa a variação do ponto de corte, conforme resultado agrupado dos estudos. A busca por um ponto de corte otimizado neste gráfico não seria bem interpretada, pois o mesmo contém estudos diversos em relação a unidade de medida e metodologia empregada.

Figura 8 - Resumo gráfico da meta-análise dos resultados de precisão do teste diagnóstico no grupo ctDNA



Fonte: do autor em MetaDisc 2.0 (2023)

### 3.2.2.13 Análise de subgrupos para o grupo ctDNA

A partir da meta-regressão dos subgrupos apresentados anteriormente, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos de coleta do teste índice, da coleta do teste referência e do tamanho amostral (dados não apresentados).

Uma diferença significativa foi encontrada entre os grupos de doença ( $p=0,02$ ) (Tabela 11). Neste caso, no grupo de pacientes com menor gravidade de doença (CRC), o ctDNA teve um desempenho diagnóstico melhor do que no grupo com doença mais avançada (mCRC), primariamente relacionado a uma maior especificidade. Espera-se que nessa população o

número de pacientes corretamente identificados como não doentes acabe sendo superior a população com doença mais grave

Tabela 11 – Resultado da meta-regressão no subgrupo de doença (grupo de estudos com pacientes mCRC ou CRC).

Parâmetro	Estimado	IC 95% inferior	IC 95% superior	p-value
Sensibilidade relativa mCRC vs CRC	0.817	0.609	1.096	0.19
Especificidade relativa mCRC vs CRC	0.89	0.773	1.025	0.113
Comparação geral do teste				0.02

mCRC, câncer colorretal metastático; CRC, câncer colorretal não metastático.

### 3.2.2.14 Análise de sensibilidade ctDNA

Aqui isolamos os resultados para os estudos que não restringiram a população ao câncer metastático (CRC). Neste subgrupo, a sensibilidade da amostra foi de 69,1% (IC95% 52,9 – 81,7) e a especificidade foi de 88,1% (IC95% 81,4 – 97,7). A razão de chances diagnósticas (DOR) foi de 16,63 (IC95% 8,557 – 32,319).

Tabela 12 – Resultado das estimativas de precisão para o subgrupo CRC

	Estimado	IC 95% inferior	IC 95% superior
Sensibilidade	0.691	0.529	0.817
Especificidade	0.881	0.814	0.927
DOR	16.63	8.557	32.319
LR+	5.825	3.82	8.882
LR-	0.35	0.222	0.552
FPR	0.119	0.073	0.186

CRC, câncer colorretal não metastático; DOR, razão de chances diagnósticas; LR+, razão de verossimilhança positiva; LR-, razão de verossimilhança negativa; FPR, taxa de falso positivo.

Adicionalmente, este grupo teve um desempenho diagnóstico mensurado através da variável DOR, melhor quando comparado ao grupo cfDNA e à análise global (DOR 16,63 vs 4,94 vs 7,42, respectivamente).

Podemos relacionar o melhor desempenho de ctDNA em relação ao cfDNA devido a especificidade clínica do primeiro. Ainda assim, devemos considerar um importante viés em que potencialmente apenas os pacientes que apresentavam as mutações eram incluídos no grupo de análise.

### 3.2.3 Avaliação da qualidade metodológica

A apresentação da qualidade metodológica dos estudos foi agrupada conforme tipo de biomarcador cfDNA ou ctDNA nas tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 13 – avaliação da qualidade metodológica dos estudos de cfDNA incluídos na meta-análise

ID do estudo	Risco de viés				Questões de Aplicabilidade		
	Seleção dos pacientes	Teste Índice	Teste Referência	Fluxo e tempo	Seleção dos pacientes	Teste Índice	Teste Referência
1	😊	😊	😊	😊	😊	⚡	😊
5	😞	😞	😞	😊	😞	😊	😊
7	⚡	😊	😊	😊	😊	😞	😊
16	⚡	⚡	😊	😊	😊	😊	😊
18	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
25	⚡	😞	⚡	⚡	😞	😊	⚡
31	😊	⚡	⚡	😊	😊	😊	😊
39	😊	⚡	😊	😊	😊	😞	😊
40	⚡	⚡	⚡	⚡	😊	😞	⚡
72	😞	😊	😊	😊	😊	😊	😊
83	😞	⚡	😊	😊	😊	😊	😊
84	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
87	😞	😊	😊	😊	😊	😊	😊
96	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
113	😞	⚡	⚡	😊	😊	😊	😊
116	😊	⚡	😊	😊	😊	😊	😊
126	😊	⚡	⚡	😊	😊	😊	😊

😊 baixo risco    😞 alto risco    ⚡ risco incerto

Tabela 14 – avaliação da qualidade metodológica dos estudos ctDNA incluídos na análise quantitativa

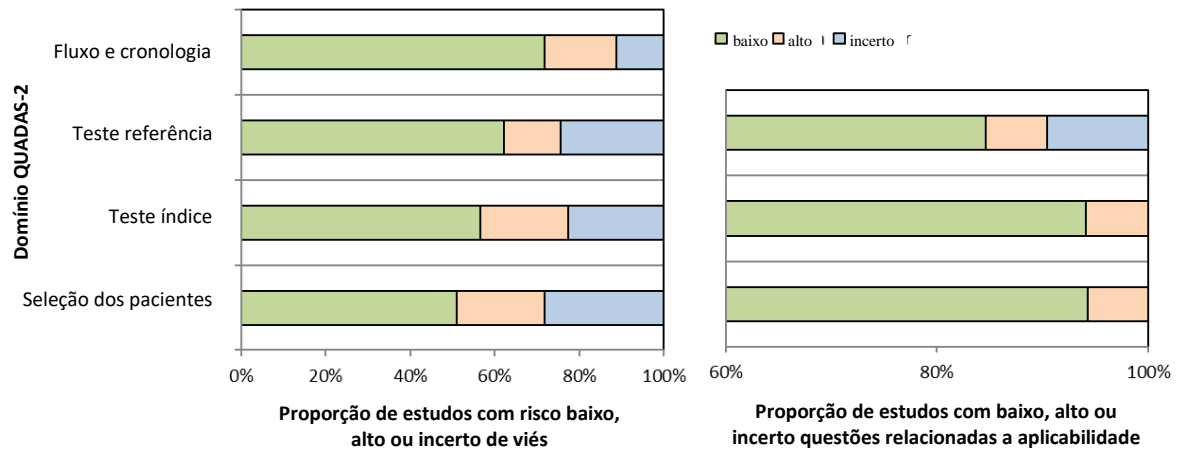
ID do estudo	Risco de viés				Questões de aplicabilidade		
	Seleção dos pacientes	Teste Índice	Teste Referência	Fluxo e Cronologia	Seleção dos pacientes	Teste Índice	Teste Referência
2	😊	😊	⚡	😊	😊	😊	⚡
6	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
10	😞	😊	😞	😞	😊	😊	😊
11	⚡	😞	⚡	😞	😊	😊	😊
15	😊	⚡	😊	😊	😊	😊	😊
21	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
23	😊	😊	⚡	😞	😊	😊	😞
27	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
29	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
34	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
37	⚡	😞	😞	😊	😊	😊	😊
45	😊	⚡	😊	😊	😊	😊	😊

ID do estudo	Risco de viés				Questões de aplicabilidade		
	Seleção dos pacientes	Teste Índice	Teste Referência	Fluxo e Cronologia	Seleção dos pacientes	Teste Índice	Teste Referência
46	😊	😞	😊	😊	😊	😊	😊
49	⚡	😞	😊	😊	😊	😊	😊
51	⚡	⚡	😊	😊	😊	😊	😊
52	😞	😊	⚡	😞	😊	😊	⚡
56	⚡	😊	😞	😞	😊	😊	😊
58	⚡	😊	⚡	😞	😊	😊	😞
60	😞	😊	😊	😊	😊	😊	😊
61	😊	😞	😞	😊	😊	😊	😊
62	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
63	😊	😞	😊	⚡	😊	😊	😊
64	😞	⚡	⚡	⚡	😊	😊	😞
65	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
67	⚡	⚡	⚡	😊	😊	😊	😊
69	⚡	😞	😊	😊	😊	😊	😊
74	⚡	😊	😊	😞	😞	😊	😊
75	😊	😊	😞	😊	😊	😊	😊
78	😞	😞	😞	😞	😊	😊	😊
85	😊	😞	⚡	⚡	😊	😊	😊
99	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
101	😊	⚡	⚡	😞	😊	😊	⚡
104	⚡	😊	😊	⚡	😊	😊	😊
107	⚡	😊	😊	😊	😊	😊	😊
108	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
110	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
111	😞	😊	😊	😊	😊	😊	😊
112	😊	😊	😊	😊	😊	😊	😊
114	⚡	😊	😊	😞	😊	😊	😊
121	😊	⚡	😊	😊	😊	😊	😊
124	😊	😊	⚡	😊	😊	😊	😊
127	⚡	⚡	😊	😊	😊	😊	😊

😊 baixo risco    😞 alto risco    ⚡ risco incerto

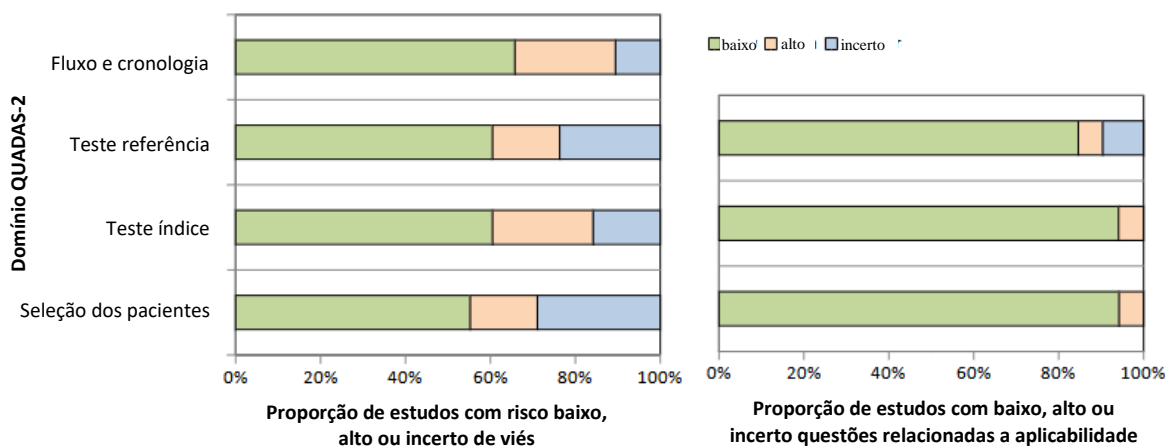
As Figuras 9, 10 e 11 contém a disposição gráfica do resultado da avaliação de qualidade dos estudos incluídos na meta-análise, segundo a ferramenta QUADAS em seus 4 domínios (seleção de pacientes, teste índice, teste referência e fluxo de pacientes), e a partir da proporção de estudos com baixo, alto ou incerto risco de viés (à esquerda) e a proporção de estudos com baixa, alta ou incerto preocupação relacionada à aplicabilidade (à direita) em cada domínio.

Figura 9 – Resultado da avaliação de qualidade dos estudos incluídos na meta-análise



Fonte: do autor com ferramentas QUADAS disponíveis online (UNIVERSITY OF BRISTOL, 2023). Disposição gráfica dos resultados de avaliação da qualidade, conforme ferramenta QUADAS em seus 4 domínios (seleção de pacientes, teste índice, teste referência e fluxo de pacientes), a partir da proporção de estudos com baixo, alto ou incerto risco de viés (à esquerda) e a proporção de estudos com baixa, alta ou incerto preocupação relacionada à aplicabilidade (à direita) em cada domínio.

Figura 10 - Resultado da avaliação de qualidade dos estudos incluídos na meta-análise do grupo ctDNA.



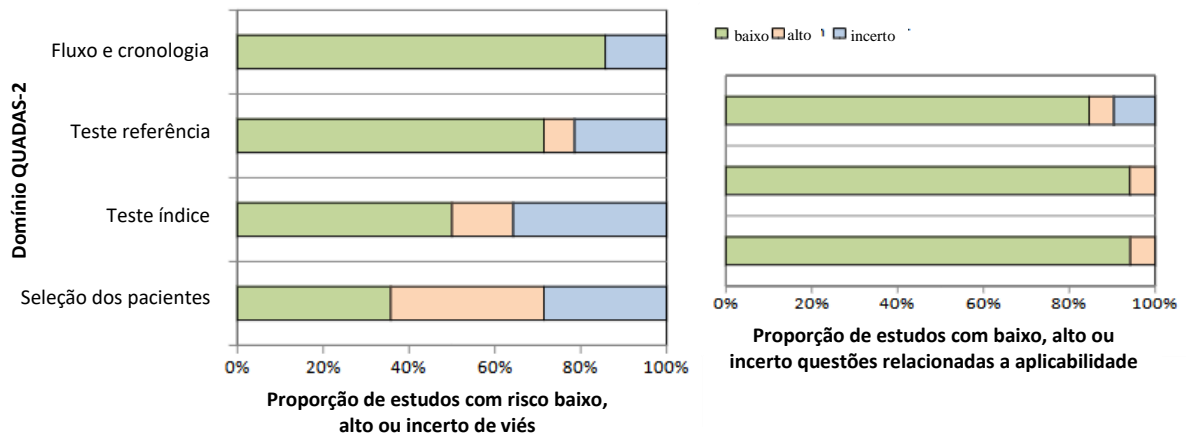
Fonte: do autor com ferramentas QUADAS disponíveis online. Disposição gráfica dos resultados de avaliação da qualidade conforme ferramenta QUADAS em seus 4 domínios (seleção de pacientes, teste índice, teste referência e fluxo de pacientes), a partir da proporção de estudos com baixo, alto ou incerto risco de viés (à esquerda) e a proporção de estudos com baixa, alta ou incerto preocupação relacionada à aplicabilidade (à direita) em cada domínio.

O viés de seleção no grupo ctDNA, mencionado anteriormente, pode ser verificado na interpretação da qualidade dos estudos (Figuras 4, 5 e 6), em que se observa uma menor proporção de estudos com baixo risco de viés em ctDNA em relação a cfDNA, no domínio fluxo de pacientes.

A avaliação de qualidade dos artigos através da ferramenta QUADAS possibilitou comparar visualmente as preocupações relacionadas a vieses citados anteriormente. A exemplo,

no domínio seleção de pacientes, a proporção de baixo risco de viés foi maior para o grupo ctDNA em relação a cfDNA.

Figura 11 - Resultado da avaliação de qualidade dos estudos incluídos na meta-análise do grupo cfDNA.



Fonte: do autor com ferramentas QUADAS disponíveis online. Disposição gráfica dos resultados de avaliação da qualidade conforme ferramenta QUADAS em seus 4 domínios (seleção de pacientes, teste índice, teste referência e fluxo de pacientes), a partir da proporção de estudos com baixo, alto ou incerto risco de viés (à esquerda) e a proporção de estudos com baixa, alta ou incerto preocupação relacionada à aplicabilidade (à direita) em cada domínio.

## CAPÍTULO IV: CONCLUSÕES

A partir da revisão sistemática da literatura com o objetivo de identificar todos os estudos que utilizam métodos quantitativos de avaliação do DNA circulante, obtivemos uma ampla variedade de metodologias e tipos de biomarcador. Duas abordagens se destacaram: a quantificação do DNA circulante total no plasma (cfDNA) e a quantificação de mutações relacionadas ao CCR (ctDNA). As metodologias empregadas na quantificação do cfDNA eram similares e bem estabelecidas, enquanto permanece um desafio estabelecer a melhor metodologia ao agrupar os dados dos estudos ctDNA, pois, nestes, diversas mutações e grupos de mutações foram utilizados. A presente pesquisa não foi capaz de identificar e classificar tais mutações na busca de grupos adequados para as análises de sensibilidade.

Nossa pesquisa propôs uma amplitude nos critérios de seleção, o que permitiu a inclusão de 5 estudos na análise quantitativa, provenientes de uma análise diagnóstica dos dados individuais dos pacientes em cada estudo.

Os parâmetros de heterogeneidade das meta-análises dos grupos cfDNA e ctDNA diferiram ligeiramente do global e entre si, demonstrando uma tendência para uma amostra mais heterogênea no grupo ctDNA. Isto pode ser esperado pela natureza distinta dos desenhos dos estudos neste grupo, conforme comentado anteriormente. Apenas um valor de MOR foi encontrado abaixo de 2, referente a especificidade, no subgrupo de estudos cfDNA, com ponto de corte semelhante. Podemos interpretar que não foi possível encontrar homogeneidade nos subgrupos e análises propostas na presente pesquisa.

As análises apresentadas na presente pesquisa não foram capazes de demonstrar valores de LR+ acima de 10 e LR- abaixo de 0.1 no grupo geral e nos subgrupos.

Infelizmente, nenhuma das análises de subgrupo propostas e análises de sensibilidade foram capazes de demonstrar um resultado global superior àquele alcançado pelo CEA. Em 2015, Nicholson e colegas agruparam os dados de 23 estudos, que atualizaram o ponto de corte mais aplicado na prática de 5ug/ml. A sensibilidade agrupada destes estudos foi de 71% (IC95% 64% - 76%) e uma especificidade agrupada de 88% (IC95% 84% - 92%)(NICHOLSON *et al.*, 2015).

Uma limitação dessa comparação pode ser a atualidade dos dados. Consoante primeira referência de 2015, a prevalência da positividade de recorrência na população dos estudos estava em 29% e a presente pesquisa encontrou uma proporção de 41%. Essa diferença na proporção de casos recorrentes na população pode influenciar a performance diagnóstica percebida nos estudos.

Outra importante limitação da presente pesquisa é a falta de um ponto de corte estabelecido para o cDNA. E com a variabilidade metodológica dos estudos, não foi possível comparar performance diagnóstica de diferentes metodologias na quantificação do cDNA.

Ainda existem desafios relacionados a implementação da quantificação do cDNA na prática clínica do câncer colorretal. Biomarcadores, que quantificam mutações (ctDNA) relacionadas a doença (e.g KRAS, BRAF, PIK3CA), demonstram valores de acurácia (sensibilidade, especificidade, LR+, LR- e DOR) maiores na identificação de recorrências, em relação àqueles biomarcadores que quantificaram o cDNA total (cfDNA). Apesar do desempenho diagnóstico aceitável do cDNA, a partir das evidências disponíveis, não foi possível demonstrar um desempenho diagnóstico melhor ou comparável àquela da dosagem do CEA (> 5ug/ml) na detecção de recorrência do câncer colorretal.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. **O restaurante no fim do universo**. [s.l.] Leya, 2022.
- AGOSTINI, M.; PUCCIARELLI, S.; ENZO, M. V.; DEL BIANCO, P.; BRIARAVA, M.; BEDIN, C.; MARETTO, I.; FRISO, M. L.; LONARDI, S.; MESCOLI, C.; TOPPAN, P.; URSO, E.; NITTI, D. Circulating cell-free DNA: A promising marker of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy. **Annals of Surgical Oncology**, v. 18, n. 9, p. 2461–2468, set. 2011.
- ALLEGRETTI, M.; COTTONE, G.; CARBONI, F.; COTRONEO, E.; CASINI, B.; GIORDANI, E.; AMOREO, C. A.; BUGLIONI, S.; DIODORO, M.; PESCARMONA, E.; ZAZZA, S.; FEDERICI, O.; ZEULI, M.; CONTI, L.; CIGLIANA, G.; FIORENTINO, F.; VALLE, M.; GIACOMINI, P.; SPINELLA, F. Cross-sectional analysis of circulating tumor DNA in primary colorectal cancer at surgery and during post-surgery follow-up by liquid biopsy. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 1, 20 abr. 2020.
- AMATU, A.; SCHIRRIPA, M.; TOSI, F.; LONARDI, S.; BENCARDINO, K.; BONAZZINA, E.; PALMERI, L.; PATANÈ, D. A.; PIZZUTILO, E. G.; MUSSOLIN, B.; BERGAMO, F.; ALBERTI, G.; INTINI, R.; PROCACCIO, L.; ARESE, M.; MARSONI, S.; NICHELATTI, M.; ZAGONEL, V.; SIENA, S.; BARDELLI, A.; LOUPAKIS, F.; DI NICOLANTONIO, F.; SARTORE-BIANCHI, A.; BARAULT, L. High Circulating Methylated DNA Is a Negative Predictive and Prognostic Marker in Metastatic Colorectal Cancer Patients Treated With Regorafenib. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 12 jul. 2019.
- BASNET, S.; ZHANG, Z.-Y.; LIAO, W.-Q.; LI, S.-H.; LI, P.-S.; GE, H.-Y. The Prognostic Value of Circulating Cell-Free DNA in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 9, 2016.
- BEAGAN, J. J.; SLUITER, N. R.; BACH, S.; EIJK, P. P.; VLEK, S. L.; HEIDEMAN, D. A. M.; KUSTERS, M.; PEGTEL, D. M.; KAZEMIER, G.; VAN GRIEKEN, N. C. T.; YLSTRA, B.; TUYNMAN, J. B. Circulating tumor DNA as a preoperative marker of recurrence in patients with peritoneal metastases of colorectal cancer: A clinical feasibility study. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, 1 jun. 2020.
- BEDIN, C.; ENZO, M. V.; DEL BIANCO, P.; PUCCIARELLI, S.; NITTI, D.; AGOSTINI, M. Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 8, p. 1888–1898, 15 abr. 2017.
- BENHAIM, L.; BOUCHÉ, O.; NORMAND, C.; DIDELOT, A.; MULOT, C.; LE CORRE, D.; GARRIGOU, S.; DJADI-PRAT, J.; WANG-RENAULT, S. F.; PEREZ-TORALLA, K.; PEKIN, D.; POULET, G.; LANDI, B.; TAIEB, J.; SELVY, M.; EMILE, J. F.; LECOMTE, T.; BLONS, H.; CHATELLIER, G.; LINK, D. R.; TALY, V.; LAURENT-PUIG, P. Circulating tumor DNA is a prognostic marker of tumor recurrence in stage II and III colorectal cancer: multicentric, prospective cohort study (ALGECOLS). **European Journal of Cancer**, v. 159, p. 24–33, 1 dez. 2021.
- BERGER, A. W.; SCHWERDEL, D.; WELZ, H.; MARIENFELD, R.; SCHMIDT, S. A.; KLEGER, A.; ETTRICH, T. J.; SEUFFERLEIN, T. Treatment monitoring in metastatic colorectal cancer patients by quantification and KRAS genotyping of circulating cell-free DNA.



**PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2017.

BERNABÉ, R.; HICKSON, N.; WALLACE, A.; BLACKHALL, F. H. What do we need to make circulating tumour DNA (ctDNA) a routine diagnostic test in lung cancer? **European journal of cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 81, p. 66–73, 1 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28609695/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

BHANGU, J. S.; TAGHIZADEH, H.; BRAUNSCHMID, T.; BACHLEITNER-HOFMANN, T.; MANNHALTER, C. Circulating cell-free DNA in plasma of colorectal cancer patients - A potential biomarker for tumor burden. **Surgical Oncology**, v. 26, n. 4, p. 395–401, 1 dez. 2017.

BIDARD, F. C.; KIAVUE, N.; YCHOU, M.; CABEL, L.; STERN, M. H.; MADIC, J.; SALIOU, A.; RAMPANOU, A.; DECRAENE, C.; BOUCHÉ, O.; RIVOIRE, M.; GHIRINGHELLI, F.; FRANCOIS, E.; GUIMBAUD, R.; MINEUR, L.; KHEMISSA-AKOUZ, F.; MAZARD, T.; MOUSSATA, D.; PROUDHON, C.; PIERGA, J. Y.; STANBURY, T.; THÉZENAS, S.; MARIANI, P. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA detection in potentially resectable metastatic Colorectal cancer: A prospective ancillary study to the Unicancer Prodig-14 Trial. **Cells**, v. 8, n. 6, 1 jun. 2019.

BOECKX, N.; OP DE BEECK, K.; BEYENS, M.; DESCHOOLMEESTER, V.; HERMANS, C.; DE CLERCQ, P.; GARRIGOU, S.; NORMAND, C.; MONSAERT, E.; PAPADIMITRIOU, K.; LAURENT-PUIG, P.; PAUWELS, P.; VAN CAMP, G.; TALY, V.; PEETERS, M. Mutation and Methylation Analysis of Circulating Tumor DNA Can Be Used for Follow-up of Metastatic Colorectal Cancer Patients. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 17, n. 2, p. e369–e379, 1 jun. 2018.

BONIFACE, C.; DEIG, C.; HALSEY, C.; KELLEY, T.; HESKETT, M. B.; THOMAS, C. R.; SPELLMAN, P. T.; NABAVIZADEH, N. The feasibility of patient-specific circulating tumor dna monitoring throughout multi-modality therapy for locally advanced esophageal and rectal cancer: A potential biomarker for early detection of subclinical disease. **Diagnostics**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2021.

BORAH, R.; BROWN, A. W.; CAPERS, P. L.; KAISER, K. A. Analysis of the time and workers needed to conduct systematic reviews of medical interventions using data from the PROSPERO registry. **BMJ open**, v. 7, n. 2, 1 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28242767/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

BOYSEN, A. K.; JENSEN, M.; NIELSEN, D. T.; MORTENSEN, F. V.; SØRENSEN, B. S.; JENSEN, A. R.; SPINDLER, K. L. Cell-free DNA and chemoembolization in patients with liver metastases from colorectal cancer. **Oncology Letters**, v. 16, n. 2, p. 2654–2660, 1 ago. 2018.

BOYSEN, A. K.; PALLISGAARD, N.; ANDERSEN, C. S. A.; SPINDLER, K. L. G. Circulating tumor DNA as a marker of minimal residual disease following local treatment of metastases from colorectal cancer. **Acta Oncologica**, v. 59, n. 12, p. 1424–1429, 1 dez. 2020a.

BOYSEN, A. K.; SCHOU, J. V.; JENSEN, B. V.; NIELSEN, D.; SØRENSEN, B. S.; JOHANSEN, J. S.; SPINDLER, K. L. G. Prognostic and predictive value of circulating dna for hepatic arterial infusion of chemotherapy for patients with colorectal cancer liver metastases. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 13, n. 6, p. 1–6, 1 dez. 2020b.

BOYSEN, A. K.; WETTERGREN, Y.; SORESENEN, B. S.; TAFLIN, H.; GUSTAVSON, B.; SPINDLER, K. L. G. Cell-free DNA levels and correlation to stage and outcome following treatment of locally advanced rectal cancer. **Tumor Biology**, v. 39, n. 11, 1 out. 2017.

BRAMER, W. M.; GIUSTINI, D.; DE JONGE, G. B.; HOLLAND, L.; BEKHUIS, T. De-duplication of database search results for systematic reviews in EndNote. **Journal of the Medical Library Association : JMLA**, v. 104, n. 3, jul. 2016.

BURRELL, R. A.; MCGRANAHAN, N.; BARTEK, J.; SWANTON, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 338–345, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24048066/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

CABEL, L.; RIVA, F.; SERVOIS, V.; LIVARTOWSKI, A.; DANIEL, C.; RAMPANOU, A.; LANTZ, O.; ROMANO, E.; MILDER, M.; BUECHER, B.; PIPERNO-NEUMANN, S.; BERNARD, V.; BAULANDE, S.; BIECHE, I.; Y. PIERGA, J.; PROUDHON, C.; BIDARD, F. C. Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: A proof-of-concept study. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 8, p. 1996–2001, 1 ago. 2017.

CAMERA, S.; TELLI, T. A.; WOFF, E.; VANDEPUTTE, C.; KEHAGIAS, P.; GUIOT, T.; CRITCHI, G.; WISSAM, Y.; BREGNI, G.; TREVISI, E.; PRETTA, A.; SENTI, C.; LEDUC, S.; GKOLFAKIS, P.; HOERNER, F.; ROTHÉ, F.; SCLAFANI, F.; FLAMEN, P.; DELEPORTE, A.; HENDLISZ, A. Prognostic value of the pace of tumor progression as assessed by serial 18 F-FDG PET/CT scan and liquid biopsy in refractory colorectal cancer: The coriolan trial. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 1–11, 1 out. 2020.

CARPINETTI, P.; DONNARD, E.; BETTONI, F.; ASPRINO, P.; KOYAMA, F.; ROZANSKI, A.; SABBAGA, J.; HABR-GAMA, A.; PARMIGIANI, R. B.; GALANTE, P. A. F.; PEREZ, R. O.; CAMARGO, A. A. The Use of Personalized Biomarkers and Liquid Biopsies to Monitor Treatment Response and Disease Recurrence in Locally Advanced Rectal Cancer after Neoadjuvant Chemoradiation. **Oncotarget**, v. 6, n. 35, p. 38360–38371, nov. 2015.

CASSINOTTI, E.; BONI, L.; SEGATO, S.; RAUSEI, S.; MARZORATI, A.; ROVERA, F.; DIONIGI, G.; DAVID, G.; MANGANO, A.; SAMBUCCI, D.; DIONIGI, R. Free circulating DNA as a biomarker of colorectal cancer. **International Journal of Surgery**, v. 11, n. S1, dez. 2013.

DE SOUSA, M. R.; RIBEIRO, A. L. P. Revisão sistemática e meta-análise de estudos de diagnóstico e prognóstico: um tutorial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92, n. 3, p. 241–251, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/abc/a/fM7by9YHVXjb3GbdnnMcdJv/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

DEEKS, J. J.; ALTMAN, D. G. Statistics notes - Diagnostic tests 4: Likelihood ratios. **British Medical Journal**, v. 329, n. 7458, p. 168–169, 2004.

DEEKS JJ, HIGGINS JPT, A. D. (editors). Chapter 10: Analysing data and undertaking meta-analyses. In: HIGGINS JPT, THOMAS J, CHANDLER J, CUMPSTON M, LI T, PAGE MJ, W. V. (EDITORS). **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.3 (updated February 2022)**. [s.l.] Cochrane, 2022.

DIEFENBACH, R. J.; LEE, J. H.; KEFFORD, R. F.; RIZOS, H. Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA. **Cancer Genetics**, v. 228–229, p. 21–27, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2018.08.005>>.

DIEHL, F.; SCHMIDT, K.; CHOTI, M. A.; ROMANS, K.; GOODMAN, S.; LI, M.; THORNTON, K.; AGRAWAL, N.; SOKOLL, L.; SZABO, S. A.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; DIAZ, L. A. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. **Nature Medicine**, v. 14, n. 9, p. 985–990, set. 2008.

DUMBRAVA, E. E.; CALL, S. G.; HUANG, H. J.; STUCKETT, A. L.; MADWANI, K.; ADAT, A.; HONG, D. S.; PIHA-PAUL, S. A.; SUBBIAH, V.; KARP, D. D.; FU, S.; NAING, A.; TSIMBERIDOU, A. M.; MOULDER, S. L.; KOENIG, K. H.; BARCENAS, C. H.; KEE, B. K.; FOGELMAN, D. R.; KOPETZ, E. S.; MERIC-BERNSTAM, F.; JANKU, F. PIK3CA mutations in plasma circulating tumor DNA predict survival and treatment outcomes in patients with advanced cancers. **ESMO Open**, v. 6, n. 5, 1 out. 2021.

EISENHAUER, E. A.; THERASSE, P.; BOGAERTS, J.; SCHWARTZ, L. H.; SARGENT, D.; FORD, R.; DANCEY, J.; ARBUCK, S.; GWYTHYER, S.; MOONEY, M.; RUBINSTEIN, L.; SHANKAR, L.; DODD, L.; KAPLAN, R.; LACOMBE, D.; VERWEIJ, J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 45, n. 2, jan. 2009.

EL MESSAOUDI, S.; MOULIERE, F.; DU MANOIR, S.; BASCOUL-MOLLEVI, C.; GILLET, B.; NOUAILLE, M.; FIESS, C.; CRAPEZ, E.; BIBEAU, F.; THEILLET, C.; MAZARD, T.; PEZET, D.; MATHONNET, M.; YCHOU, M.; THIERRY, A. R. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 12, p. 3067–3077, 15 jun. 2016.

EL MESSAOUDI, S.; ROLET, F.; MOULIERE, F.; THIERRY, A. R. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 424, p. 222–230, 23 set. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23727028/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

FRATTINI, M.; GALLINO, G.; SIGNORONI, S.; BALESTRA, D.; LUSA, L.; BATTAGLIA, L.; SOZZI, G.; BERTARIO, L.; LEO, E.; PILOTTI, S.; PIEROTTI, M. A. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. **Cancer Letters**, v. 263, n. 2, p. 170–181, 18 maio 2008.

FUJII, T.; BARZI, A.; SARTORE-BIANCHI, A.; CASSINGENA, A.; SIRAVEGNA, G.; KARP, D. D.; PIHA-PAUL, S. A.; SUBBIAH, V.; TSIMBERIDOU, A. M.; HUANG, H. J.; VERONESE, S.; DI NICOLANTONIO, F.; PINGLE, S.; VIBAT, C. R. T.; HANCOCK, S.; BERZ, D.; MELNIKOVA, V. O.; ERLANDER, M. G.; LUTHRA, R.; KOPETZ, E. S.; MERIC-BERNSTAM, F.; SIENA, S.; LENZ, H. J.; BARDELLI, A.; JANKU, F. Mutation-enrichment next-generation sequencing for quantitative detection of KRAS mutations in urine cell-free DNA from patients with advanced cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 14, p. 3657–3666, 15 jul. 2017.

GALVANO, A.; CASTIGLIA, M.; GUARINI, A.; GRISTINA, V.; CUTAIA, S.; BAZAN, V.; RUSSO, A.; CARRECA, I. U. G. O. Cell-free DNA and exoDNA analysis in metastatic colorectal cancer patients (mCRC). **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 15\_suppl, p. e16093–e16093, 20 maio 2020. Disponível em: <[https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15\\_suppl.e16093](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e16093)>.

GARLAN, F.; LAURENT-PUIG, P.; SEFRIQUI, D.; SIAUVE, N.; DIDELOT, A.; SARAFAN-VASSEUR, N.; MICHEL, P.; PERKINS, G.; MULOT, C.; BLONS, H.; TAIEB, J.; DI FIORE, F.; TALY, V.; ZANAN, A. Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL study). **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 18, p. 5416–5425, 15 set. 2017.

GUADALAJARA, H.; DOMÍNGUEZ-BERZOSA, C.; GARCÍA-ARRANZ, M.; HERREROS, M. D.; PASCUAL, I.; SANZ-BARO, R.; GARCÍA-OLMO, D. C.; GARCÍA-OLMO, D. The concentration of deoxyribonucleic acid in plasma from 73 patients with colorectal cancer and apparent clinical correlations. **Cancer Detection and Prevention**, v. 32, n. 1, p. 39–44, 2008.

HAMFJORD, J.; GUREN, T. K.; DAJANI, O.; JOHANSEN, J. S.; GLIMELIUS, B.; SORBYE, H.; PFEIFFER, P.; LINGJÆRDE, O. C.; TVEIT, K. M.; KURE, E. H.; PALLISGAARD, N.; SPINDLER, K. L. G. Total circulating cell-free DNA as a prognostic biomarker in metastatic colorectal cancer before first-line oxaliplatin-based chemotherapy. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 7, p. 1088–1095, 1 jul. 2019.

HAMFJORD, J.; GUREN, T. K.; GLIMELIUS, B.; SORBYE, H.; PFEIFFER, P.; DAJANI, O.; LINGJÆRDE, O. C.; TVEIT, K. M.; PALLISGAARD, N.; SPINDLER, K. L. G.; KURE, E. H. Clinicopathological factors associated with tumour-specific mutation detection in plasma of patients with RAS-mutated or BRAF-mutated metastatic colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 6, p. 1385–1397, 15 set. 2021.

HE, Y.; MA, X.; CHEN, K.; LIU, F.; CAI, S.; HAN-ZHANG, H.; HOU, T.; XIANG, J.; PENG, J. Perioperative circulating tumor dna in colorectal liver metastases: Concordance with metastatic tissue and predictive value for tumor burden and prognosis. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 1621–1630, 2020.

HEDTKE, M.; PESSOA REJAS, R.; FROELICH, M. F.; AST, V.; DUDA, A.; MIRBACH, L.; COSTINA, V.; MARTENS, U. M.; HOFHEINZ, R.-D.; NEUMAIER, M.; HASELMANN, V. Liquid profiling of circulating tumor DNA in colorectal cancer: steps needed to achieve its full clinical value as standard care. **Molecular oncology**, v. 16, n. 10, 2022.

HENRIKSEN, T. V.; TARAZONA, N.; FRYDENDAHL, A.; REINERT, T.; GIMENO-VALIENTE, F.; CARBONELL-ASINS, J. A.; SHARMA, S.; RENNER, D.; HAFEZ, D.; RODA, D.; HUERTA, M.; ROSELLÓ, S.; MADSEN, A. H.; LØVE, U. S.; ANDERSEN, P. V.; THORLACIUS-USSING, O.; IVERSEN, L. H.; GOTSCHALCK, K. A.; SETHI, H.; ALESHIN, A.; CERVANTES, A.; ANDERSEN, C. L. Circulating Tumor DNA in Stage III Colorectal Cancer, beyond Minimal Residual Disease Detection, toward Assessment of Adjuvant Therapy Efficacy and Clinical Behavior of Recurrences. **Clinical Cancer Research**, v. 28, n. 3, p. 507–517, 1 fev. 2022.

HENRIKSEN, T. V.; REINERT, T.; CHRISTENSEN, E.; SETHI, H.; BIRKENKAMP-DEMTRÖDER, K.; GÖGENUR, M.; GÖGENUR, I.; ZIMMERMANN, B. G.; IMPROVE STUDY GROUP; DYRSKJØT, L.; ANDERSEN, C. L. The effect of surgical trauma on circulating free DNA levels in cancer patients-implications for studies of circulating tumor DNA. **Molecular oncology**, v. 14, n. 8, 2020.

HERRMANN, S.; ZHAN, T.; BETGE, J.; RAUSCHER, B.; BELLE, S.; GUTTING, T.; SCHULTE, N.; JESENOFSKY, R.; HÄRTEL, N.; GAISER, T.; HOFHEINZ, R. D.; EBERT, M. P.; BOUTROS, M. Detection of mutational patterns in cell-free DNA of colorectal cancer by custom amplicon sequencing. **Molecular Oncology**, v. 13, n. 8, p. 1669–1683, 1 ago. 2019.

HIGGINS, J. P. T.; ALTMAN, D. G.; GÖTZSCHE, P. C.; JÜNI, P.; MOHER, D.; OXMAN, A. D.; SAVOVIC, J.; SCHULZ, K. F.; WEEKS, L.; STERNE, J. A. C.; COCHRANE BIAS METHODS GROUP; COCHRANE STATISTICAL METHODS GROUP. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 343, 18 out. 2011.

HOLM, M.; ANDERSSON, E.; OSTERLUND, E.; OVISSI, A.; SOVERI, L. M.; ANTONEN, A. K.; KYTÖLÄ, S.; AITTOMÄKI, K.; OSTERLUND, P.; RISTIMÄKI, A. Detection of KRAS mutations in liquid biopsies from metastatic colorectal cancer patients using droplet digital PCR, Idylla, and next generation sequencing. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11 November, 1 nov. 2020.

HSU, H. C.; LAPKE, N.; WANG, C. W.; LIN, P. Y.; YOU, J. F.; YEH, C. Y.; TSAI, W. S.; HUNG, H. Y.; CHIANG, S. F.; CHEN, H. C.; CHEN, S. J.; HSU, A.; YANG, T. S. Targeted sequencing of circulating tumor DNA to monitor genetic variants and therapeutic response in metastatic colorectal cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 17, n. 10, p. 2238–2247, 2018.

HUFNAGL, C.; LEISCH, M.; WEISS, L.; MELCHARDT, T.; MOIK, M.; ASSLABER, D.; ROLAND, G.; STEININGER, P.; MEISSNITZER, T.; NEUREITER, D.; GREIL, R.; EGGLE, A. Evaluation of circulating cell-free DNA as a molecular monitoring tool in patients with metastatic cancer. **Oncology Letters**, v. 19, n. 2, p. 1551–1558, 2020.

INCA. **Estadiamento**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer/estadiamento>>. Acesso em: 19 abr. 2023.

INCA. **Deteção Precoce do Câncer**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://controlecancer.bvs.br/>>. Acesso em: 11 nov. 2022.

IWAI, T.; YAMADA, T.; KAN, H.; MATUMOTO, S.; KOIZUMI, M.; SHINJI, S.; MATUDA, A.; YOKOYAMA, Y.; TAKAHASHI, G.; WATANABE, A.; NAKAYAMA, M.; SHIRO, K.; UCHIDA, E. 434 Follow-up after resection of metastatic liver tumor from colorectal cancer using circulating cell-free DNA. **European Journal of Cancer**, v. 51, p. S90, set. 2015.

IWAI, T.; YAMADA, T.; TAKAHASHI, G.; MATSUMOTO, S.; KOIZUMI, M.; SHINJI, S.; MATSUDA, A.; YOKOYAMA, Y.; HARA, K.; TAKEDA, K.; NAKAYAMA, M.; KITANO, S.; OHTA, K.; UCHIDA, E. Circulating cell-free DNA can predict relapse after resection of metastatic liver tumors from colorectal cancer. **Annals of Oncology**, v. 27, p. vi19, out. 2016.

IWAI, T.; YAMADA, T.; TAKAHASHI, G.; TAKEDA, K.; KOIZUMI, M.; SHINJI, S.; MATSUDA, A.; YOKOYAMA, Y.; HARA, K.; UEDA, K.; OHTA, R.; TANIAI, N.; YOSHIDA, H. Circulating cell-free long DNA fragments predict post-hepatectomy recurrence of colorectal liver metastases. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 46, n. 1, p. 108–114, 1 jan. 2020.

JANKU, F.; HUANG, H. J.; CLAES, B.; FALCHOOK, G. S.; FU, S.; HONG, D.; RAMZANALI, N. M.; NITTI, G.; CABRILO, G.; TSIMBERIDOU, A. M.; NAING, A.; PIHA-PAUL, S. A.; WHELER, J. J.; KARP, D. D.; HOLLEY, V. R.; ZINNER, R. G.; SUBBIAH, V.; LUTHRA, R.; KOPETZ, S.; OVERMAN, M. J.; KEE, B. K.; PATEL, S.; DEVOGELAERE, B.; SABLON, E.; MAERTENS, G.; MILLS, G. B.; KURZROCK, R.; MERIC-BERNSTAM, F. BRAF Mutation testing in cell-free DNA from the plasma of patients with advanced cancers using a rapid, automated molecular diagnostics system. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 15, n. 6, p. 1397–1404, 1 jun. 2016.

JANOWSKI, E.; TIMOFEEVA, O.; CHASOVSKIKH, S.; GOLDBERG, M.; KIM, A.; BANOVA, F.; PANG, D.; DRITSCHILO, A.; UNGER, K. Yttrium-90 radioembolization for colorectal cancer liver metastases in KRAS wild-type and mutant patients: Clinical and ccfDNA studies. **Oncology Reports**, v. 37, n. 1, p. 57–65, 1 jan. 2017.

JENSEN, L. H.; OLESEN, R.; PETERSEN, L. N.; BOYSEN, A. K.; ANDERSEN, R. F.; LINDEBJERG, J.; NOTTELMANN, L.; THOMSEN, C. E. B.; HAVELUND, B. M.; JAKOBSEN, A.; HANSEN, T. F. NPY Gene Methylation as a Universal, Longitudinal Plasma Marker for Evaluating the Clinical Benefit from Last-Line Treatment with Regorafenib in Metastatic Colorectal Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 11, p. 1649, 25 out. 2019.

JIA, N.; CHANG, L.; GAO, X.; SHI, X.; DOU, X.; GUAN, M.; SHAO, Y.; LI, N.;

CHENG, Y.; YING, H.; SUN, Z.; ZHOU, Y.; ZHAO, L.; ZHOU, J.; BAI, C. Association of emergence of new mutations in circulating tumor DNA during chemotherapy with clinical outcome in metastatic colorectal cancer. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.

JIA, N.; SUN, Z.; GAO, X.; CHENG, Y.; ZHOU, Y.; SHEN, C.; CHEN, W.; WANG, X.; SHI, R.; LI, N.; ZHOU, J.; BAI, C. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with metastatic colorectal cancer to predict the therapeutic response. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. MAY, 2019.

KHAKOO, S.; CARTER, P. D.; BROWN, G.; VALERI, N.; PICCHIA, S.; BALI, M. A.; SHAIKH, R.; JONES, T.; BEGUM, R.; RANA, I.; WOTHERSPOON, A.; TERLIZZO, M.; VON LOGA, K.; KALAITZAKI, E.; SAFFERY, C.; WATKINS, D.; TAIT, D.; CHAU, I.; STARLING, N.; HUBANK, M.; CUNNINGHAM, D. MRI tumor regression grade and circulating tumor DNA as complementary tools to assess response and guide therapy adaptation in rectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 1, p. 183–192, 1 jan. 2020.

KITAHARA, M.; HAZAMA, S.; TSUNEDOMI, R.; TAKENOUCI, H.; KANEKIYO, S.; INOUE, Y.; NAKAJIMA, M.; TOMOCHIKA, S.; TOKUHISA, Y.; IIDA, M.; SAKAMOTO, K.; SUZUKI, N.; TAKEDA, S.; UENO, T.; YAMAMOTO, S.; YOSHINO, S.; NAGANO, H. Prediction of the efficacy of immunotherapy by measuring the integrity of cell-free DNA in plasma in colorectal cancer. **Cancer Science**, v. 107, n. 12, p. 1825–1829, 1 dez. 2016.

KLEIN-SCORY, S.; MASLOVA, M.; POHL, M.; EILERT-MICUS, C.; SCHROERS, R.; SCHMIEGEL, W.; BARANISKIN, A. Significance of Liquid Biopsy for Monitoring and Therapy Decision of Colorectal Cancer. **Translational Oncology**, v. 11, n. 2, p. 213–220, 1 abr. 2018.

KLEIN-SCORY, S.; WAHNER, I.; MASLOVA, M.; AL-SEWAIDI, Y.; POHL, M.; MIKA, T.; LADIGAN, S.; SCHROERS, R.; BARANISKIN, A. Evolution of RAS Mutational Status in Liquid Biopsies During First-Line Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 16 jul. 2020.

KOMATSUBARA, K. M.; SACHER, A. G. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy: Current Clinical Applications and Future Directions. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 31, n. 8, 15 ago. 2017.

KULIGINA, E.; MOISEYENKO, F.; BELUKHIN, S.; STEPANOVA, E.; ZAKHAROVA, M.; CHERNOBRIVTSEVA, V.; ALIEV, I.; SHARABURA, T.; MOISEYENKO, V.; ALEKSAKHINA, S.; LAIDUS, T.; MARTIANOV, A.; KHOLMATOV, M.; WHITEHEAD, A.; YANUS, G.; IMYANITOV, E. Tumor irradiation may facilitate the detection of tumor-specific mutations in plasma. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 12, p. 1215–1226, 24 dez. 2021a.

KULIGINA, E. S.; MEEROVICH, R.; ZAGORODNEV, K. A.; KHOLMATOV, M. M.; SOKOLOVA, T. N.; LAIDUS, T. A.; ROMANKO, A. A.; MARTIANOV, A. S.; ANISIMOVA, M. O.; ZAITSEVA, O. A.; YATSUK, O. S.; YANUS, G. A.; IMYANITOV, E. N. Content of circulating tumor DNA depends on the tumor type and the dynamics of tumor size, but is not influenced significantly by physical exercise, time of the day or recent meal. **Cancer Genetics**, v. 256–257, p. 165–178, 1 ago. 2021b.

LAN, Y.-T.; CHEN, M.-H.; FANG, W.-L.; HSIEH, C.-C.; LIN, C.-H.; JHANG, Y.; YANG, S.-H.; LIN, J.-K.; CHEN, W.-S.; JIANG, J.-K.; LIN, P.-C.; CHANG, S.-C. **Clinical relevance of cell-free DNA in gastrointestinal tract malignancy** *Oncotarget*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)>.

LECOMTE, T.; BERGER, A.; ZINZINDOHOUE, F.; MICARD, S.; LANDI, B.; BLONS, H.; BEAUNE, P.; CUGNENC, P. H.; LAURENT-PUIG, P. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. **International Journal of Cancer**, v. 100, n. 5, p. 542–548, 10 ago. 2002.

LECOMTE, T.; CEZE, N.; DORVAL, E.; LAURENT-PUIG, P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. **Gastroenterologie clinique et biologique**, v. 34, n. 12, p. 662–681, dez. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20832215/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

LI, J.; DITTMAR, R. L.; XIA, S.; ZHANG, H.; DU, M.; HUANG, C. C.; DRULINER, B. R.; BOARDMAN, L.; WANG, L. Cell-free DNA copy number variations in plasma from colorectal cancer patients. **Molecular Oncology**, v. 11, n. 8, p. 1099–1111, 1 ago. 2017.

LIM, Y.; KIM, S.; KANG, J. K.; KIM, H. P.; JANG, H.; HAN, H.; KIM, H.; KIM, M. J.; LEE, K. H.; RYOO, S. B.; PARK, J. W.; JEONG, S. Y.; PARK, K. J.; KANG, G. H.; HAN, S. W.; KIM, T. Y. Circulating tumor DNA sequencing in colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy with anti-EGFR. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

LIN, J. K.; LIN, P. C.; LIN, C. H.; JIANG, J. K.; YANG, S. H.; LIANG, W. Y.; CHEN, W. S.; CHANG, S. C. Clinical Relevance of Alterations in Quantity and Quality of Plasma DNA in Colorectal Cancer Patients: Based on the Mutation Spectra Detected in Primary Tumors. **Annals of Surgical Oncology**, v. 21, n. 4, p. 680–686, 2014.

LIU, R.; ZHAO, X.; GUO, W.; HUANG, M.; QIU, L.; ZHANG, W.; ZHANG, Z.; LI, W.; ZHU, X.; CHEN, Z. Dynamic monitoring of HER2 amplification in circulating DNA of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. **Clinical and Translational Oncology**, v. 22, n. 6, 30 jun. 2020.

LUEONG, S. S.; HERBST, A.; LIFFERS, S. T.; BIELEFELD, N.; HORN, P. A.; TANNAPFEL, A.; REINACHER-SCHICK, A.; HINKE, A.; HEGEWISCH-BECKER, S.; KOLLIGS, F. T.; SIVEKE, J. T. Serial Circulating Tumor DNA Mutational Status in Patients with KRAS-Mutant Metastatic Colorectal Cancer from the Phase 3 AIO KRK0207 Trial. **Clinical Chemistry**, v. 66, n. 12, p. 1510–1520, 1 dez. 2020.

LYSKJÆR, I.; KRONBORG, C. S.; RASMUSSEN, M. H.; SØRENSEN, B. S.; DEMUTH, C.; ROSENKILDE, M.; JOHANSEN, A. F. B.; KNUDSEN, M.; VANG, S.; KRAG, S. R. P.; SPINDLER, K. L. G.; ANDERSEN, C. L. Correlation between early dynamics in circulating tumour DNA and outcome from FOLFIRI treatment in metastatic colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

MA, X. M.; BENDELL, J. C.; HURWITZ, H. I.; JU, C.; LEE, J. J.; LOVEJOY, A.; MANCAO, C.; NICHOLAS, A.; PRICE, R.; SOMMER, N.; TIKOO, N.; YAO, L.; YAUNG, S. J.; PALMA, J. F. Disease Monitoring Using Post-induction Circulating Tumor DNA Analysis following First-Line Therapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 15, p. 4010–4017, 1 ago. 2020.

MANCA, P.; CORALLO, S.; BUSICO, A.; LONARDI, S.; CORTI, F.; ANTONIOTTI, C.; PROCACCIO, L.; CLAVAREZZA, M.; SMIROLDO, V.; TOMASELLO, G.; MURIALDO, R.; SARTORE-BIANCHI, A.; RACCA, P.; PAGANI, F.; RANDON, G.; MARTINETTI, A.; SOTTOTETTI, E.; PALERMO, F.; PERRONE, F.; TAMBORINI, E.; PRISCIANDARO, M.; RAIMONDI, A.; DI BARTOLOMEO, M.; MORANO, F.; PIETRANTONIO, F. The added value of baseline circulating tumor DNA profiling in patients with molecularly hyperselected, left-sided metastatic colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 9, p. 2505–2514, 1 maio 2021.

MCDUFF, S. G. R.; HARDIMAN, K. M.; PETER, ; ULINTZ, J.; PARIKH, A. R.; ZHENG, ; Hui; DANIEL, ; KIM, W.; LENNERZ, J. K.; MEHLIKA HAZAR-RETHINAM, ; VAN SEVENTER, E. E.; FETTER, I. J.; NADRES, B.; EYLER, C. E.; DAVID, ; RYAN, P.; WEEKES, C. D.; CLARK, J. W.; CUSACK, J. C.; LIPIKA GOYAL, ; ZHU, A. X.; WO, J. Y.; LAWRENCE, ; BLASZKOWSKY, S.; ALLEN, J.; CORCORAN, R. B.; HONG, T. S. Circulating Tumor DNA Predicts Pathologic and Clinical Outcomes Following Neoadjuvant Chemoradiation and Surgery for Patients With Locally Advanced Rectal Cancer. **JCO Precis Oncol**, v. 5, p. 123–132, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1200/JCO.2020.39.12.123>>.

MOATI, E.; BLONS, H.; TALY, V.; GARLAN, F.; WANG-RENAULT, S. F.; PIETRASZ, D.; DIDELOT, A.; GARRIGOU, S.; SAINT, A.; PERNOT, S.; TAIEB, J.; LAURENT-PUIG, P.; ZANANAN, A. Plasma clearance of RAS mutation under therapeutic pressure is a rare event in metastatic colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 4, p. 1185–1189, 15 ago. 2020.

MOHER, D.; BOOTH, A.; STEWART, L. How to reduce unnecessary duplication: use PROSPERO. **BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 121, n. 7, p. 784–786, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24629162/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G.; ALTMAN, D.; ANTES, G.; ATKINS, D.; BARBOUR, V.; BARROWMAN, N.; BERLIN, J. A.; CLARK, J.; CLARKE, M.; COOK, D.; D'AMICO, R.; DEEKS, J. J.; DEVEREAUX, P. J.; DICKERSIN, K.; EGGER, M.; ERNST, E.; GÖTZSCHE, P. C.; GRIMSHAW, J.; GUYATT, G.; HIGGINS, J.; IOANNIDIS, J. P. A.; KLEIJNEN, J.; LANG, T.; MAGRINI, N.; MCNAMEE, D.; MOJA, L.; MULROW, C.; NAPOLI, M.; OXMAN, A.; PHAM, B.; RENNIE, D.; SAMPSON, M.; SCHULZ, K. F.; SHEKELLE, P. G.; TOVEY, D.; TUGWELL, P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 7, jul. 2009a.

MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G.; PRISMA GROUP. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **Journal of clinical epidemiology**, v. 62, n. 10, out. 2009b.

MOSER, T.; WALDISPUEHL-GEIGL, J.; BELIC, J.; WEBER, S.; ZHOU, Q.; HASENLEITHNER, S. O.; GRAF, R.; TERZIC, J. A.; POSCH, F.; SILL, H.; LAX, S.; KASHOFER, K.; HOEFLER, G.; SCHOELLNAST, H.; HEITZER, E.; GEIGL, J. B.; BAUERNHOFER, T.; SPEICHER, M. R. On-treatment measurements of circulating tumor DNA during FOLFOX therapy in patients with colorectal cancer. **npj Precision Oncology**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2020.

MURAHASHI, S.; AKIYOSHI, T.; SANO, T.; FUKUNAGA, Y.; NODA, T.; UENO, M.; ZEMBUTSU, H. Serial circulating tumour DNA analysis for locally advanced rectal cancer treated with preoperative therapy: prediction of pathological response and postoperative recurrence. **British Journal of Cancer**, v. 123, n. 5, p. 803–810, 1 set. 2020.

NHS. **Guidelines for CEA requesting**. Disponível em: <[https://www.nbt.nhs.uk/sites/default/files/Guidelines for CEA Requesting.pdf](https://www.nbt.nhs.uk/sites/default/files/Guidelines%20for%20CEA%20Requesting.pdf)>.

NICHOLSON, B. D.; SHINKINS, B.; PATHIRAJA, I.; ROBERTS, N. W.; JAMES, T. J.; MALLETT, S.; PERERA, R.; PRIMROSE, J. N.; MANT, D. Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 2015, n. 12, 10 dez. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26661580/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.



OLIVEIRA, I. B. D. de; HIRATA, R. D. C. Circulating cell-free DNA as a biomarker in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, 7 jun. 2018. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-82502018000100406&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502018000100406&lng=en&tlng=en)>.

ØRNTOFT, M.-B. W.; JENSEN, S. Ø.; ØGAARD, N.; HENRIKSEN, T. V.; FERM, L.; CHRISTENSEN, I. J.; REINERT, T.; LARSEN, O. H.; NIELSEN, H. J.; ANDERSEN, C. L. Age-stratified reference intervals unlock the clinical potential of circulating cell-free DNA as a biomarker of poor outcome for healthy individuals and patients with colorectal cancer. **International journal of cancer**, v. 148, n. 7, 2021.

OSUMI, H.; SHINOZAKI, E.; YAMAGUCHI, K.; ZEMBUTSU, H. Early change in circulating tumor DNA as a potential predictor of response to chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

OUZZANI, M.; HAMMADY, H.; FEDOROWICZ, E. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. **Systematic Reviews**, v. 5, n. 1, p. 210, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>>.

PAES, A. Por Dentro da Estatística. nov. 2008.

PAIRAWAN, S.; HESS, K. R.; JANKU, F.; SANCHEZ, N. S.; SHAW, K. R. M.; ENG, C.; DAMODARAN, S.; JAVLE, M.; KASEB, A. O.; HONG, D. S.; SUBBIAH, V.; FU, S.; FOGELMAN, D. R.; RAYMOND, V. M.; LANMAN, R. B.; MERIC-BERNSTAM, F. Cell-free circulating tumor DNA variant allele frequency associates with survival in metastatic cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 8, p. 1924–1931, 15 abr. 2020.

PAN, X.; ZHANG, X. Utility of circulating tumor cells and DNA in the management of advanced colorectal cancer. **Future Oncology**, v. 16, n. 18, p. 1289–1299, 1 jun. 2020.

PASTOR, B.; ANDRÉ, T.; HENRIQUES, J.; TROUILLOU, I.; TOURNIGAND, C.; JARY, M.; MAZARD, T.; LOUVET, C.; AZAN, S.; BAUER, A.; ROCH, B.; SANCHEZ, C.; VERNEREY, D.; THIERRY, A. R.; ADENIS, A. Monitoring levels of circulating cell-free DNA in patients with metastatic colorectal cancer as a potential biomarker of responses to regorafenib treatment. **Molecular Oncology**, v. 15, n. 9, p. 2401–2411, 1 set. 2021.

PERKINS, G.; YAP, T. A.; POPE, L.; CASSIDY, A. M.; DUKES, J. P.; RIISNAES, R.; MASSARD, C.; CASSIER, P. A.; MIRANDA, S.; CLARK, J.; DENHOLM, K. A.; THWAY, K.; GONZALEZ DE CASTRO, D.; ATTARD, G.; MOLIFE, L. R.; KAYE, S. B.; BANERJI, U.; DE BONO, J. S. Multi-Purpose Utility of Circulating Plasma DNA Testing in Patients with Advanced Cancers. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 7 nov. 2012.

PETIT, J.; CARROLL, G.; GOULD, T.; POCKNEY, P.; DUN, M.; SCOTT, R. J. Cell-Free DNA as a Diagnostic Blood-Based Biomarker for Colorectal Cancer: A Systematic Review. **The Journal of surgical research**, v. 236, p. 184–197, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30694754/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

PHALLEN, J.; SAUSEN, M.; ADLEFF, V.; LEAL, A.; HRUBAN, C.; WHITE, J.; ANAGNOSTOU, V.; FIKSEL, J.; CRISTIANO, S.; PAPP, E.; SPEIR, S.; REINERT, T.; ØRNTOFT, M. B. W.; WOODWARD, B. D.; MURPHY, D.; PARPART-LI, S.; RILEY, D.; NESSELBUSH, M.; SENGAMALAY, N.; GEORGIADIS, A.; LI, Q. K.; MADSEN, M. R.; MORTENSEN, F. V.; HUISKENS, J.; PUNT, C.; VAN GRIEKEN, N.; FIJNEMAN, R.; MEIJER, G.; HUSAIN, H.; SCHARPF, R. B.; DIAZ, L. A.; JONES, S.; ANGIUOLI, S.; ØRNTOFT, T.; NIELSEN, H. J.; ANDERSEN, C. L.; VELCULESCU, V. E. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. **Science Translational Medicine**, v. 9, n.

403, 16 ago. 2017.

PLANA, M. N.; AREVALO-RODRIGUEZ, I.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, S.; SOTO, J.; FABREGATE, M.; PÉREZ, T.; ROQUÉ, M.; ZAMORA, J. Meta-DiSc 2.0: a web application for meta-analysis of diagnostic test accuracy data. **BMC Medical Research Methodology**, v. 22, n. 1, p. 1–8, 2022.

PLANA, M. N.; PÉREZ, T.; ZAMORA, J. New measures improved the reporting of heterogeneity in diagnostic test accuracy reviews: a metaepidemiological study. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 131, p. 101–112, 2021.

POLIVKA, J.; WINDRICOVA, J.; PESTA, M.; HOUFKOVA, K.; REZACKOVA, H.; MACANOVA, T.; VYCITAL, O.; KUCERA, R.; SLOUKA, D.; TOPOLCAN, O. The level of preoperative plasma kras mutations and cea predict survival of patients undergoing surgery for colorectal cancer liver metastases. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 1–18, 1 set. 2020.

REINERT, T.; HENRIKSEN, T. V.; CHRISTENSEN, E.; SHARMA, S.; SALARI, R.; SETHI, H.; KNUDSEN, M.; NORDENTOFT, I.; WU, H. T.; TIN, A. S.; HEILSKOV RASMUSSEN, M.; VANG, S.; SHCHEGROVA, S.; FRYDENDAHL BOLL JOHANSEN, A.; SRINIVASAN, R.; ASSAF, Z.; BALCIOGLU, M.; OLSON, A.; DASHNER, S.; HAFEZ, D.; NAVARRO, S.; GOEL, S.; RABINOWITZ, M.; BILLINGS, P.; SIGURJONSSON, S.; DYRSKJØT, L.; SWENERTON, R.; ALESHIN, A.; LAURBERG, S.; HUSTED MADSEN, A.; KANNERUP, A. S.; STRIBOLT, K.; KRAG, S. P.; IVERSEN, L. H.; SUNESEN, K. G.; LIN, C. H. J.; ZIMMERMANN, B. G.; ANDERSEN, C. L. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients with Stages I to III Colorectal Cancer. **JAMA Oncology**, v. 5, n. 8, p. 1124–1131, 1 ago. 2019.

REINERT, T.; SCHØLER, L. V.; THOMSEN, R.; TOBIASEN, H.; VANG, S.; NORDENTOFT, I.; LAMY, P.; KANNERUP, A. S.; MORTENSEN, F. V.; STRIBOLT, K.; HAMILTON-DUTOIT, S.; NIELSEN, H. J.; LAURBERG, S.; PALLISGAARD, N.; PEDERSEN, J. S.; ØRNTOFT, T. F.; ANDERSEN, C. L. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. **Gut**, v. 65, n. 4, p. 625–634, 1 abr. 2016.

ROBIN, J. D.; LUDLOW, A. T.; LA RANGER, R.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. Comparison of DNA quantification methods for next generation sequencing. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep24067>>.

RUSSO, M.; SIRAVEGNA, G.; BLASZKOWSKY, L. S.; CORTI, G.; CRISAFULLI, G.; AHRONIAN, L. G.; MUSSOLIN, B.; KWAK, E. L.; BUSCARINO, M.; LAZZARI, L.; VALTORTA, E.; TRUINI, M.; JESSOP, N. A.; ROBINSON, H. E.; HONG, T. S.; MINO-KENUDSON, M.; DI NICOLANTONIO, F.; THABET, A.; SARTORE-BIANCHI, A.; SIENA, S.; IAFRATE, J.; BARDELLI, A.; CORCORAN, R. B. Tumor heterogeneity and Lesion-Specific response to targeted therapy in colorectal cancer. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 2, p. 147–153, 1 fev. 2016.

RYKOVA, E. Y.; MOROZKIN, E. S.; PONOMARYOVA, A. A.; LOSEVA, E. M.; ZAPOROZHCHENKO, I. A.; CHERDYNTSEVA, N. V.; VLASSOV, V. V.; LAKTIONOV, P. P. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: Mechanisms of generation, concentration and content. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. SUPPL. 1, jun. 2012.

SARMA, D. P. **The Dukes classification of colorectal cancer.** *JAMA* United States. set. 1986.

SATO, K. A.; HACHIYA, T.; IWAYA, T.; KUME, K.; MATSUO, T.; KAWASAKI,

K.; ABIKO, Y.; AKASAKA, R.; MATSUMOTO, T.; OTSUKA, K.; NISHIZUKA, S. S. Individualized mutation detection in circulating tumor DNA for monitoring colorectal tumor burden using a cancer-associated gene sequencing panel. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 4 jan. 2016.

SCHØLER, L. V.; REINERT, T.; ØRNTOFT, M. B. W.; KASSENTOFT, C. G.; ARNADØTTIR, S. S.; VANG, S.; NORDENTOFT, I.; KNUDSEN, M.; LAMY, P.; ANDREASEN, D.; MORTENSEN, F. V.; KNUDSEN, A. R.; STRIBOLT, K.; SIVESGAARD, K.; MOURITZEN, P.; NIELSEN, H. J.; LAURBERG, S.; ØRNTOFT, T. F.; ANDERSEN, C. L. Clinical implications of monitoring circulating Tumor DNA in patients with colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 18, p. 5437–5445, 15 set. 2017.

SCHOU, J. V.; LARSEN, F. O.; SØRENSEN, B. S.; ABRANTES, R.; BOYSEN, A. K.; JOHANSEN, J. S.; JENSEN, B. V.; NIELSEN, D. L.; SPINDLER, K. L. Circulating cell-free DNA as predictor of treatment failure after neoadjuvant chemo-radiotherapy before surgery in patients with locally advanced rectal cancer. **Annals of Oncology**, v. 29, n. 3, p. 610–615, 1 mar. 2018.

SCHWARZENBACH, H.; HOON, D. S. B.; PANTEL, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 6, p. 426–437, jun. 2011.

SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. e I. E. em S. (Brasil). C.-G. de G. do C. Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de estudos de acurácia diagnóstica. p. 115–115, 2014a. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_metodologicas\\_estudos\\_acuracia\\_diagnostica.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_metodologicas_estudos_acuracia_diagnostica.pdf)>. Acesso em: 25 nov. 2022.

SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. e I. E. em S. (Brasil). C.-G. de G. do C. PORTARIA Nº 958, DE 26 DE SETEMBRO DE 2014. 29 set. 2014b.

SEFRIQUI, D.; BEAUSSIRE, L.; GILLIBERT, A.; BLANCHARD, F.; TOURE, E.; BAZILLE, C.; PERDRIX, A.; ZIEGLER, F.; GANGLOFF, A.; HASSINE, M.; ELIE, C.; BIGNON, A. L.; PARZY, A.; GOMEZ, P.; THILL, C.; CLATOT, F.; SABOURIN, J. C.; FREBOURG, T.; BENICHOU, J.; BOUHIER-LEPORRIER, K.; GALLAIS, M. P.; SARAFAN-VASSEUR, N.; MICHEL, P.; DI FIORE, F. CEA, CA19-9, circulating DNA and circulating tumour cell kinetics in patients treated for metastatic colorectal cancer (mCRC). **British Journal of Cancer**, v. 125, n. 5, p. 725–733, 31 ago. 2021.

SEFRIQUI, D.; SARAFAN-VASSEUR, N.; BEAUSSIRE, L.; BARETTI, M.; GANGLOFF, A.; BLANCHARD, F.; CLATOT, F.; SABOURIN, J.-C.; SESBOÛÉ, R.; FREBOURG, T.; MICHEL, P.; DI FIORE, F. Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer. **Digestive and Liver Disease**, v. 47, n. 10, out. 2015.

SIRAVEGNA, G.; MUSSOLIN, B.; BUSCARINO, M.; CORTI, G.; CASSINGENA, A.; CRISAFULLI, G.; PONZETTI, A.; CREMOLINI, C.; AMATU, A.; LAURICELLA, C.; LAMBA, S.; HOBOR, S.; AVALLONE, A.; VALTORTA, E.; ROSPO, G.; MEDICO, E.; MOTTA, V.; ANTONIOTTI, C.; TATANGELO, F.; BELLOSILLO, B.; VERONESE, S.; BUDILLON, A.; MONTAGUT, C.; RACCA, P.; MARSONI, S.; FALCONE, A.; CORCORAN, R. B.; DI NICOLANTONIO, F.; LOUPAKIS, F.; SIENA, S.; SARTORE-BIANCHI, A.; BARDELLI, A. **Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients** *Nature Medicine* Nature Publishing Group, 9 jul. 2015.

SIRAVEGNA, G.; SARTORE-BIANCHI, A.; NAGY, R. J.; RAGHAV, K.; ODEGAARD, J. I.; LANMAN, R. B.; TRUSOLINO, L.; MARSONI, S.; SIENA, S.; BARDELLI, A. Plasma HER2 (ERBB2) copy number predicts response to HER2-targeted

therapy in metastatic colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 10, p. 3046–3053, 2019.

SONG, H. S.; KANG, D. H.; KIM, H.; AHN, T. S.; KIM, T. W.; BAEK, M.-J. Clinical relevance and prognostic role of preoperative cell-free single-stranded DNA concentrations in colorectal cancer patients. **Korean Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 2, p. 59–67, 31 dez. 2021.

SPERR, E. **PubMed by Year**. Disponível em: <[https://esperr.github.io/pubmed-by-year/index.html?q1=colorectal cancer AND \(plasma DNA OR circulating DNA OR cfDNA OR ccfDNA OR cell-free DNA OR cell free DNA\)](https://esperr.github.io/pubmed-by-year/index.html?q1=colorectal+cancer+AND+(plasma+DNA+OR+circulating+DNA+OR+cfDNA+OR+ccfDNA+OR+cell-free+DNA+OR+cell+free+DNA)>)>. Acesso em: 29 out. 2022.

SPINDLER, K.-L. G.; BOYSEN, A. K.; PALLISGÅRD, N.; JOHANSEN, J. S.; TABERNERO, J.; SØRENSEN, M. M.; JENSEN, B. V.; HANSEN, T. F.; SEFRIQUI, D.; ANDERSEN, R. F.; BRANDSLUND, I.; JAKOBSEN, A. Cell-Free DNA in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The oncologist**, v. 22, n. 9, 2017.

SPINDLER, K.-L. G.; PALLISGAARD, N.; ANDERSEN, R. F.; PLOEN, J.; JAKOBSEN, A. Gemcitabine and capecitabine for heavily pre-treated metastatic colorectal cancer patients--a phase II and translational research study. **Anticancer research**, v. 34, n. 2, fev. 2014a.

SPINDLER, K. L. G.; APPELT, A. L.; PALLISGAARD, N.; ANDERSEN, R. F.; BRANDSLUND, I.; JAKOBSEN, A. Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 12, p. 2984–2991, 15 dez. 2014b.

SPINDLER, K. L. G.; DEMUTH, C.; SORENSEN, B. S.; JOHANSEN, J. S.; NIELSEN, D.; PALLISGAARD, N.; HOEGDALL, E.; PFEIFFER, P.; VITTRUP JENSEN, B. Total cell-free DNA, carcinoembryonic antigen, and C-reactive protein for assessment of prognosis in patients with metastatic colorectal cancer. **Tumor Biology**, v. 40, n. 11, 1 nov. 2018.

SPINDLER, K. L. G.; PALLISGAARD, N.; ANDERSEN, R. F.; JAKOBSEN, A. Changes in mutational status during third-line treatment for metastatic colorectal cancer - Results of consecutive measurement of cell free DNA, KRAS and BRAF in the plasma. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 9, p. 2215–2222, 1 nov. 2014c.

SPINDLER, K. L. G.; PALLISGAARD, N.; APPELT, A. L.; ANDERSEN, R. F.; SCHOU, J. V.; NIELSEN, D.; PFEIFFER, P.; YILMAZ, M.; JOHANSEN, J. S.; HOEGDALL, E. V.; JAKOBSEN, A.; JENSEN, B. V. Clinical utility of KRAS status in circulating plasma DNA compared to archival tumour tissue from patients with metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor therapy. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 17, p. 2678–2685, 2015.

SPINDLER, K. L. G.; PALLISGAARD, N.; VOGELIUS, I.; JAKOBSEN, A. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 4, p. 1177–1185, 15 fev. 2012.

STASIK, S.; MENDE, M.; SCHUSTER, C.; MAHLER, S.; AUST, D.; TANNAPFEL, A.; REINACHER-SCHICK, A.; BARETTON, G.; KRIPPENDORF, C.; BORNHÄUSER, M.; EHNINGER, G.; FOLPRECHT, G.; THIEDE, C. Sensitive Quantification of Cell-Free Tumor DNA for Early Detection of Recurrence in Colorectal Cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 5 jan. 2022.

SUN, Q.; LIU, Y.; LIU, B.; LIU, Y. Use of Liquid Biopsy in Monitoring Colorectal Cancer Progression Shows Strong Clinical Correlation. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 355, n. 3, p. 220–227, 1 mar. 2018a.

SUN, W.; SUN, Y.; ZHU, M.; WANG, Z.; ZHANG, H.; XIN, Y.; JIANG, G.; GUO, X.; ZHANG, Z.; LIU, Y. The role of plasma cell-free DNA detection in predicting preoperative chemoradiotherapy response in rectal cancer patients. **Oncology Reports**, v. 31, n. 3, p. 1466–1472, mar. 2014.

SUN, X.; HUANG, T.; CHENG, F.; HUANG, K.; LIU, M.; HE, W.; LI, M.; ZHANG, X.; XU, M.; CHEN, S.; XIA, L. Monitoring colorectal cancer following surgery using plasma circulating tumor DNA. **Oncology Letters**, v. 15, n. 4, p. 4365–4375, 1 abr. 2018b.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, 2021.

SUZUKI, T.; SUZUKI, T.; YOSHIMURA, Y.; YAHATA, M.; YEW, P. Y.; NAKAMURA, T.; NAKAMURA, Y.; PARK, J.-H.; MATSUO, R. **Detection of circulating tumor DNA in patients of operative colorectal and gastric cancers** *Oncotarget*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.oncotarget.com>.

SYMONDS, E. L.; PEDERSEN, S. K.; MURRAY, D.; BYRNE, S. E.; ROY, A.; KARAPETIS, C.; HOLLINGTON, P.; RABBITT, P.; JONES, F. S.; LAPOINTE, L.; SEGELOV, E.; YOUNG, G. P. Circulating epigenetic biomarkers for detection of recurrent colorectal cancer. **Cancer**, v. 126, n. 7, p. 1460–1469, 1 abr. 2020.

TABERNERO, J.; LENZ, H. J.; SIENA, S.; SOBRERO, A.; FALCONE, A.; YCHOU, M.; HUMBLET, Y.; BOUCHÉ, O.; MINEUR, L.; BARONE, C.; ADENIS, A.; YOSHINO, T.; GOLDBERG, R. M.; SARGENT, D. J.; WAGNER, A.; LAURENT, D.; TEUFEL, M.; JEFFERS, M.; GROTHEY, A.; VAN CUTSEM, E. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: A retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 8, p. 937–948, 1 ago. 2015.

TAIEB, J.; TALY, V.; HENRIQUES, J.; BOURREAU, C.; MINEUR, L.; BENNOUNA, J.; DESRAME, J.; LOUVET, C.; LEPERE, C.; MABRO, M.; EGRETEAU, J.; BOUCHE, O.; MULOT, C.; HORMIGOS, K.; CHABA, K.; MAZARD, T.; DE GRAMONT, A.; VERNEREY, D.; ANDRÉ, T.; LAURENT-PUIG, P. Prognostic value and relation with adjuvant treatment duration of ctDNA in stage III colon cancer: a post-hoc analysis of the PRODIGE-GERCOR IDEA-France trial. **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 20, 15 out. 2021.

TAKAHASHI, G.; YAMADA, T.; IWAI, T.; TAKEDA, K.; KOIZUMI, M.; SHINJI, S.; UCHIDA, E. Oncological Assessment of Stent Placement for Obstructive Colorectal Cancer from Circulating Cell-Free DNA and Circulating Tumor DNA Dynamics. **Annals of Surgical Oncology**, v. 25, n. 3, p. 737–744, 1 mar. 2018.

TAKAHASHI, G.; YAMADA, T.; KAN, H.; MATSUMOTO, S.; KOIZUMI, M.; SHINJI, S.; MATSUDA, A.; YOKOYAMA, Y.; IWAI, T.; WATANABE, A.; NAKAYAMA, M.; KITANO, S.; UCHIDA, E. 2028 Self-expandable colonic stent increases plasma level of circulating cell free DNA significantly in patients with obstructive colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, v. 51, p. S337, 1 set. 2015.

TAKEGAWA, N.; YONESAKA, K.; SAKAI, K.; UEDA, H.; WATANABE, S.; NONAGASE, Y.; OKUNO, T.; TAKEDA, M.; MAENISHI, O.; TSURUTANI, J.; SATOH,

T.; OKAMOTO, I.; NISHIO, K.; TAMURA, T.; NAKAGAWA, K. **Oncotarget 3453** [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget) **HER2 genomic amplification in circulating tumor DNA from patients with cetuximab-resistant colorectal cancer** *Oncotarget*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)>.

TANAKA, K.; YOSHIDA, Y.; YAMADA, T.; HAYASHI, T.; SHIMAOKA, H.; YOSHIMURA, F.; KAJITANI, R.; MUNESHIKA, T.; MATSUMOTO, Y.; NAGANO, H.; KOMONO, A.; SAKAMOTO, R.; NAKASHIMA, R.; AISU, N.; YOSHIMATSU, G.; HASEGAWA, S. Oncological evaluation in the perioperative period using cfDNA with BRAF V600E mutation in patients with colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

TAYLOR, S. C.; LAPERRIERE, G.; GERMAIN, H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2409, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>>.

THIERRY, A. R.; PASTOR, B.; JIANG, Z. Q.; KATSIAMPOURA, A. D.; PARSEGHIAN, C.; LOREE, J. M.; OVERMAN, M. J.; SANCHEZ, C.; EL MESSAOUDI, S.; YCHOU, M.; KOPETZ, S. Circulating DNA demonstrates convergent evolution and common resistance mechanisms during treatment of colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 16, p. 4578–4591, 15 ago. 2017.

THOMSEN, C. B.; HANSEN, T. F.; ANDERSEN, R. F.; LINDEBJERG, J.; JENSEN, L. H.; JAKOBSEN, A. Monitoring the effect of first line treatment in RAS/RAF mutated metastatic colorectal cancer by serial analysis of tumor specific DNA in plasma. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, 12 mar. 2018.

THOMSEN, C. B.; HANSEN, T. F.; ANDERSEN, R. F.; LINDEBJERG, J.; JENSEN, L. H.; JAKOBSEN, A. Early identification of treatment benefit by methylated circulating tumor DNA in metastatic colorectal cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 12, 2020.

TIAN, F.; LIAO, Y.; ZHANG, Y. Variations in Transrenal DNA and Comparison with Plasma DNA as a Diagnostic Marker for Colorectal Cancer. **The International Journal of Biological Markers**, v. 32, n. 4, 31 out. 2017.

TIE, J.; COHEN, J. D.; LO, S. N.; WANG, Y.; LI, L.; CHRISTIE, M.; LEE, M.; WONG, R.; KOSMIDER, S.; SKINNER, I.; WONG, H. L.; LEE, B.; BURGE, M. E.; YIP, D.; KARAPETIS, C. S.; PRICE, T. J.; TEBBUTT, N. C.; HAYDON, A. M.; PTAK, J.; SCHAEFFER, M. J.; SILLIMAN, N.; DOBBYN, L.; POPOLI, M.; TOMASETTI, C.; PAPADOPOULOS, N.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; GIBBS, P. Prognostic significance of postsurgery circulating tumor DNA in nonmetastatic colorectal cancer: Individual patient pooled analysis of three cohort studies. **International Journal of Cancer**, v. 148, n. 4, p. 1014–1026, 15 fev. 2021.

TIE, J.; KINDE, I.; WANG, Y.; WONG, H. L.; ROEBERT, J.; CHRISTIE, M.; TACEY, M.; WONG, R.; SINGH, M.; KARAPETIS, C. S.; DESAI, J.; TRAN, B.; STRAUSBERG, R. L.; DIAZ, L. A.; PAPADOPOULOS, N.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.; GIBBS, P. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1715–1722, 1 ago. 2015.

UNIVERSITY OF BRISTOL. **QUADAS Resources**. Disponível em: <<http://www.bristol.ac.uk/population-health-sciences/projects/quadas/resources/>>. Acesso em: 15 maio. 2023.

UNSELD, M.; BELIC, J.; PIERER, K.; ZHOU, Q.; MOSER, T.; BAUER, R.; PIRINGER, G.; GERGER, A.; SIEBENHÜNER, A.; SPEICHER, M.; HEITZER, E.; PRAGER, G. W. A higher ctDNA fraction decreases survival in regorafenib-treated metastatic colorectal cancer patients. Results from the regorafenib's liquid biopsy translational biomarker phase II pilot study. **International Journal of Cancer**, v. 148, n. 6, p. 1452–1461, 15 mar. 2021.

VANDEPUTTE, C.; KEHAGIAS, P.; HOUSNI, H. El; AMEYE, L.; LAES, J.-F.; DESMEDT, C.; SOTIRIOU, C.; DELEPORTE, A.; PULEO, F.; GEBOES, K.; DELAUNOIT, T.; DEMOLIN, G.; PEETERS, M.; D'HONDT, L.; JANSSENS, J.; CARRASCO, J.; MARECHAL, R.; GOMEZ GALDON, M.; HEIMANN, P.; PAESMANS, M.; FLAMEN, P.; HENDLISZ, A. **Circulating tumor DNA in early response assessment and monitoring of advanced colorectal cancer treated with a multi-kinase inhibitor** *Oncotarget*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.oncotarget.com](http://www.oncotarget.com)>.

WAHL, R. L.; JACENE, H.; KASAMON, Y.; LODGE, M. A. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 50 Suppl 1, maio 2009.

WANG, D. S.; YANG, H.; LIU, X. Y.; CHEN, Z. G.; WANG, Y.; FONG, W. P.; HU, M. T.; ZHENG, Y. C.; ZHENG, Y.; LI, B. K.; YUAN, Y. F.; CHEN, G.; PAN, Z. Z.; SONG, L.; LI, Y. H.; XU, R. H. Dynamic monitoring of circulating tumor DNA to predict prognosis and efficacy of adjuvant chemotherapy after resection of colorectal liver metastases. **Theranostics**, v. 11, n. 14, p. 7018–7028, 2021a.

WANG, X.; SHI, X. Q.; ZENG, P. W.; MO, F. M.; CHEN, Z. H. Circulating cell free DNA as the diagnostic marker for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 9, n. 36, p. 24514–24524, 11 maio 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29849957/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

WANG, Y.; YANG, L.; BAO, H.; FAN, X.; XIA, F.; WAN, J.; SHEN, L.; GUAN, Y.; BAO, H.; WU, X.; XU, Y.; SHAO, Y.; SUN, Y.; TONG, T.; LI, X.; XU, Y.; CAI, S.; ZHU, J.; ZHANG, Z. Utility of ctDNA in predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy and prognosis assessment in locally advanced rectal cancer: A prospective cohort study. **PLoS Medicine**, v. 18, n. 8, 1 ago. 2021b.

WHITING, P. F.; RUTJES, A. W. S.; WESTWOOD, M. E.; MALLETT, S.; DEEKS, J. J.; REITSMA, J. B.; LEEFLANG, M. M. G.; STERNE, J. A. C.; BOSSUYT, P. M. M. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. **Annals of internal medicine**, v. 155, n. 8, p. 529–536, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22007046/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

WOFF, E.; KEHAGIAS, P.; VANDEPUTTE, C.; AMEYE, L.; GUIOT, T.; PAESMANS, M.; HENDLISZ, A.; FLAMEN, P. Combining 18F-FDG PET/CT-based metabolically active tumor volume and circulating cell-free DNA significantly improves outcome prediction in chemorefractory metastatic colorectal cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 60, n. 10, p. 1366–1372, 1 out. 2019.

WONG, A. L. A.; LIM, J. S. J.; SINHA, A.; GOPINATHAN, A.; LIM, R.; TAN, C. S.; SOH, T.; VENKATESH, S.; TITIN, C.; SAPARI, S. S.; LEE, S. C.; YONG, W. P.; TAN, P. S. P.; PANG, B.; WANG, T. T.; ZEE, Y. K.; SOONG, R.; TRNKOVA, Z.; LATHIA, C.; THIERY, J. P.; WILHELM, S.; JEFFERS, M.; GOH, B. C. Tumour pharmacodynamics and circulating cell free DNA in patients with refractory colorectal carcinoma treated with regorafenib. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, 12 fev. 2015.

XIE, H.; MAHONEY, D. W.; FOOTE, P. H.; BURGER, K. N.; DOERING, K. A.; TAYLOR, W. R.; THEN, S. S.; CAO, X.; MCGLINCH, M.; BERGER, C. K.; WU, T. T.; HUBBARD, J. M.; ALLAWI, H. T.; KAISER, M. W.; LIDGARD, G. P.; AHLQUIST, D. A.; KISIEL, J. B. Novel methylated DNA markers in the surveillance of colorectal cancer recurrence. **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 1, p. 141–149, 1 jan. 2021.

XING, C.; PU, W.; XIAO, L.; ZHOU, C.; ZHONG, F.; WU, Y.; GONG, W.; LV, X.; ZHUANG, Z.; WANG, H.; BIAN, H.; WANG, J.; ZHANG, R.; LI, K. Cancer stage-dependent alterations in cell-free DNA in patients with colorectal cancer. **JBUON**, v. 26, n. 1, p. 109–115, 2021.

XU, X.; YU, Y.; SHEN, M.; LIU, M.; WU, S.; LIANG, L.; HUANG, F.; ZHANG, C.; GUO, W.; LIU, T. Role of circulating free DNA in evaluating clinical tumor burden and predicting survival in Chinese metastatic colorectal cancer patients. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, 1 dez. 2020.

YAEGASHI, M.; IWAYA, T.; SASAKI, N.; FUJITA, M.; JU, Z.; SIWAK, D.; HACHIYA, T.; SATO, K.; ENDO, F.; KIMURA, T.; OTSUKA, K.; SUGIMOTO, R.; SUGAI, T.; LIOTTA, L.; LU, Y.; MILLS, G. B.; NAKAGAWA, H.; NISHIZUKA, S. S. Frequent post-operative monitoring of colorectal cancer using individualised ctDNA validated by multiregional molecular profiling. **British Journal of Cancer**, v. 124, n. 9, p. 1556–1565, 27 abr. 2021.

YAMAUCHI, M.; URABE, Y.; ONO, A.; MIKI, D.; OCHI, H.; CHAYAMA, K. Serial profiling of circulating tumor DNA for optimization of anti-VEGF chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 142, n. 7, p. 1418–1426, 1 abr. 2018.

YEH, Y. M.; LIN, P. C.; LEE, C. T.; CHEN, S. H.; LIN, B. W.; LIN, S. C.; CHEN, P. C.; CHAN, R. H.; SHEN, M. R. **Treatment monitoring of colorectal cancer by integrated analysis of plasma concentration and sequencing of circulating tumor DNA** Molecular CancerBioMed Central Ltd, 1 dez. 2020.

ZAMORA, J.; ABRAIRA, V.; MURIEL, A.; KHAN, K.; COOMARASAMY, A. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. **BMC Medical Research Methodology**, v. 6, n. 1, 12 dez. 2006.

ZHONG, Y.; ZHOU, Q.; ZHANG, Y.; ZHOU, S.; ZHANG, G.; JIANG, C.; ZHANG, Z.; ZHANG, X.; XU, J.; JIN, C.; CAO, L.; CHEN, L. Cell-free DNA as a biomarker for colorectal cancer: A retrospective analysis in patients before and after surgery. **Cellular and Molecular Biology**, v. 66, n. 2, p. 135–141, 15 maio 2020.

ZHOU, J.; CHANG, L.; GUAN, Y.; YANG, L.; XIA, X.; CUI, L.; YI, X.; LIN, G. Application of circulating tumor DNA as a non-invasive tool for monitoring the progression of colorectal cancer. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2016.

ZHOU, J.; WANG, C.; LIN, G.; XIAO, Y.; JIA, W.; XIAO, G.; LIU, Q.; WU, B.; WU, A.; QIU, H.; ZHANG, F.; HU, K.; XUE, H.; SHEN, Z.; WANG, Z.; HAN, J.; NIU, B.; XU, Y.; YU, Z.; YANG, L. **Serial circulating tumor DNA in predicting and monitoring the effect of neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer: A prospective multicenter study** Clinical Cancer Research American Association for Cancer Research Inc., 1 jan. 2021.

ZITT, M.; M, H. M.; ROCHEL, M.; SCHWENDINGER, V.; ZITT, M.; GOEBEL, G.; DEVRIES, A.; MARGREITER, R.; OBERWALDER, M.; ZEILLINGER, R. **Circulating cell-free DNA in plasma of locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative**



**chemoradiation: A potential diagnostic tool for therapy monitoring****Disease Markers.** [s.l.] IOS Press, 2008. .

ZOU, D.; DAY, R.; COCADIZ, J. A.; PARACKAL, S.; MITCHELL, W.; BLACK, M. A.; LAWRENCE, B.; FITZGERALD, S.; PRINT, C.; JACKSON, C.; GUILFORD, P. Circulating tumor DNA is a sensitive marker for routine monitoring of treatment response in advanced colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 41, n. 11, p. 1507–1517, 1 nov. 2020.

## ANEXO I

### Search Strategy for PubMed

("Cell-Free Nucleic Acids"[Mesh] OR Cell Free Nucleic Acids OR Nucleic Acids, Cell-Free OR Circulating Cell-Free Nucleic Acids OR Circulating Cell Free Nucleic Acids OR Circulating Nucleic Acids OR Acids, Circulating Nucleic OR Nucleic Acids, Circulating OR Cell-Free Nucleic Acid OR Cell Free Nucleic Acid OR Nucleic Acid, Cell-Free OR Cell-Free DNA OR Cell Free DNA OR DNA, Cell-Free OR cfDNA OR cirDNA OR Cell-Free Deoxyribonucleic Acid OR Acid, Cell-Free Deoxyribonucleic OR Cell Free Deoxyribonucleic Acid OR Deoxyribonucleic Acid, Cell-Free OR Circulating DNA OR DNA, Circulating OR "Liquid Biopsy"[Mesh] OR Biopsies, Liquid OR Biopsy, Liquid OR Liquid Biopsies OR Plasma DNA OR ccfDNA OR cDNA OR Circulating Cell-Free DNA OR Circulating Cell Free DNA)

AND

("Colorectal Neoplasms"[Mesh] OR Neoplasms, Colorectal OR Colorectal Neoplasm OR Neoplasm, Colorectal OR Colorectal Tumors OR Colorectal Tumor OR Tumor, Colorectal OR Tumors, Colorectal OR Colorectal Carcinoma OR Carcinoma, Colorectal OR Carcinomas, Colorectal OR Colorectal Carcinomas OR Colorectal Cancer OR Cancer, Colorectal OR Cancers, Colorectal OR Colorectal Cancers OR "Colonic Neoplasms"[Mesh] OR Colonic Neoplasm OR Neoplasm, Colonic OR Neoplasms, Colonic OR Colon Neoplasms OR Colon Neoplasm OR Neoplasm, Colon OR Neoplasms, Colon OR Cancer of Colon OR Colon Cancers OR Cancer of the Colon OR Colonic Cancer OR Cancer, Colonic OR Cancers, Colonic OR Colonic Cancers OR Colon Cancer OR Cancer, Colon OR Cancers, Colon OR "Rectal Neoplasms"[Mesh] OR Neoplasm, Rectal OR Rectal Neoplasm OR Rectum Neoplasms OR Neoplasm, Rectum OR Rectum Neoplasm OR Rectal Tumors OR Rectal Tumor OR Tumor, Rectal OR Neoplasms, Rectal OR Cancer of Rectum OR Rectum Cancers OR Rectal Cancer OR Cancer, Rectal OR Rectal Cancers OR Rectum Cancer OR Cancer, Rectum OR Cancer of the Rectum)

AND

("Diagnosis"[Mesh] OR diagnosis OR diagnostic OR "Prognosis"[Mesh] OR prognostic OR prognosis OR "Biomarkers"[Mesh] OR "Biomarkers, Tumor"[Mesh] OR tumor biomarker OR biologic marker OR DNA based biomarker OR recurrence OR detection OR cancer detection OR recurrence detection OR "Recurrence"[Mesh] OR "Neoplasm Recurrence, Local"[Mesh])

### Search Strategy for Embase

('circulating dna'/exp OR 'liquid biopsy'/exp OR 'plasma dna'/exp OR 'cell free dna'/exp OR 'circulating tumor DNA'/exp OR 'cell free nucleic acid'/exp OR 'cell free tumor DNA' OR 'plasma DNA' OR 'circulating cell free DNA' OR 'cell free nucleic acid' OR 'circulating tumor DNA' OR 'circulating DNA' OR 'circulating cell-free DNA' OR 'cell-free DNA' OR 'cell-free nucleic acid' OR 'ccfDNA' OR 'cirDNA' OR 'cDNA' OR 'cfDNA')

AND

('colorectal cancer'/exp OR 'colon cancer'/exp OR 'colon tumor'/exp OR 'rectum cancer'/exp OR 'rectum tumor'/exp OR 'colorectal carcinoma' OR 'hereditary colorectal cancer' OR 'metastatic colorectal cancer' OR 'colon cancer' OR 'rectum cancer' OR 'colon tumor' OR 'rectum tumor' OR 'colon carcinoma' OR 'rectum carcinoma' OR 'colorectal cancer')

AND

('diagnosis'/exp OR 'prognosis'/exp OR 'biological marker'/exp OR 'tumor marker'/exp OR biomarker OR 'recurrent disease'/exp OR 'recurrence' OR 'cancer diagnosis'/exp OR 'recurrence detection' OR 'cancer recurrence'/exp)

### **Search Strategy for LILACS**

((mh:(Neoplasias Colorretais)) OR (mh:(neoplasias retais)) OR (mh:(neoplasias do colo)) OR (tw:(cancer colorretal)) OR (tw:(colorectal cancer)) OR (tw:(tumor do colo)) OR (tw:(cancer do colo)) OR (tw:(Câncer de Colo)) OR (tw:(Câncer de Cólon)) OR (tw:(Câncer Colônico)) OR (tw:(Neoplasia do Cólon)) OR (tw:(Neoplasias do Cólon)) OR (tw:(Tumores de Colo)) OR (tw:(Tumores de Cólon)) OR (tw:(Câncer do Reto)) OR (tw:(Câncer Retal)) OR (tw:(Neoplasia do Reto)) OR (tw:(Neoplasias do Reto)) OR (tw:(Tumores do Reto)) OR (tw:(Tumores Retais)) OR (tw:(Câncer Colorretal)))

AND

((mh:(Ácidos Nucleicos Livres)) OR (mh:(DNA Tumoral Circulante)) OR (mh:(DNA de neoplasias)) OR (tw:(Ácidos Nucleicos Fora de Células)) OR (tw:(Ácidos Nucleicos Fora da Célula)) OR (tw:(Ácidos Nucleicos Circulantes)) OR (tw:(Ácidos Nucleicos Circulantes Fora de Células)) OR (tw:(Ácido Nucleico Livre)) OR (tw:(DNA Circulante)) OR (tw:(DNA Livre)) OR (tw:(DNA Fora da Célula)) OR (tw:(DNA Fora de Células)) OR (tw:(Ácido Desoxirribonucleico Livre de Células)) OR (tw:(cfDNA)) OR (tw:(cirDNA)) OR (tw:(DNA Tumoral Livre de Células)) OR (tw:(DNA de Tumores)) OR (tw:(cell free DNA)) OR (tw:(circulating DNA)) OR (mh:(Biópsia Líquida)) OR (tw:(liquid biopsy)))

### **Search Strategy for Scielo**

(cell free DNA OR cell-free DNA OR plasma DNA OR circulating DNA OR DNA livre OR DNA circulante OR DNA plasmático OR cDNA OR cirDNA OR cfDNA OR ccfDNA) AND ((cancer OR carcinoma OR neoplasm OR neoplasma OR tumor) AND (colon OR reto OR rectum OR rectal OR colorectal OR colorretal))

### **Search Strategy for Web of Science**

TS=("circulating DNA" OR "tumor DNA" OR "circulating tumor DNA" OR "cell-free DNA" OR "cell free DNA" OR "circulating cell free DNA" OR "plasma DNA" OR "liquid biopsy" OR "circulating cell-free DNA" OR "cfDNA" OR "cirDNA" OR "cDNA" OR "ccfDNA")

AND

TS=("colorectal cancer" OR "colorectal tumor" OR "colon cancer" OR "colon tumor" OR "rectum cancer" OR "rectum tumor" OR "colorectal neoplasm" OR "colon neoplasm" OR "rectum neoplasm" OR "colorectal carcinoma" OR "colon carcinoma" OR "rectum carcinoma")

## ANEXO II

## Formulário para seleção dos estudos

Autor:	Ano:
Revisor:	Base de dados:

*Qualquer seleção da resposta “Não” leva a não seleção do estudo para leitura completa e encerra o questionário.*

*Este estudo é: (se identificado como revisão não é necessário prosseguir para as próximas perguntas)*

Revisão

Outros

O trabalho está publicado em Inglês, Português ou Espanhol?

Sim

Não

Indeterminado

Durante sua revisão, este trabalho foi identificado como uma duplicata?

Sim

Não

O material biológico utilizado para as análises foi o plasma?

Sim

Não

Indeterminado

Houve quantificação do cDNA?

Sim

Não

Indeterminado

Foram avaliados pacientes com diagnóstico de Cancer Colorretal?

Sim

Não

Indeterminado

O método de extração do cDNA foi descrito?

Sim

Não

Indeterminado

O método de quantificação do cDNA foi descrito?

Sim

Não

Indeterminado

O tempo de seguimento dos pacientes foi descrito?

Sim

Não

Indeterminado

A leitura do texto completo está indicada para determinar a inclusão ou não deste trabalho?

Sim

Não

### Instruções para preenchimento do formulário de seleção dos estudos

Padronizar o autor como último sobrenome primeira letra maiúscula seguido das iniciais dos dois primeiros nomes em letra maiúscula. Ex.: Oliveira IB; Chung R; Base de dados como: LILACS, PubMed, Web of Science, Scielo ou EMBASE.

Pergunta	Resposta	Racional
O material biológico utilizado nas análises foi o plasma?	Sim	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que o material biológico para as análises foi o plasma
	Não	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que o material biológico para as análises NÃO foi o plasma (ex. soro)
	Indeterminado	não foi possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> o material biológico para as análises
Houve quantificação do cDNA?	Sim	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que houve quantificação do cDNA
	Não	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que NÃO houve quantificação do cDNA
	Indeterminado	não foi possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> se o cDNA foi quantificado
Foram avaliados pacientes com diagnóstico de Cancer Colorretal?	Sim	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que os pacientes tinham o diagnóstico de câncer colorretal
	Não	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que os pacientes NÃO tinham o diagnóstico de cancer colorretal
	Indeterminado	não foi possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> se os pacientes tinham o diagnóstico de câncer colorretal
O método de extração do cDNA foi descrito?	Sim	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que o método de extração do DNA plasmático foi descrito
	Não	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que o método de extração do DNA plasmático NÃO foi descrito
	Indeterminado	não foi possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> se o método de extração do DNA plasmático foi descrito
O método de quantificação do cDNA foi descrito?	Sim	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que o método de quantificação do DNA plasmático foi descrito
	Não	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que o método de quantificação do DNA plasmático NÃO foi descrito
	Indeterminado	não foi possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> se o método de quantificação do DNA plasmático foi descrito
O tempo de seguimento dos pacientes foi descrito?	Sim	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> o tempo de seguimento dos pacientes
	Não	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que não houve tempo de seguimento determinado
	Indeterminado	não foi possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> o tempo de seguimento dos pacientes

O trabalho está publicado em Inglês, Português ou Espanhol?	Sim	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que o texto completo está publicado em Inglês, Espanhol ou Português.
	Não	possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> que o texto completo NÃO está publicado em Inglês, Espanhol ou Português.
	Indeterminado	não foi possível confirmar a partir da leitura do título e <i>abstract</i> se o texto completo está publicado em Inglês, Espanhol ou Português.

### Formulário para inclusão dos estudos

Autor:	Ano:
Revisor:	Base de dados:

Responder as questões e preencher com os dados solicitados a partir da leitura completa do artigo:

País:		Idioma:	
Tipo de estudo/Design:			
Teste Índice:		Teste referência:	
Diagnóstico dos pacientes:		Estadiamento do CCR:	
N(estudo):	N(teste):	% homens:	Idade média:
Comorbidades (%):			
Tempo de Seguimento:		Material Biológico:	
Tratamento:			
Manipulação das amostras:			
Método de extração:			
Método de quantificação (teste índice):			
Metodologia (teste referência):			
Desfecho clínico de recorrência:			
A:	B:	C:	D: Ponto de corte:
Sensibilidade:		Especificidade:	
Perda de dados:			
Viés?			
Incluído? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Razão para Exclusão?			



## ANEXO III

Table 1 – cfDNA biomarker, non-mCRC patients Trial Data

Reference	Country	Study design	Diagnosis	Staging I / II / III / IV / NA, (%)	Treatment	N, total	N, biomarker	male (%)	Mean age	FUPa
(AGOSTINI <i>et al.</i> , 2011)	Italy	Prospective	CRC	36 / 21 / 11 / 13 / 19	CRT (5-FU)	216	67	63	61 (20–79)	48 months (34–120)
(BEDIN <i>et al.</i> , 2017)	Italy	Prospective	CRC	33,3 / 25,4 / 28,1 / 13,2 /		192	114	49	67 (61-73)	52 months
(BHANGU <i>et al.</i> , 2017)	Austria	Prospective	CRC	6,7 / 6,7 / 6,7 / 80 /	NeoCTx + resection	30	22	47,6	56 (18-83)	5 days
(BOYSEN <i>et al.</i> , 2017)	Denmark	Prospective	LARC	3 / 36 / 55 / 6 /	SCRT LCRT capecitabine + resection	75	74	60	68 (35-85)	39 months
(CAMERA <i>et al.</i> , 2020)	Belgium	Prospective single-center, single-arm, interventional, non-therapeutic	CRC	/ / / /		55	47	53	65 (38–82)	1 year
(CASSINOTTI <i>et al.</i> , 2013)	Italy	Prospective	CRC	19,3 / 33,2 / 33,6 / 13,9 /	Resection	223	223	54,7	66	36 months
(FRATTINI <i>et al.</i> , 2008)	Italy	Prospective	CRC	/ 51,43 / 40 / 8,57 /	Resection	70	70	44,29	65 (38-87)	16 months
(FUJII <i>et al.</i> , 2017)	USA	Prospective, blinded	CRC	/ / / /	Chemotherapy	71	33	54	59 (36-85)	27,7 months
(GUADALAJARA <i>et al.</i> , 2008)	Spain	Retrospective	CRC	23,3 / 34,2 / 26 / 15,11 /	Resection + FOLFOX4 (stages II/III)	92	73	64,4	68,2 (43-85)	554 (10-1407) days
(KHAKOO <i>et al.</i> , 2020)	UK	Prospective, single center	LARC	/ / 87,23 / /	CRT	47	0		59 (30-83)	26.4 months
(LAN <i>et al.</i> , 2017)	Taiwan	Retrospective	CRC	18,2 / 35 / 24,3 / 22,5 /	Bevacizumab	329	54	55,2	69,2	18 months
(LECOMTE <i>et al.</i> , 2002)	France		CRC	13,79 / 36,21 / 27,59 / 22,41 /	CRT	58	37	50	69 (39-93)	22 months
(LI <i>et al.</i> , 2017)	USA	Prospective cohort	CRC	8,86 / 25,32 / 54,43 / 10,13 / 1,27		135	80	49	60,5 (19-88)	64 months (6,77-72,83)
(ØRNTOFT <i>et al.</i> , 2021)	Denmark	prospective	CRC	22,7 / 36,9 / 34,1 / 6,4 /	Surgery	2820	889	57,9	66	1457 days 4768 days

Reference	Country	Study design	Diagnosis	Staging I / II / III / IV / NA, (%)	Treatment	N, total	N, biomarker	male (%)	Mean age	FUPa
(PERKINS <i>et al.</i> , 2012)	UK	Prospective, phase I	CRC	/ / / /		105	25	43,3	56 (22-75)	5,8 months (0,3-17,5)
(XING <i>et al.</i> , 2021)	China	Prospective	CRC	30 / 28,8 / 27,7 / 7,7 / 5,5		130	90	54,4	65,08 ±10,97	21 months
(SCHOU <i>et al.</i> , 2018)	Denmark	Prospective	LARC	/ 1,6 / 65,9 / 32,5 /	CRT + Capecitabine/Oxiplatin	123	123	60	67	55 months 5 years
(SONG <i>et al.</i> , 2021)	South Korea	Retrospective	CRC	0,159 / 0,386 / 0,364 / 0,091 /	Surgery	69	44	65,9	63,98	57 months
(SUN <i>et al.</i> , 2014)	China	Prospective	LARC	/ 5,88 / 73,53 / 20,59 /	nCRT	34	34	55,88	55,29 (29-73)	14 days
(TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2015)	Japan	Prospective	OCC	28,57 / 28,57 / 42,86 / /		7	7	57		7 days
(TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2018)	Japan	Prospective, observational	MLBO	/ 14,29 / 40 / 45,71 /	SEMS	58	35	62		14 days
(VANDEPUTT E <i>et al.</i> , 2018)	Belgium	Prospective, multicenter	Refractory aCRC	/ / / /	Regorafenib	141	20	60	66 (37-83)	8 months 26 months
(YEH <i>et al.</i> , 2020)	Taiwan	Prospective	CRC	/ / / / 0,366666666666667 /		60	60	60	55,5	
(ZHONG <i>et al.</i> , 2020)	China	Retrospective	CRC	/ / / /		90	60	56,6	49,3 ±4,1	20 months
(ZITT <i>et al.</i> , 2008)	Austria	Prospective	LARC	/ / 92,31 / 7,69 /	CRT + resection	26	25	73,08	63,1 (34-83 )	

aMean (SD or CI 95%) OR median (range) follow-up OR Max FUP

Abbreviations: CLM, colorectal liver metastasis; CRC, colorectal cancer; CRLM, colorectal liver metastasis; LARC, locally advanced rectal cancer; OCC, obstructive colorectal cancer; MLBO, malignant large bowel obstruction; mCRC, metastatic colorectal cancer; NeoCTx, neoadjuvant chemotherapy; CTx, chemotherapy; CRT, chemoradiotherapy; nCRT, neoadjuvant chemoradiotherapy; RT, radio therapy; ACT, adjuvant chemotherapy; cfDNA, circulating free DNA;

Table 2 – cfDNA biomarker, non-mCRC patients Biomarker Data

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(AGOSTINI <i>et al.</i> , 2011)	ng/ml	15 days before CRT, 15 days preoperatively	EDTA tube, Processed within 4 hours in room temp, Centrifuged 3000g 10 min, Supernatant stored at -80°C	QIAamp DNA Mini Kit	qPCR	histological evaluation (biopsy)	15 days preoperatively	TRG	Treatment response
(BEDIN <i>et al.</i> , 2017)	ng/ml	preoperatively or pre-treatment	K3EDTA tube, Processed within the day, Centrifuged 3,000 rpm 10 min, Stored at -80°C	h	qRT-PCR				death
(BHANGU <i>et al.</i> , 2017)		preoperatively, during surgery, < 5 days postoperatively	K2EDTA tubes, Processed within 3 hours at 4°C, Stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Plasma Quick Kit from Epigenomics				

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(BOYSEN <i>et al.</i> , 2017)	copies/ml	Preoperative	EDTA tubes, centrifuged 30 min at 400g, within 30 min stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR	histological evaluation (biopsy)	Postoperatively		Recurrence
(CAMERA <i>et al.</i> , 2020)	ng/ml	pre treatment, 2 weeks	EDTA tubes, centrifuged at 2000g 15 min at 4°C within 1 h, stored at -80°C, centrifugation at 10,000g 10 min	QIAamp circulating nucleic acid kit	Qubit 2.0 fluorometer / Qubit dsDNA HS assay kit	FDG PET-CT scan	Baseline, 15 days after, every 2 months	Clinicopathological assessment	death
(CASSINOTTI <i>et al.</i> , 2013)	ng/ml	Baseline, 3 months postoperatively	EDTA tube, Immediate centrifugation 3000 rpm 20 min at 4°C, stored at -20°C	BloodPrep™ Chemistry – DNA Isolation from Fresh and Frozen Whole Blood	qRT-PCR			Clinicopathological assessment	Recurrence
(FRATTINI <i>et al.</i> , 2008)	ng/ml	4, 10 and 16 months		QIAamp Blood Extraction Kit	DNA DipStick Kit	histological evaluation (biopsy)	4, 10, 16 months		Disease progression
(FUJII <i>et al.</i> , 2017)	ng/ml	Baseline, Treatment initiation, Disease progression		QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	PCR-NGS	Imaging	Every 6 months	RECIST	Death
(GUADALAJARA <i>et al.</i> , 2008)	ng/ul	Surgery			spectrophotometry with NanoDrop ND-1000	CT scan	Every 3 months		Metastasis
(KHAKOO <i>et al.</i> , 2020)	copies/ml	pre-treatment ≤4 weeks, mid-CRT (3–4 weeks), completion (4–12 weeks), post-surgery (within 4–12 weeks), 3–6 month	Cell-Free DNA blood collection tubes, centrifuged twice 1,600 g 10 min, stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit / QIASymphony Circulating DNA Kit	Qubit dsDNA HS Assay kit / ddPCR	MRI	3–6 weeks after end of treatment	RECIST	Metastasis
(LAN <i>et al.</i> , 2017)	copies/ml	Preoperatively, postoperatively		QIAamp DNA Tissue Kit and a MinElute Virus Kit"	NanoDrop 1000 Spectrophotometer / qPCR				Metastasis
(LECOMTE <i>et al.</i> , 2002)	ng/mL	preoperatively	EDTA Tube, centrifuged 10 min 3,000g, stored at -80°C	QIAamp Blood Kit	fluorescence	Clinical evaluation	Every 3 months		Recurrence and death
(LI <i>et al.</i> , 2017)	copy number changes	Before treatment	centrifuged at 3000g 4 °C 10 min	QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qubit 2.0 Fluorometer				
(ØRNTOFT <i>et al.</i> , 2021)	copies/ml	preoperatively	K2EDTA tubes, processed within 2 hours, centrifuged twice at 20°C, stored at -80°C	QIASymphony DSP Circulating DNA kit	ddPCR				death

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(PERKINS <i>et al.</i> , 2012)	ng/ml		sodium heparin Tube inverted 8 times, centrifuged 1800 g 15 min, supernatant was stored at -80°C	QIAamp DNA Blood Midi Kit	Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit	histological evaluation (biopsy)			death
(XING <i>et al.</i> , 2021)	ng/ml		EDTA tube, stored at 4°C, were processed within 6 h, centrifuged at 3000 rpm for 10 min at room temperature stored at -80°C	QIAamp circulating nucleic acid kit	qRT-PCR				recurrence
(SCHOU <i>et al.</i> , 2018)	Ng/ml	baseline, after the ICT, after CRT.	citrate tubes, centrifuged 2000 g 10 min at 4°C, Processed within 2 h, stored at -80°C	Gold Nucleic Acid Gel Stain	Fluorescence	CT scan	every 3 months up to 1 year, every 6 months up to 2 years, every 12 months up to 2 years	Clinicopathological assessment	Recurrence, disease progression and death
(SONG <i>et al.</i> , 2021)	ng/ul		K3-EDTA tubes, centrifuged (1,600 g, 10 min) within 4 hours, stored at -80°C	Maxwell RSC Instrument	Quantus Fluorometer	(PET-)CT scan			recurrence
(SUN <i>et al.</i> , 2014)	ng/ml	≤7 days before CRT, ≤7 days after CRT		QIAamp® DNA Blood Mini kit	qRT-PCR	histological evaluation (biopsy)	postoperatively	TRG	Disease progression
(TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2015)	ng/ml	D0, D1, D4, D7		QIAamp circulating nucleic acid kit	Fluorescence				Technical success
(TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2018)	ng/ml	D0, D1, D3, D7	BD Vacutainer plasma preparation tubes, centrifugation at 1900g 10 min at 4°C, within 2 h, stored at -80°C, re-centrifugation at 16,000g for 10 min at 4°C	QIAamp circulating nucleic acid kit	Qubit 2.0 dsDNA high-sensitivity assay	Radiographic imaging	postoperatively on day 1 and day 3	Clinicopathological assessment	Technical success
(VANDEPUTTE <i>et al.</i> , 2018)	ug/ml	baseline, every 2 weeks until disease progression or 1 year FUP	EDTA tubes centrifuged, at 2000xg for 15 min at 4°C, within 1h, stored at -80°C	QIAamp circulating nucleic acid kit	Qubit® 2.0 fluorometer / Qubit® dsDNA HS assay kit	FDG PET-CT scan	baseline, every 2 weeks until disease progression or 1 year FUP	Clinicopathological assessment	death
(YEH <i>et al.</i> , 2020)	ng/ml	every 3-6 months	PAXgene Blood ccfDNA tube, processed within 24 hours at room temperature (15°C–25°C)	Applied Biosystems™ MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit	Invitrogen™ Qubit™ Fluorometer / Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay	CT scan			recurrence
(ZHONG <i>et al.</i> , 2020)	ng/ml	10 days preoperatively, 10 days postoperatively	EDTA tubes, centrifuged at 1600g, stored at -80°C	QIAamp Blood DNA Mini Kits	qPCR				progression

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(ZITT <i>et al.</i> , 2008)	ng/ml	pre treatment, end of CRT (5 weeks), postoperatively	centrifugating twice at 3000 rpm for 10 min at 4°C (2 h after venipuncture), stored at -80°C	QIAamp DNA Blood Mini Kit	rt-PCR	histological evaluation (biopsy)	operatively	UICC grading	Treatment response

Abbreviations: ctDNA, circulating tumor DNA; MAF, mutation allelic fraction; VAF, variant allele fraction; dPCR, digital polymerase chain reaction; ddPCR, digital droplet polymerase chain reaction; rt-PCR, real time polymerase chain reaction; qRT-PCR, quantitative real time polymerase chain reaction; ARMS-qPCR, amplification-refractory mutation system quantitative polymerase chain reaction; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; CT, computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging; TRG, tumor response grade.

Table 3 – cfDNA biomarker, mCRC patients Trial Data

Reference	Country	Study design	Diagnosis	Treatment	N, total	N, biomarker	male (%)	Mean age	FUPa
(AMATU <i>et al.</i> , 2019)	Italy	Prospective, double-blind	mCRC	Regorafenib	76	60	51	60 (30-84)	5.5 months (1,25-56.5)
(BEAGAN <i>et al.</i> , 2020)	Netherlands	Prospective	mCRC	CRS-HIPEC	30	24	56,7	65,1	17 months (6-25) 25 months
(BERGER <i>et al.</i> , 2017)	Germany	Prospective cohort treatment surveillance	mCRC	Palliative chemotherapy	27	27	85	65,4 (±1,8)	2.35 ± 0.14 months 14 months
(BOYSEN <i>et al.</i> , 2018)	Denmark	Prospective, open label, phase II	mCRC	DEBIRI-TACE + mFOLFOX6	15	15	57	66 (43-74)	1.7 years
(BOYSEN <i>et al.</i> , 2020b)	Denmark	Prospective	mCRC	oxaliplatin + capecitabine	62	56	61	61,3 (40,8-74,8)	3 years
(CABEL <i>et al.</i> , 2017)	France	Prospective, single-center	mCRC	pembrolizumab nivolumab	15	2		57,5 (57-58)	10.8 months (3.2–16.3)
(GALVANO <i>et al.</i> , 2020)		Prospective	mCRC			40			
(HAMFJORD <i>et al.</i> , 2019)	Sweden	Retrospective, post hoc	mCRC	NORDIC-Flox	547	493	60	62 (24-75)	7 years
(HE <i>et al.</i> , 2020)	China	Prospective	CRLM	Surgery	20	19	70	55 ±13	20 months
(HUFNAGL <i>et al.</i> , 2020)	Austria	Prospective	mCRC	5-FU + Oxaliplatin or Irinotecan	15	5	46,7	70 (47-82)	6 months (2-8)
(IWAI <i>et al.</i> , 2020)	Japan	Prospective, observational, single institution	CLM	Liver resection	42	42	60,9	69 (18-85)	535 days (272-994)
(IWAI <i>et al.</i> , 2016)	Japan	Prospective	CLM	Liver resection	29	18			1 year
(IWAI <i>et al.</i> , 2015)	Japan	Prospective	CLM	Liver resection	10	10			
(JANOWSKI <i>et al.</i> , 2017)	USA	Prospective	CLM	Radiotherapy + resection	58	9	50	56 (31-85)	2 months
(KITAHARA <i>et al.</i> , 2016)	Japan	Prospective, non-randomized, double-blinded, phase II	mCRC	CRT	96	93	50	64	1000 days
(PAN; ZHANG, 2020)	China	Prospective	mCRC		250	200	66,5	51	8 months
(PASTOR <i>et al.</i> , 2021)	France	prospective, multicenter, open-label, single-arm, phase II	mCRC	regorafenib	55	43	53,5	62,1 (50,5–68,3)	15 months
(SEFRIQUI <i>et al.</i> , 2021)	France	Prospective	mCRC	Chemotherapy	192	157	56,2	68	12 weeks
(SEFRIQUI <i>et al.</i> , 2015)	France	Prospective	mCRC	CRT	34	34	41	60,6	18 months
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2018)	Denmark	Prospective	mCRC	Cetuximab, Irinotecan Everolimus	115	82			0,6 years (7 days - 3,8 years)

Reference	Country	Study design	Diagnosis	Treatment	N, total	N, biomarker	male (%)	Mean age	FUPa
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2014c)	Denmark	Prospective	mCRC	Cetuximab, Irinotecan	108	105	56	62 (38-82)	7 months
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2012)	Denmark	Prospective	mCRC	Irinotecan	108	108	56	62 (38-82)	7 months
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2015)	Denmark	Prospective	mCRC	Cetuximab, Irinotecan	140	140	61,43	63 (36-87)	
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2014b)	Denmark	Prospective	mCRC	Cetuximab, Irinotecan	49	49	63,27	63 (47-76)	
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2014a)	Denmark	Prospective	mCRC	Capecitabine, Gemcitabine	94	86	64	66 (37-83)	9.5 months
(TABERNERO <i>et al.</i> , 2015)	Spain	Prospective, multicenter	mCRC	Regorafenib	760	503	61,05	61 (54-68)	4,9 months (3,2 - 7,0)
(WOFF <i>et al.</i> , 2019)	Belgium	Prospective, non-randomized, multicenter, phase II	mCRC	Regorafenib	141	132	58	67 (32-85)	30 months
(WONG <i>et al.</i> , 2015)	Singapore	Prospective, open-label	mCRC	Regorafenib	37	33	59,46	58 (27-77)	105 days (17-484)
(XU <i>et al.</i> , 2020)	China	Prospective	mCRC	chemotherapy	128	126	71,4	58 (26-84)	

Abbreviations: CLM, colorectal liver metastasis; CRC, colorectal cancer; CRLM, colorectal liver metastasis; LARC, locally advanced rectal cancer; OCC, obstructive colorectal cancer; MLBO, malignant large bowel obstruction; mCRC, metastatic colorectal cancer; NeoCTx, neoadjuvant chemotherapy; CTx, chemotherapy; CRT, chemoradiotherapy; nCRT, neoadjuvant chemoradiotherapy; RT, radio therapy; ACT, adjuvant chemotherapy; cfDNA, circulating free DNA;

Table 4 – cfDNA biomarker, mCRC patients Biomarker Data

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(AMATU <i>et al.</i> , 2019)	cmDNA /ml	D0, D14 (6-75)			ddPCR	CT scan	every 8 weeks	RECIST	Disease progression recurrence
(BEAGAN <i>et al.</i> , 2020)	ng/mL	preoperatively, every 2-4 weeks until 3 months, every 3 months up to 25 months	Streck or EDTA tubes, processed within 8 hours, centrifuged twice, stored at -80°C	QIASymphony Circulating DNA Kit	ddPCR	PET-CT scan	Every 3 months		
(BERGER <i>et al.</i> , 2017)	ng/ml	Therapy initiation, ≤ 7 days	EDTA tubes, Processed within 1 hour at 4°C, centrifuged 10 minutes (820g at 4°C), supernatant centrifuged again 10 minutes (20,000g at 4°C), storage at -80°C.	QIAamp circulating nucleic acid Kit	Qubit 2.0 Fluorometer / Qubit dsDNA HS Assay Kit	CT scan	Baseline, every 2 months	RECIST 1.1	
(BOYSEN <i>et al.</i> , 2018)	ng/ul	baseline, prior to each cycle	Citrate tubes, processed within 2 hours, centrifuged at 2000g for 10 min at 4°C, stored at -80°C	Gold Nucleic Acid Gel Stain	fluorescence	CT scan	Every 3 months	RECIST 1.1	Disease progression
(BOYSEN <i>et al.</i> , 2020b)	ng/ul	pre-treatment, at the end of treatment		Not Applicable	direct fluorescent assay for cfDNA	CT scan		RECIST	progression

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(CABEL <i>et al.</i> , 2017)	GE/ml		EDTA tubes, processed within 1 hour, centrifuged 820g 10 min, at 16,000g 10 min, stored at -80°C.	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	analysis, not requiring any prior processing Qubit Fluorometer	CT scan			death
(GALVANO <i>et al.</i> , 2020)	ng/ul	pretreatment, at evaluation, every 2-3 months	EDTA-tubes	QIAamp Circulating Nucleic Acid	NGS				progression
(HAMFJORD <i>et al.</i> , 2019)	alleles/ml	Baseline	EDTA tubes, Stored at -80°C	CMG-1107 cfNA 1k Kit special H24	ddPCR	CT scan		RECIST 1.0	Disease progression and death
(HE <i>et al.</i> , 2020)	ng/ml	≤7 days preoperatively, ≤7 days postoperatively	streck tubes, processed within 72 h of collection, centrifuged at 2400×g 10 min at 4°C, centrifuged at 16,000×g 5 min at 4 °C, stored at -80 °C	QIAamp Circulating Nucleic Acid kit	PCR		every 3 to 6 months postoperatively		progression
(HUFNAGL <i>et al.</i> , 2020)	pg/ul	Baseline, restaging	within 30 min, centrifuged 10 min 1,500 g, once more 10 min 2,000 g, stored at -80°C	modified phenol-chloroform extraction method	qRT-PCR	CT scan	restaging	RECIST	Disease progression
(IWAI <i>et al.</i> , 2020)	ng/ml	preoperatively, 1 month	EDTA tubes, processed within 2 h, centrifuged 3000g 10 min at -4°C, stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Qubit quantification assay	CT scan	Every 6 months		Early relapse (6 months)
(IWAI <i>et al.</i> , 2016)	Ratio	preoperatively, 1 month		QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	rt-PCR				relapse
(IWAI <i>et al.</i> , 2015)		Surgery, 7 days, every 1-2 months	Stored at -80C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Fluorescence	CT scan	Every 6 months	RECIST	relapse
(JANOWSKI <i>et al.</i> , 2017)	ratio	< 2 months pre-treatment, <2 months post treatment	10 ml of blood, K2-EDTA tube processed, within 30-60 min at 800 g for 10 min at 4°C, centrifuged 13,000 g for 10 min, supernatant stored at -80°C"	QIAamp DNA Blood Mini Kit	qPCR	CT scan, MRI	Preoperatively, post-treatment at 2 months	RECIST	Disease progression
(KITAHARA <i>et al.</i> , 2016)	ng/ml	pre-treatment	EDTA tubes, centrifuged 400 g 15 min at 4°C, stored at -80°C	QIAamp DNA Blood Mini Kit	PicoGreen dsDNA Quantitation Kit				Disease progression
(PAN; ZHANG, 2020)	ng/ml	monthly	EDTA tubes, centrifuged at room temperature	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR				death
(PASTOR <i>et al.</i> , 2021)	ng/ml	baseline, day 15 of cycles 1 and	EDTA tubes, centrifuged at 1200gfor 10 min at 4°C, within 4 h	QIAamp DNA Mini Blood Kit	qPCR	CT scan		RECIST 1.1	progression

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(SEFRIOUI <i>et al.</i> , 2021)	ng/mL	2), end of treatment cycle 3 or 4 (6 weeks)	processed within 2 h, centrifugation at 2700 ×g for 20 min, stored at -80 °C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	fluorimetric method, as previously described	CT scan	every 12 weeks	RECIST 1.1	progression
(SEFRIOUI <i>et al.</i> , 2015)	ng/ml	Before treatment	processed in 2h, centrifugations at 2700g 20 min at room temperature, then 16,000g 10 min at 4°C, stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	dPCR	CT scan	Not standardized	RECIST 1.1	death
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2018)	alleles/ml	before 1 CRT, before 2 CRT, before 3 CRT, at progression	citrate tubes, processed within 2 h, centrifuged (2300g 10 min at 4°C), stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR B2M				Death
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2014c)	alleles/ml	Before each therapy cycle and at each follow-up visit.	EDTA-tubes, centrifuged 2,000 ×g 10 min within 2 h, stored at -80°C	QIASymphony virus/bacteria midi-kit on a QIA-symphony robot	ARMS-qPCR	CT scan	baseline, ≤2 weeks cycle 1, every 12 weeks during treatment, every 3 months during follow-up	RECIST 1.1	Disease progression
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2012)	alleles/ml	pre-treatment	EDTA tubes, Processed within 2 hours, centrifugation at 2,000g 10 minutes, stored at -80°C	QIASymphony virus/bacteria midi-kit	qPCR	CT scan / MRI	Every 9 weeks	RECIST 1.1	Disease progression and death
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2015)	alleles/ml	<14 days pre-treatment	EDTA tubes, centrifuged 2000 g for 10 min at 4°C within 2h, stored at -80°C	QIASymphony virus/bacteria midi-kit on a QIA symphony robot	in-house developed method targeting the PPIA gene	CT scan		RECIST 1.0	Disease Progression
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2014b)	alleles/ml	mid treatment, at progression	EDTA tubes, centrifuged at 2,000g for 10 min within 2 hr of collection, stored at -80°C	QIASymphony virus/bacteria midi-kit on a QIASymphony robot	qPCR	CT scan	Every 9 cycles	RECIST	Disease progression
(SPINDLER <i>et al.</i> , 2014a)	alleles/ml	Baseline, progression	EDTA tube, centrifugation at 2000g for 10 min, within 2 hr, stored at -80°C	QIASymphony virus/bacteria midi-kit on a QIASymphony robot	ARMS-qPCR	CT scan / MRI	Every 9 weeks	RECIST 1.1	Disease progression
(TABERNERO <i>et al.</i> , 2015)	GE/ml	baseline, pretreatment	thawed at room temperature for 10 min, centrifugation"	QIAamp DNA purification kit	qRT-PCR				Disease progression
(WOFF <i>et al.</i> , 2019)	ng/ml	Baseline, during treatment	EDTA tubes, centrifuged within an hour, (2,000 g for 15 min at 4°C), frozen at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Qubit 3.0 fluorometer / Qubit dsDNA HS assay kit	PET-CT scan	Baseline, during treatment	PERCIST	Disease progression



Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(WONG <i>et al.</i> , 2015)	GE	cycle 1 day 1, cycle 1 day 8, and cycle 2 day 21.	centrifugation at room temperature	QIAamp CAN purification kit	LINE-1qRT-PCR	FDG PET-CT scan	<1 week before treatment, cycle 1 day 15, every 2 cycles	RECIST 1.1	Disease progression
(XU <i>et al.</i> , 2020)	ng/ml		centrifuged at 1900×g 10 min at 4°C, processed within 2 hours, centrifuged at 16,000×g 10 min at 4 °C	QIAamp Circulating Nucleic AcidKit	Qubit Fluorometer 3.0				progression

Abbreviations: ctDNA, circulating tumor DNA; MAF, mutation allelic fraction; VAF, variant allele fraction; dPCR, digital polymerase chain reaction; ddPCR, digital droplet polymerase chain reaction; rt-PCR, real time polymerase chain reaction; qRT-PCR, quantitative real time polymerase chain reaction; ARMS-qPCR, amplification-refractory mutation system quantitative polymerase chain reaction; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; CT, computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging; TRG, tumor response grade.

Table 5 – ctDNA biomarker, non-mCRC patients Trial Data

Reference	Country	Study design	Diagnosis	Staging I / II / III / IV / NA, (%)	Treatment	N, total	N, biomarker	male (%)	Mean age	FUPa
(ALLEGRETTI <i>et al.</i> , 2020)	Italy	Prospective, double-blind	CRC	/ / / 26,4 / 7	Surgery	53	12	52,8		11.7 months 40 months
(BENHAIM <i>et al.</i> , 2021)	France	Prospective cohort	CRC	/ 54,5 / 45,5 / /	Surgery	250	187	57,8	66,7 -11,3	5 years
(BONIFACE <i>et al.</i> , 2021)	USA	Prospective	CRC	/ / / /	CRT	5	2	50	46	18 months
(CARPINETTI <i>et al.</i> , 2015)	Brazil	Prospective	CRC	/ 25 / 25 / 25 / 25	nCRT	4	4	50		125 weeks (84-177)
(DIEHL <i>et al.</i> , 2008)	USA	Prospective	CRC	/ 6 / 6 / 88 /	Resection	18	18	44	59,8 (35-82)	(13-56 days)
(DUMBRAVA <i>et al.</i> , 2021)	USA	Retrospective	CRC	/ / / /	systemic therapy		18 (varied)			
(HEDTKE <i>et al.</i> , 2022)	Germany	Retrospective	CRC	2.9 / 4.5 / 14.9 / 54.8 / 22.6	immuno CRT	168	111	64,9	61,7 (33,2-92)	336 days (25–75%:105–427 days)
(HENRIKSEN <i>et al.</i> , 2020)	Denmark	Prospective	CRC	22 / 40 / 38 / 0 /	Surgery	453	436	56	70 (41–91)	
(HENRIKSEN <i>et al.</i> , 2022)	Denmark	Prospective	CRC	8.1 / / 91.9 / /	ACT	168	140	59,4		35 months (IQR, 13–36 months).
(HERRMANN <i>et al.</i> , 2019)	Germany	Prospective	CRC	9 / 10 / 24 / 58 /	nCRT + monoclonal antibodies	104	104	71	65	15 months
(JANKU <i>et al.</i> , 2016)	USA	Prospective	CRC	/ / / /		62	13	55	58 (20-81)	48 months
(KULIGINA <i>et al.</i> , 2021a)	Russia	Prospective	CRC	/ / 100 / /	RT	30	9	33,3	65,777777	4,6 months 6,9 months
(KULIGINA <i>et al.</i> , 2021b)	Russia	Prospective	CRC	/ / / /	FOLFOX, FOLFIRI, Capecitabine	96	54	46,3	65,9	

Reference	Country	Study design	Diagnosis	Staging I / II / III / IV / NA, (%)	Treatment	N, total	N, biomarker	male (%)	Mean age	FUPa
(LIM <i>et al.</i> , 2021)	China	Prospective	CRC	0,04 / 0,158 / 0,393 / 0,408 /	Surgery, Chemotherapy	272	272	57,7	56,5	3 months 9,6 months
(LIN <i>et al.</i> , 2014)	Taiwan	Prospective	CRC	23,56 / 25,65 / 25,65 / 25,13 /	Resection	191	133	59,2	64,9 (27-80)	62 months (12-84)
(MCDUFF <i>et al.</i> , 2021)	USA	Retrospective	CRC	/ 0,20 / 0,79 / /	Radiochemotherapy	29	29	51,7	54 (48-66)	20 months (interquartilerange, 14.0-43 months)
(MURAHASHI <i>et al.</i> , 2020)	Japan	Prospective	LARC	/ 31,8 / 68,2 / /	CTx and/or RT	85	59	76,5	60 52-69	100 weeks
(PAIRAWAN <i>et al.</i> , 2020)	USA	Prospective	CRC	/ / / /		13	13	59	59 (8-84)	8.4 months
(PHALLEN <i>et al.</i> , 2017)	USA	Retrospective	CRC	19,05 / 21,43 / 23,81 / 35,71 /		244	42			
(REINERT <i>et al.</i> , 2019)	Denmark	Prospective	CRC	4 / 31,2 / 64,8 / /	CRT	130	125	54,8	69,9 (43,3-91)	12.5 months 36 months
(REINERT <i>et al.</i> , 2016)	Denmark	Retrospective	CRC	9,09 / 45,45 / 18,18 / 27,27 /	NeoCTx	118	11			36 months
(SATO <i>et al.</i> , 2016)	Japan	Prospective cohort	CRC	8 / 6 / 17 / 0 /	Resection	59	51	51		1 year
(SCHØLER <i>et al.</i> , 2017)	Denmark	Prospective, observational	CRC	/ / / /	chemotherapy radiotherapy radiofrequency ablation resection	118	27			
(SIRAVEGNA <i>et al.</i> , 2015)	Italy	Prospective	CRC	/ / / /		100	100	62	63 (37-88)	150 weeks
(STASIK <i>et al.</i> , 2022)	Germany	Retrospective	CRC	/ 0,071 / 0,285 / 0,642 /	Surgery	14	14	71,4	68 (50–81)	381 days (range 163–962)
(SUN <i>et al.</i> , 2018a)	China	Prospective	CRC	/ / / /	Cetuximab / Panitumumab	140	140	55	57	9 months 20 months
(SUN <i>et al.</i> , 2018b)	China	Prospective	CRC	36,3 / 27,3 / 27,3 / 9,1 /	Resection + CRT	11	11	36,4	57,6 (35-73)	2 years
(SUZUKI <i>et al.</i> , 2020)	Japan	Prospective	CRC	/ / / /		154	77			366 days 2 years
(SYMONDS <i>et al.</i> , 2020)	Australia	Prospective	CRC	0,1458 / 0,347 / 0,4305 / 0,14 /		548	144	63,8		12.6 months (IQR, 11.1-17.4 months)
(TAIEB <i>et al.</i> , 2021)	France	Prospective, multicenter, two-arm, open-label, randomized, phase III	CRC	/ / / /	modified (m)FOLFOX6 or CAPOX	2010	1017	57	63,4 -9,6	6,6 years 6,8 years
(TANAKA <i>et al.</i> , 2021)	Japan	Prospective	CRC	/ 0,181 / 0,454 / 0,363 /	Surgery	362	11	36,3	69 (46–83)	22 months
(TIAN; LIAO; ZHANG, 2017)	China	Prospective	CRC	20 / 27 / 27 / 27 /		150	150	62	60 (56-73)	3 months

Reference	Country	Study design	Diagnosis	Staging I / II / III / IV / NA, (%)	Treatment	N, total	N, biomarker	male (%)	Mean age	FUPa
(TIE <i>et al.</i> , 2021)	Australia	Prospective	CRC	/ / / /	Surgery	485	485	59	63	47 months (4 - 84 months)
(WANG <i>et al.</i> , 2021b)	China	Prospective, cohort	LARC	/ / / /	nCRT	119	103	71,4	57	644 days (35-925)
(XIE <i>et al.</i> , 2021)	USA	Prospective	CRC	0,04 / 0,09 / 0,34 / 0,49 /	Surgery, Chemotherapy	160	100	59	55	
(YAEGASHI <i>et al.</i> , 2021)	Japan	Prospective, observational	CRC	/ / / /	surgery + CRT	44	12			
(ZHOU <i>et al.</i> , 2021)	China	Prospective multicenter trial	LARC	/ 0,0480 / 0,951 / /	nCRT	106	104	64,4	62,4	18,8 months
(ZHOU <i>et al.</i> , 2016)	China	Prospective observational study	CRC	16,66 / 16,66 / 66,66 / /	Resection + adjuvant CRT	6	6	33,33	64 (57-75)	46 months 5 years
(ZOU <i>et al.</i> , 2020)	New Zealand	Prospective	CRC	/ 0,0333 / 0,333 / 0,633 /	CRT	60	28	48,3	65	2 years

Abbreviations: CLM, colorectal liver metastasis; CRC, colorectal cancer; CRLM, colorectal liver metastasis; LARC, locally advanced rectal cancer; OCC, obstructive colorectal cancer; MLBO, malignant large bowel obstruction; mCRC, metastatic colorectal cancer; NeoCTx, neoadjuvant chemotherapy; CTx, chemotherapy; CRT, chemoradiotherapy; nCRT, neoadjuvant chemoradiotherapy; RT, radio therapy; ACT, adjuvant chemotherapy; ctDNA, circulating tumor DNA;

Table 6 – ctDNA biomarker, non-mCRC patients Biomarker Data

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(ALLEGRETTI <i>et al.</i> , 2020)	copies/ml	baseline, 3 month	K2EDTA tubes, processed within 1 h, centrifugation at 4 °C (2000 xg for 20 min, and 16,000 xg for 10 min), stored at -80°	QIAamp circulating nucleic acid kit	dPCR / Qubit dsDNA HS assay kit	CT scan	every 3 months		recurrence
(BENHAIM <i>et al.</i> , 2021)	ng/mL	preoperatively, 5 days postoperatively, every 3-6 months during 3-5 years	EDTA tubes, centrifugation at 3,000g (4°C), stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR / Qubit 2.0 fluorometer	Clinical examination and ultrasound scans	Every 3-6 months		recurrence
(BONIFACE <i>et al.</i> , 2021)	hGE/mL		Processed within 6 hours, centrifuged twice, stored at -80°C	QIAgen Blood Kit	Qubit 3 fluorometric quantification system	histological evaluation (biopsy)	diagnosis, recurrence		recurrence
(CARPINETTI <i>et al.</i> , 2015)	Copies/ml	Every 3 weeks	EDTA tubes, processed within 2 hours, centrifuged twice, stored at -80°C.	QIAamp MinElute Virus Vacuum Kit	RNaseP Copy Number Reference Assay / ddPCR	CT scan + clinical evaluation	Week 13, Every 3 months		Metastasis
(DIEHL <i>et al.</i> , 2008)	molecules/ml	D0, D1, D2-10, D13-56	EDTA tubes, processed within one hour, centrifugation 820g 10 min transferred 1-ml, centrifuged 16,000g	QIAamp MinElute Virus Vacuum Kit	qPCR	CT scan			Recurrence



Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(MCDUFF <i>et al.</i> , 2021)	MAF (%)	baseline, before NeoCRT, preoperatively, postoperatively	centrifugation at room temperature 10 min at 1,600×g, the second at room temperature 10 min at 3,000×g, stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR	CT scan, MRI			recurrence
(MURAHASHI <i>et al.</i> , 2020)	MAF (%)	baseline, preoperatively, 12 weeks postoperatively	EDTA tubes, centrifugation at 1600 ×g 10 min at 4 °C, followed by 16,000×g 10 min at 4 °C	MagMAX cfDNA Isolation Kit	Qubit 2.0 / 2100 Bioanalyzer	CT scan, MRI, clinicopathological	4-8 weeks after end of treatment	TRG	recurrence
(PAIRAWAN <i>et al.</i> , 2020)	VAF (%)	disease progression	Tubos Streck, processed within 48 hours	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Illumina HiSeq 2500		1 year		death
(PHALLEN <i>et al.</i> , 2017)	Mutant allele fraction	baseline, surgery	EDTA tubes, 2 hours at 4°C, stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	TEC-Seq method	histological evaluation (biopsy)			Disease progression
(REINERT <i>et al.</i> , 2019)	VAF (%)	Preoperatively (-14 days), D30, Every 3 months (max 36)	K2-EDTA tubes, processed within 2 hours, Centrifuged 10 minutes at 3000g, centrifuged 10 minutes at 3000g, stored at -80°C.	QIAamp Circulating Nucleic Acid kit	Quant-iT High Sensitivity dsDNA Assay Kit	CT scan	12.5 (1.4-38.5) months	Clinicopathological assessment	Recurrence
(REINERT <i>et al.</i> , 2016)	GE/ml	D0, D8, D30, every 3 months until 36 months or death		QIAamp DNA Blood Midi Kit / QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR	CT scan	Every 3 months	Clinicopathological assessment	Relapse
(SATO <i>et al.</i> , 2016)	MAF (%)		CPT tube, processed within 2 hours, centrifuged 1800 g 20 min at room temperature, stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit					
(SCHØLER <i>et al.</i> , 2017)	GE/ml	D0, D8, D30, every 3 months until 36 months or death		QIAamp DNA Mini Blood Kit / QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR	CT scan	Every 3 months		Relapse
(SIRAVEGNA <i>et al.</i> , 2015)	GE/ml			QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR	CT scan		RECIST	Disease progression
(STASIK <i>et al.</i> , 2022)	VAF (%)			QIASymphony instrument / PAXcircDNA_STA_2400 protocol	qPCR	imaging			recurrence
(SUN <i>et al.</i> , 2018a)	ng	monthly for 9 months	EDTA tubes, Processed immediately, Centrifugation 400g for 35mi at 20°C, Centrifugation at 1,000g for 10 min, atored at -20°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid kit	ddPCR				death
(SUN <i>et al.</i> , 2018b)	VAF (%)	4-10 weeks postoperatively, twice-monthly up to six months	EDTA tubes centrifuged 1,600g 10 min at 4°C within 2 h centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C, stored at -80°C.	QIAamp Circulating Nucleic Acid kit	Qubit 2.0 fluorometer / Qubit dsDNA HS Assay kit	CT scan	Every 6 months		Disease Progression

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(SUZUKI <i>et al.</i> , 2020)	MAF (%)	pre-operative, post-operative, every 3 months until 2 years	EDTA-2Na tubes, within 6 hr, centrifugation 2,000 ×g at 4°C for 10 min, second of 16,000 ×g at 4°C for 10 min, stored at -80°C	MagMAX Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation kit	ddPCR / Qubit fluorometer	CT scan	pre-operative, post-operative, every 3 months until 2 years		recurrence
(SYMONDS <i>et al.</i> , 2020)	pg		K3EDTA tubes, centrifugation at 1,500 g for 10 min at 4 °C, repeat centrifugation, stored at -80 °C	QIAcube HT instrument	rt-PCR	CT scan	every 12 months		recurrence
(TAIEB <i>et al.</i> , 2021)	%	median 42 days postoperatively	EDTA tubes, centrifugation at 1500 g bufor 15 min within 24h to 48h from blood collection, and stored at -80°C	ccfDNA plasma kit by RSC Maxwell / QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR / Qubit 2.0 fluorometer using the dsDNA HS Assay				recurrence
(TANAKA <i>et al.</i> , 2021)	MAF (%)	1 week preoperatively, postoperatively on days 1 and 30	BD Vacutainer® PPT plasma preparation tube, centrifuged at 1100×g for 10 min at 4 °C, within 2 h, stored at-80 °C	Maxwell RSC ccfDNA plasma kit	QuantStudio™ 3D Digital PCR System				recurrence
(TIAN; LIAO; ZHANG, 2017)	copies/ml	monthly for 3 months	EDTA tubes, processed within 3 hours, centrifugated twice 1,000 g for 15 min at 4°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Nanodrop 2000	histological evaluation (biopsy) Imaging	postoperetively		Curative resection
(TIE <i>et al.</i> , 2021)	MAF (%)	4-6 weeks, 6-8 weeks, 8-10 weeks postperatively beforen CRT,	EDTA tubes, centrifuged twice, stored at -80°C.	Safe-SeqS	Safe-SeqS				recurrence
(WANG <i>et al.</i> , 2021b)	VAF (%)	15th time fraction nCRT, 25th time fraction nCRT, < 1 day preoperatively, 5-12 days post operatively				Clinicopathological + MRI		TRG	progression
(XIE <i>et al.</i> , 2021)	fold change								recurrence
(YAEGASHI <i>et al.</i> , 2021)	VAF (%)	every 1-3 months	centrifuged at 1800×g for 20 min at room temperature, stored at-80 °C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	dPCR / Qubit12.0 dsDNA high-sensitivity assay kit	CT scan			recurrence
(ZHOU <i>et al.</i> , 2021)	VAF (%)	baseline, cycle 1, 7 weeks after nCRT, preoperatively, <1 month postoperatively	EDTA Tubes, process within 3 hours, 2 centrifugation (2,500g, 10 minutes and 16,000g, 10 minutes)	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit		CT scan	every 6 months for 1 year, annually up to 5 years.		recurrence

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	ctDNA extraction	ctDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(ZHOU <i>et al.</i> , 2016)	VAF (%)	1 weeks preoperatively, 1 month postoperatively, every 3 months	EDTA tubes, processed within 3 h, centrifugation at 2,500 g for 10 min, after centrifuged at 16,000 g for 10 min	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Qubit fluorometer	histological evaluation (biopsy)	Postoperatively		relapse
(ZOU <i>et al.</i> , 2020)	copies/ml	every 12 weeks up to 1 year, every 24 weeks until relapse up to a maximum of 2 years		QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR	CT scan	after every blood drawn	Clinicopathological assessment	recurrence

Abbreviations: ctDNA, circulating tumor DNA; MAF, mutation allelic fraction; VAF, variant allele fraction; dPCR, digital polymerase chain reaction; ddPCR, digital droplet polymerase chain reaction; rt-PCR, real time polymerase chain reaction; qRT-PCR, quantitative real time polymerase chain reaction; ARMS-qPCR, amplification-refractory mutation system quantitative polymerase chain reaction; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; CT, computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging; TRG, tumor response grade.

Table 7 – ctDNA biomarker, mCRC patients Trial Data

Reference	Country	Study design	Diagnosis	Treatment	N, total	N, biomarker	male (%)	Mean age	FUPa
(BIDARD <i>et al.</i> , 2019)	France	Prospective, secondary analysis	CLM	FOLFIRINOX, FOLFOX/FOLFIRI + liver resection	153	35		60 (25-75)	37.2 months (0-55.3)
(BOECKX <i>et al.</i> , 2018)	Belgium	Prospective	mCRC	Chemotherapy (1st line)	24	21	62,5	67 (38-82)	800 days
(BOYSEN <i>et al.</i> , 2020a)	Denmark	Prospective translational	mCRC	Surgery or SBRT	35	5	51	70.5 (36-81)	21 months 5 years
(EL MESSAOUDI <i>et al.</i> , 2016)	France	Prospective cohort	mCRC	CRT	106	97	59,8	66,6	36 months (0-104)
(GARLAN <i>et al.</i> , 2017)	France	Prospective exploratory	mCRC	CRT (1-2 lines)	82	63	59,8	67,6 (35,0-90,7)	40 months
(HAMFJORD <i>et al.</i> , 2021)	Norway	Prospective, phase III	mCRC	cetuximab + 5-FU/folinic acid + oxaliplatin	566	253	56,13		35,5 months
(HOLM <i>et al.</i> , 2020)H	Finland	Prospective multicenter, open-label, single-arm, phaseII	mCRC	B-CAPOX or B-CAPIRI	10	10	70	63 (38-76)	51,4 months
(HSU <i>et al.</i> , 2018)	Taiwan	Retrospective	mCRC	Bevacizumab/FOLFIRI cetuximab/FOLFIRI	32	18	66	58,5	31 weeks 44 weeks
(JENSEN <i>et al.</i> , 2019)	Denmark	Prospective, single-arm, phase II	mCRC	Regorafenib	100	38	53	65 (28-77)	18 months
(JIA <i>et al.</i> , 2021)	China	Prospective	mCRC	FOLFOX or FOLFIRI	20	20	70	60 (34 - 76)	6.9 months (range 1.6-26.6)

Reference	Country	Study design	Diagnosis	Treatment	N, total	N, biomarker	male (%)	Mean age	FUPa
(JIA <i>et al.</i> , 2019)	China	Prospective	mCRC	FOLFOX/FOLFIRI	47	41		62 (28-79)	(12 cycles )
(KLEIN-SCORY <i>et al.</i> , 2020)	Germany	Prospective	mCRC	FOLFIRI, FOLFOX, FOLFOXIRI, or 5-Fluoruracil (5-FU) + bevacizumab	12	12	41,6	69	19,4 months
(KLEIN-SCORY <i>et al.</i> , 2018)	Germany	Prospective	mCRC		3	3	33	51 (37-66)	
(LIM <i>et al.</i> , 2021)	South Korea	Prospective	mCRC	chemotherapy + cetuximab	93	54	75,3	61 (26–80)	42 months
(LIU <i>et al.</i> , 2020)	China	Prospective, observational study	mCRC	CTx	36	5	75	56 (28–77)	18,5 months
(LUEONG <i>et al.</i> , 2020)	Germany	Prospective, randomized, 3-arm, phase 3	mCRC	g	825	151	66	63,1 9,6	24 weeks
(LYSKJÆR <i>et al.</i> , 2019)	Denmark	Prospective, phase II	mCRC	FOLFIRI	24	24	54,17	64,5 (29-81)	
(MANCA <i>et al.</i> , 2021)	Italy	Prospective multicenter, randomized, open-label, phase II	mCRC	panitumumab	120	120			50 months
(MA <i>et al.</i> , 2020)	USA	Prospective, randomized, open-label, multicenter, phase II	mCRC	cFOLFOXIRI-BEV, sFOLFOXIRI-BEV, or FOLFOX-BEV	280	54	57,4	58 (36–74)	19.3 months (6.7–28.0)
(MOATI <i>et al.</i> , 2020)	France	Prospective	mCRC	CTx	115	36	63,8	66 [34–86]	
(MOSER <i>et al.</i> , 2020)	Austria	Prospective	mCRC	FOLFOX or FOLFIRI	13	11	53,84	61	52 hours
(OSUMI <i>et al.</i> , 2019)	Japan	Prospective	mCRC	CRT	29	29	48,3	57 (39-76)	8 weeks
(POLIVKA <i>et al.</i> , 2020)	Czech Republic	Retrospective	CRLM	Surgery	71	71	59	62,7	4.1 years
(RUSSO <i>et al.</i> , 2016)	USA	Case report	mCRC	Panitumumab Trametinib	1	1			4 months
(SIRAVEGNA <i>et al.</i> , 2019)	Italy	Prospective, open label, phase II	mCRC	Lapatinib-trastuzumab	29	29	78,58	63 (41-86)	
(TAKEGAWA <i>et al.</i> , 2015)	Japan	Prospective	mCRC	Cetuximab	18	18	72,22	(51-80)	784 days
(THIERRY <i>et al.</i> , 2017)	France	Retrospective	mCRC	FOLFOX6 + cetuximab, dasatinib	46	46	64,3	58,5 (26-74 )	
(THOMSEN <i>et al.</i> , 2020)	Denmark	Prospective	mCRC	CTx and bevacizumab	123	123	63	67 (32–80)	17.8 months



Reference	Country	Study design	Diagnosis	Treatment	N, total	N, biomarker	male (%)	Mean age	FUPa
(THOMSEN <i>et al.</i> , 2018)	Denmark	Prospective	mCRC	CRT (1 line)	152	77	62	66 (35-79)	35.3 months
(TIE <i>et al.</i> , 2015)	Australia	Prospective, multicenter	mCRC	Oxiplatin Irinotecano	54	42	61,5	64,6 (55,5-71,2)	20 months
(UNSELD <i>et al.</i> , 2021)	Austria	Prospective, multicenter, translational, phase II	mCRC	regorafenib	30	12	76	60	4,8 months
(WANG <i>et al.</i> , 2021a)	China	Prospective	CRLM	Surgery	137	91	51,6	59	17.4 months (6.6-28.7)
(YAMAUCHI <i>et al.</i> , 2018)	Japan	Prospective	mCRC	Bevacizumab	21	21			4.5 months

Abbreviations: CLM, colorectal liver metastasis; CRC, colorectal cancer; CRLM, colorectal liver metastasis; LARC, locally advanced rectal cancer; OCC, obstructive colorectal cancer; MLBO, malignant large bowel obstruction; mCRC, metastatic colorectal cancer; NeoCTx, neoadjuvant chemotherapy; CTx, chemotherapy; CRT, chemoradiotherapy; nCRT, neoadjuvant chemoradiotherapy; RT, radio therapy; ACT, adjuvant chemotherapy; ctDNA, circulating tumor DNA;

Table 8 – ctDNA biomarker, mCRC patients Biomarker Data

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(BIDARD <i>et al.</i> , 2019)	copies/ml	4 weeks		QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR				Liver Resection
(BOECKX <i>et al.</i> , 2018)	%	treatment initiation, cycle 2, first radiographic evaluation, disease progression or curative surgery.	EDTA tube, centrifuged 1500g 10 min, stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Qubit 2.0 fluorometer dsDNA High Sensitivity Assay	CT scan	T3, T4		Disease progression
(BOYSEN <i>et al.</i> , 2020a)	alleles/mL	2 weeks postoperatively, every 3 months up to 1 year, at 18 months, at 24 months, every year up to 5 years	EDTA tubes, centrifugation at 2000g for 10 min, within 2 h, stored at -80°C	Chemagen 360 purification robot	ddPCR	CT scan	every 3 months up to 1 year, at 18 months, at 24 months, then yearly up to 5 years		recurrence
(EL MESSAOUDI <i>et al.</i> , 2016)	ng/ml		K3 EDTA tubes, within 1 hour, centrifugation 10 min 1,200 g at -4°C, second centrifugation 10 min at -4°C 16,000 g, stored at -20°C.	Qiagen blood mini kit	Intplex qPCR				death
(GARLAN <i>et al.</i> , 2017)	ng/ml	Baseline, cycle 1, cycle 2 (at 2 weeks), cycle 3 (at 4 weeks)	EDTA tubes, centrifugation at 2 000g 10 min, stored at -20°C, centrifuged 15 min 2 000g.	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	pdPCR	CT scan	Every 8 weeks	RECIST 1.1	Disease progression
(HAMFJORD <i>et al.</i> , 2021)	MAF (%)	baseline, pretreatment	K2EDTA tubes, centrifugation for 10 minutes at 1400g, stored at -70°C to -80°C	chemagic CMG-1107 cfNA 1kKit special	ddPCR	CT scan		RECIST 1.0	progression

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(HOLM <i>et al.</i> , 2020)H	MAF (%)	baseline, cycle 1 (3 weeks), response evaluation (every 9 weeks), progression	EDTA tubes, centrifuged within 30 min, stored at -20 °C, moved to -80 °C within two weeks	H24 on a PerkinElmer chemagic 360 robot QiaSymphony DSP Circulating DNA Kit	ddPCR	CT scan	every 9 weeks	RECIST 1.1	progression
(HSU <i>et al.</i> , 2018)	%	Baseline, Response, Progression	Cell-Free DNA BCT tubes (Streck)	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Quanti-iT dsDNA HS Assay qPCR	CT scan	Baseline, Response, Progression every cycle 2	RECIST 1.0	Treatment response
(JENSEN <i>et al.</i> , 2019)	%	pre treatment, 2 weeks pre each cycle, end of treatment, progression	EDTA tubes, centrifuged 2000 g 10 min, stored at -80°C, within 4 hours	QIASymphony Circulating DNA Kit		Imaging		RECIST 1.1	Death
(JIA <i>et al.</i> , 2021)	MAF (%)	pre-treatment, after cycle 4	EDTA tubes, centrifuged 10 min at 1600 g at 4 °C, within 2 hours, stored at -20 °C, re-centrifuged at 16,000 g for 10 min, stored at -80 °C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	NGS	CT scan	baseline, 4 cycles	RECIST 1.1	progression
(JIA <i>et al.</i> , 2019)	MAF (%)	pretreatment ≤7 days (C0), prior to cycles 2, 3, and 4 ≤3 days before (C1, C2, and C3).	EDTA tubes, centrifuged 10 min 1,600 g at 4°C within 2 h, supernatants centrifuged 16,000 g 10 min, stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Qubit 2.0 Fluorometer / Qubit dsDNA HS Assay kit	CT scan	baseline, after 4 cycles	RECIST 1.1	Disease progression
(KLEIN-SCORY <i>et al.</i> , 2020)	MAF (%)		STRECK BCT tubes or in K2-EDTA tubes, stored at -80°C	QIAamp circulating nucleic acid kit	ddPCR	CT scan	Every 3 months		progression
(KLEIN-SCORY <i>et al.</i> , 2018)	ng/ml								
(LIM <i>et al.</i> , 2021)	VAF (%)	≤7 days before treatment, at response evaluation	EDTA tubes, centrifuged with Ficoll solution at 1500×g for 15 min, centrifugation at 16,000×g for 10 min, stored at -80 °C	cfKapture™ Ki	2200 TapeStation	CT scan	baseline, every four cycles or at progressive disease.	RECIST 1.1	progression
(LIU <i>et al.</i> , 2020)	ratio	every tumor evaluation	EDTA tubes, processed within 5 days of collection, centrifuged at 1600g 10 min followed, again at 16,000g 10 min, stored at -80 °C	MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit	Qubit 3.0 fluorometer	CT scan	every 4 cycles (2 months)	RECIST 1.1	progression
(LUEONG <i>et al.</i> , 2020)	copies/ml	baseline, 15 to 22 days after treatment		Maxwell RSC VR ccfDNA plasma kit	ddPCR / Quantus fluorometer	CT scan	week 24	RECIST 1.0	progression
(LYSKJÆR <i>et al.</i> , 2019)	alleles/ml		EDTA tubes, centrifugation at 1400 g for 20 min at 20 °C, stored at -80 °C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR	CT scan		RECIST 1.1	progression

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(MANCA <i>et al.</i> , 2021)	VAf (%)	baseline, every 8 weeks until disease progression, consent withdrawal, or death		Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit	Qubit dsDNA HS Assay Kit	CT scan		RECIST 1.1	progression
(MA <i>et al.</i> , 2020)	MAF (%)	pre-induction, end of the induction		cobas cfDNA Sample Preparation Kit	Qubit HS assay	CT scan	baseline, every 8 weeks	RECIST 1.1	progression
(MOATI <i>et al.</i> , 2020)	MAF (%)	baseline		Maxwell@RSC ccfDNA Plasma kit	ddPCR	CT scan	every 8 week	RECIST 1.1	progression
(MOSER <i>et al.</i> , 2020)	MAF (%)	pretreatment, mid therapy (9 samples)	EDTA tubes containing 10% NBF or Streck tubes, stored at -80 °C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	qPCR / Qubit dsDNA HS Assay Kit	CT scan	Baseline, after FOLFOX	RECIST	progression
(OSUMI <i>et al.</i> , 2019)	Ratio	Therapy initiation, within 2 weeks, within 8 weeks	EDTA tubes, centrifugation within 1600 g 10 min at 4 °C, followed by another spin at 16,000 g	MagMAX cfDNA Isolation Kit	Previously described	CT scan	8 weeks	RECIST 1.1	Disease progression
(POLIVKA <i>et al.</i> , 2020)	pFA		K3EDTA tubes, two-step centrifugation of at 950 rcf at 10 min at 4°C and then at 11,000 rcf at 10 min at 4°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR			RECIST	death
(RUSSO <i>et al.</i> , 2016)	GE/ml		EDTA Tubes, processed within 5h, Stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR	CT scan	3 months		
(SIRAVEGNA <i>et al.</i> , 2019)	pCN		EDTA Tubes, Processed within 5 hours, stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Illumina HiSeq 2500 or Illumina NextSeq 500	Radiographic imaging		RECIST 1.1	Disease progression
(TAKEGAWA <i>et al.</i> , 2015)	Ratio			QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	ddPCR			RECIST 1.1	Disease progression
(THIERRY <i>et al.</i> , 2017)	ng/ml	every 4 cycles	centrifuged at 1,600g at 4°C 10 min, centrifuged at 16,000g at 4°C 10 min, stored at -20°C"	QIAamp DNA Mini Blood Kit	Intplex qPCR	CT scan	every 4 cycles	RECIST 1.1	Disease progression
(THOMSEN <i>et al.</i> , 2020)	alleles/ml	baseline, after cycle 1	EDTA tubes, centrifugation at 2000g for 10minutes, within 4 hours, stored at -80°C	QIASymphony SP instrument using QIASymphony DSP circulating DNA kit	ddPCR	CT scan	baseline, every 3 cycles	RECIST 1.1	progression
(THOMSEN <i>et al.</i> , 2018)	%	baseline and before every treatment cycle	EDTA tubes, centrifugation at 2,000g for 10 minutes, within 4 hours, stored at - 80°C, centrifuged again at 10,000g for 10 minutes	QIASymphony DSP Virus/Pathogen midi kit	ddPCR	CT scan	every cycle 3	RECIST	Disease progression
(TIE <i>et al.</i> , 2015)	% Mutant alleles	Pretreatment ≤ 7 days therapy initiation, 3 days, Cycle 2 (14-21 days)	3h processing	QIAamp Circulating Nucleic Acid kit	MPS with Illumina MiSeq instrument	CT scan	baseline, at 8–10 weeks	RECIST 1.1	Disease progression

Reference	Unit of measure	Collection timepoint	Sample handling	cfDNA extraction	cfDNA analysis	RT Exam	Timepoint of RT assessment	RT Evaluation Criteria	Recurrence outcome
(UNSELD <i>et al.</i> , 2021)	VAF (%)	< 2 weeks before treatment, every 4 weeks		DSP Circulating DNA kit	Qubit dsDNA HS Assay Kit	CT scan	baseline, every 8 weeks	RECIST 1.1	progression
(WANG <i>et al.</i> , 2021a)	VAF (%)	baseline, preoperatively, post operatively, post-aCT, disease progression	K2 EDTA tube, centrifuged at 1600× g 10 minutes at 4°C, centrifuged at 10,000 × g 10 min at 4°C, stored at -80°C	QIAamp Circulating Nucleic Acid kit	PCR / Qubit 2.0	CT scan			response
(YAMAUCHI <i>et al.</i> , 2018)	MAF (%)	baseline, remission, progression	EDTA tube, centrifugation process 3,500 rpm for 10 min followed by 12,000 rpm for 10 min at 4°C, stored at -80°C	QIAGEN Plasmid Plus Kit	Qubit HS	CT scan	Baseline, Remission, Post-progression	RECIST 1.1	Disease progression

Abbreviations: ctDNA, circulating tumor DNA; MAF, mutation allelic fraction; VAF, variant allele fraction; dPCR, digital polymerase chain reaction; ddPCR, digital droplet polymerase chain reaction; rt-PCR, real time polymerase chain reaction; qRT-PCR, quantitative real time polymerase chain reaction; ARMS-qPCR, amplification-refractory mutation system quantitative polymerase chain reaction; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; CT, computed tomography; MRI, magnetic resonance imaging; TRG, tumor response grade.

## ANEXO IV

Table 9 – Data input for for ctDNA biomarker meta-analysis

ID	Diagnosis	Study treatment	N	GA	Unit of measure	Index test collection timepoint	mean FUP	max FUP	transversal cut vs longitudinal FUP	reference test GA	Cut-off	TP	TN	FP	FN	Reference
2	CRC	Surgery	10	< 35	copies/ml	other	12 months	40 months	every 3 months	≥20 months	0.04	3	7	0	0	(ALLEGRETTI <i>et al.</i> , 2020)
6	CRC	Surgery	178	≥ 35	ng/mL	baseline		60 months	36 months cut	≥20 months	0.01 ng/ml	39	102	7	30	(BENHAIM <i>et al.</i> , 2021)
10	mCRC	CRT	125	≥ 35	copies/ml	other	37 months		post therapy	≥20 months	0.1%	28	28	20	49	(BIDARD <i>et al.</i> , 2019)
11	mCRC	CRT	14	< 35	MAF (%)	baseline		26 months	ongoing approach	≥20 months	43,84%	4	3	1	6	(BOECKX <i>et al.</i> , 2018)
15	mCRC	CRT	35	≥ 35	alleles/ml	other	21 months	60 months	ongoing approach	≥20 months	0.1%	4	17	1	13	(BOYSEN <i>et al.</i> , 2020a)
21	CRC	Surgery	11	< 35	molecules/ml	baseline		2 months	ongoing approach	<20 months	42	5	4	0	2	(DIEHL <i>et al.</i> , 2008)d
23	mCRC	CRT	97	≥ 35	ng/ml	baseline	36 months		40 months cut	≥20 months	26 ng/ml	43	8	6	40	(EL MESSAOUDI <i>et al.</i> , 2016)
27	mCRC	CRT	82	≥ 35	ng/ml	baseline		40 months	20 months cut	≥20 months	10 ng/ml	12	31	3	36	(GARLAN <i>et al.</i> , 2017)
29	mCRC	CRT	159	≥ 35	MAF (%)	baseline		36 months	36 months cut	≥20 months	0.1	108	11	6	34	(HAMFJORD <i>et al.</i> , 2021)
34	CRC	CRT	140	≥ 35	GE/ml	other	35 months		ongoing approach	≥20 months	2 variants (LoD)	16	98	4	22	(HENRIKSEN <i>et al.</i> , 2022)
37	mCRC	Combined	15	< 35	MAF (%)	other	7 months	10 months	ongoing approach	<20 months	80% decrease	2	9	0	4	(HSU <i>et al.</i> , 2018)
45	mCRC	CRT	20	< 35	MAF (%)	baseline	7 months		post therapy	<20 months	6.8%	12	3	0	5	(JIA <i>et al.</i> , 2021)
49	mCRC	Combined	12	< 35	MAF (%)	other		20 months	post therapy	≥20 months	80% reduction	1	10	1	0	(KLEIN-SCORY <i>et al.</i> , 2020)
51	CRC	CRT	9	< 35	VAF (%)	baseline	5 months	7 months	post therapy	<20 months	0.5%	2	5	2	0	(KULIGINA <i>et al.</i> , 2021a)

ID	Diagnosis	Study treatment	N	GA	Unit of measure	Index test collection timepoint	mean FUP	max FUP	transversal cut vs longitudinal FUP	reference test GA	Cut-off	TP	TN	FP	FN	Reference
52	CRC	CRT	54	≥ 35	copies/ml	baseline			baseline	<20 months	1 copy/ml	29	13	9	3	(KULIGINA <i>et al.</i> , 2021b)
56	mCRC	Combined	83	≥ 35	VAF (%)	baseline		42 months	every cycles	4 ≥20 months	0.01	4	63	16	0	(LIM <i>et al.</i> , 2021)
58	CRC	Surgery	133	≥ 35	copies/ml	baseline	62 months		60 months cut	≥20 months	6000 copies/ml	38	52	28	15	(LIN <i>et al.</i> , 2014)
60	mCRC	Combined	150	≥ 35	copies/ml	other		6 months	6 months cut	<20 months	32 copies/ml	26	54	64	6	(LUEONG <i>et al.</i> , 2020)
61	mCRC	CRT	21	< 35	alleles/ml	baseline		48 months	7 months cut	<20 months	75th centile	5	6	1	9	(LYSKJÆR <i>et al.</i> , 2019)l
62	mCRC	IMMUNOTHERAPY	120	≥ 35	VAF (%)	baseline		50 months	20 months cut	≥20 months	0.05	10	34	0	76	(MANCA <i>et al.</i> , 2021)
63	mCRC	CRT	54	≥ 35	MAF (%)	other	20 months		10 months cut	<20 months	0.3%	9	23	4	18	(MA <i>et al.</i> , 2020)
64	CRC	CRT	19	< 35	MAF (%)	other	20 months		ongoing approach	≥20 months	2 alleles	4	13	0	2	(MCDUFF <i>et al.</i> , 2021)
65	mCRC	CRT	36	≥ 35	MAF (%)	baseline		40 months	every months	2 ≥20 months	20,92%	16	7	1	12	(MOATI <i>et al.</i> , 2020)
67	CRC	CRT	59	≥ 35	MAF (%)	other		23 months	20 months cut	≥20 months	0.5%	4	52	2	1	(MURAHASHI <i>et al.</i> , 2020)
69	mCRC	CRT	26	< 35	Ratio	other		2 months	4 months cut	<20 months	0.5	7	13	3	3	(OSUMI <i>et al.</i> , 2019)os
74	CRC	Surgery	31	< 35	MAF (%)	baseline		30 months	20 months cut	≥20 months	0.02	3	26	2	0	(PHALLEN <i>et al.</i> , 2017)
75	mCRC	Surgery	30	< 35	MAF (%)	baseline	49 months		49 months cut	≥20 months	3.33%	6	8	0	16	(POLIVKA <i>et al.</i> , 2020)
78	CRC	CRT	11	< 35	GE/ml	baseline		36 months	every months	3 ≥20 months	200 GE/ml	4	5	0	2	(REINERT <i>et al.</i> , 2016)
85	CRC	IMMUNOTHERAPY	85	≥ 35	GE/ml	baseline		34 months	ongoing approach	≥20 months	163292 GE/ml	13	48	13	11	(SIRAVEGNA <i>et al.</i> , 2015)
101	CRC	CRT	960	≥ 35	MAF (%)	other	80 months	82 months	36 months cut	≥20 months	0.02	16	702	22	220	(TAIEB <i>et al.</i> , 2021)
104	mCRC	IMMUNOTHERAPY	18	< 35	Ratio	other		26 months	ongoing approach	≥20 months	1.25	3	9	1	5	(TAKEGAWA <i>et al.</i> , 2015)t

ID	Diagnosis	Study treatment	N	GA	Unit of measure	Index test collection timepoint	mean FUP	max FUP	transversal cut vs longitudinal FUP	reference test GA	Cut-off	TP	TN	FP	FN	Reference
107	mCRC	Combined	121	≥ 35	MAF (%)	baseline	18 months		every 3 cycles	<20 months	0	19	9	88	5	(THOMSEN <i>et al.</i> , 2020)
108	mCRC	CRT	65	≥ 35	MAF (%)	other	36 months		cycle 8 cut	<20 months	0	22	8	16	19	(THOMSEN <i>et al.</i> , 2018)
110	CRC	Surgery	36	≥ 35	MAF (%)	baseline	47 months		24 months cut	≥20 months	0.046%	15	11	3	7	(TIE <i>et al.</i> , 2021)
111	mCRC	CRT	42	≥ 35	MAF (%)	other		20 months	2 months cut	<20 months	10 fold reduction	15	14	8	5	(TIE <i>et al.</i> , 2015)
112	mCRC	IMMUNOTHERAPY	30	< 35	VAF (%)	baseline	5 months		48 months cut	≥20 months	0.05	16	7	4	3	(UNSELD <i>et al.</i> , 2021)
114	mCRC	Surgery	46	≥ 35	VAF (%)	baseline	18 months		post therapy	<20 months	10 fold reduction	23	11	9	3	(WANG <i>et al.</i> , 2021a)
121	mCRC	IMMUNOTHERAPY	21	< 35	MAF (%)	other	5 months		17 months cut	<20 months	2% reduction	6	8	7	0	(YAMAUCHI <i>et al.</i> , 2018)t
124	CRC	CRT	104	≥ 35	VAF (%)	baseline	19 months		10 months cut	<20 months	0.01	8	79	12	5	(ZHOU <i>et al.</i> , 2021)
127	CRC	CRT	30	< 35	copies/ml	other		24 months	treatment period	≥20 months	5 copies/ml increase	16	7	4	3	(ZOU <i>et al.</i> , 2020)

Abbreviations: CRC, colorectal cancer; mCRC, metastatic colorectal cancer; MAF, mutation allelic fraction; VAF, variant allele fraction; FUP, follow-up; GA, group analysis, GE, genome equivalents; CRT, chemoradiotherapy; TP, true positive; TN, true negative; FP, false positive; FN, false negative.

Table 10 – Data input for for cfDNA biomarker meta-analysis

ID	Diagnosis	Study treatment	N	GA	mean FUP	max FUP	unit	collection timepoint	transversal cut vs longitudinal FUP	Reference test GA	Cut-off	Cut-off GA	TP	TN	FP	FN	REFERENCE
1	CRC	CRT	67	≥ 35	48 months		ng/ml	baseline	post therapy	≥20 months	0.5	<20 ng/ml	35	12	13	7	(AGOSTINI <i>et al.</i> , 2011)
5	CRC	Surgery	114	≥ 35	52 months		ng/ml	baseline	52 months cut	≥20 months	17.58 ng/ml	20 ng/ml	23	50	34	7	(BEDIN <i>et al.</i> , 2017)

ID	Diagnosis	Study treatment	N	GA	mean FUP	max FUP	unit	collection timepoint	transversal cut vs longitudinal FUP	Reference test GA	Cut-off	Cut-off GA	TP	TN	FP	FN	REFERENCE
7	mCRC	CRT	28	< 35	2 months	14 months	ng/ml	other	ongoing approach	<20 months	≥ 10% change	change	24	2	0	2	(BERGER <i>et al.</i> , 2017)
16	mCRC	Surgery	60	≥ 35		36 months	ng/ml	baseline	ongoing approach	≥20 months	1300 ng/ml	>20 ng/ml	3	45	1	11	(BOYSEN <i>et al.</i> , 2020b)
18	CRC	Combined	46	≥ 35		12 months	ng/ml	baseline	6 months cut	<20 months	50 ng/ml	>20 ng/ml	15	15	6	10	(CAMERA <i>et al.</i> , 2020)
25	CRC	CRT	33	< 35		28 months	ng/ml	baseline	24 months cut	≥20 months	18 ng/ml	20 ng/ml	12	3	5	13	(FUJII <i>et al.</i> , 2017)
31	mCRC	Surgery	19	< 35		20 months	ng/ml	baseline	10 months cut	<20 months	17,16 ng/ml	20 ng/ml	2	11	2	4	(HE <i>et al.</i> , 2020)
39	mCRC	Surgery	41	≥ 35	18 months		ng/ml	baseline	every 6 months	<20 months	420 ng/ml	>20 ng/ml	8	12	14	7	(IWAI <i>et al.</i> , 2020)
40	mCRC	Surgery	18	< 35	12 months		ratio	other	ongoing approach	<20 months	increase vs decrease	change	8	10	0	0	(IWAI <i>et al.</i> , 2016)
72	mCRC	IMMUNOTHERAPY	31	< 35		15 months	ng/ml	baseline	9 months cut	<20 months	2 ng/ml	<20 ng/ml	10	9	2	10	(PASTOR <i>et al.</i> , 2021)
83	mCRC	CRT	157	≥ 35		3 months	ng/ml	baseline	every 3 months	<20 months	24,4 ng/ml	20 ng/ml	28	65	48	16	(SEFRIQUI <i>et al.</i> , 2021)
84	mCRC	CRT	34	< 35	18 months		ng/ml	baseline	18 months cut	<20 months	20 ng/ml	20 ng/ml	7	13	2	12	(SEFRIQUI <i>et al.</i> , 2015)
87	CRC	Surgery	44	≥ 35	57 months		ng/ml	baseline	ongoing approach	≥20 months	7500 ng/ml	>20 ng/ml	11	16	14	3	(SONG <i>et al.</i> , 2021)
96	CRC	CRT	34	< 35	1 month		ng/ml	baseline	post therapy	<20 months	20 ng/ml	20 ng/ml	13	8	13	0	(SUN <i>et al.</i> , 2014)
113	CRC	IMMUNOTHERAPY	20	< 35	8 months	26 months	ng/ml	baseline	8 months cut	<20 months	1500 ng/ml	>20 ng/ml	9	6	1	4	(VANDEPUTTE <i>et al.</i> , 2018)
116	mCRC	IMMUNOTHERAPY	134	≥ 35	30 months		ng/ml	baseline	5 months cut	<20 months	50 ng/ml	>20 ng/ml	63	28	8	35	(WOFF <i>et al.</i> , 2019)
126	CRC	Combined	25	< 35			ng/ml	other	post therapy	<20 months	4,1 ng/ml	<20 ng/ml	12	7	1	5	(ZITT <i>et al.</i> , 2008)

Abbreviations: CRC, colorectal cancer; mCRC, metastatic colorectal cancer; FUP, follow-up; GA, group analysis; CRT, chemoradiotherapy; TP, true positive; TN, true negative; FP, false positive; FN, false negative.