

VERA MARIA FERNANDES BUGALHO LADEIRAS

**ANÁLISES SANGUÍNEAS NA DETECÇÃO DE
CANCRO**

Orientador(a): Professora Doutora Marisa Nicolai

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciência e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2019

VERA MARIA FERNANDES BUGALHO LADEIRAS

**ANÁLISES SANGUÍNEAS NA DETECÇÃO DE
CANCRO**

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
no dia 22 de Novembro de 2019, perante o júri,
nomeado pelo Despacho de Nomeação nº206/2019 de 2
de Agosto, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente: Prof^a. Doutora Maria Lídia Palma

Orientador: Prof^a. Doutora Marisa Nicolai

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Saúde e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2019

*Não é na ciência que está a felicidade,
mas na aquisição da ciência.*

Edgar Allan Poe

DEDICATÓRIA

À minha mãe, por me ter ajudado a chegar aqui. Sem o seu esforço não teria sido possível. Muito obrigada.

Ao meu namorado, Pedro Cardoso pelo incentivo e apoio para acabar este período da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Doutora Professora Marisa Nicolai, pela sua amabilidade e disponibilidade para me ajudar.

Ao Dr. José Pedro Silva pelo incentivo e pela compreensão.

Às minhas colegas/amigas da Farmácia Barreto, Andreia Ferreira e Andreia De Almeida pelo apoio.

A todos os meus amigos pelo companheirismo e alegria que me têm dado.

RESUMO

O cancro representa uma das principais ameaças para a nossa sociedade, tanto a nível económico, como em qualidade de vida. O diagnóstico precoce pode aumentar a probabilidade de cura e melhorar as condições de sobrevivência.

A detecção de cancro no sangue pode ser realizada através de biomarcadores tumorais. Hoje em dia, os principais marcadores utilizados ainda não apresentam a especificidade e a sensibilidade pretendidas. São raras as excepções em que são utilizados na prática oncológica.

As biópsias líquidas vieram trazer um novo conceito para a área de oncologia. Consistem em técnicas não invasivas de detecção, e análise de biomarcadores genéticos, provenientes de células tumorais. Os principais biomarcadores estudados são: as células tumorais circulantes (CTC), ADN tumoral circulante (ctDNA) e os exossomas (EXO). Estes marcadores podem vir a ser uma solução para a detecção e diagnóstico de cancro, uma vez que permitem estudar a heterogeneidade temporal e espacial.

Esta tese de mestrado é uma revisão bibliográfica que se vai focar na importância clínica destes testes clínicos na detecção do cancro, a biogénese e as características destes biomarcadores e as técnicas de isolamento utilizadas. Assim como os desafios e as expectativas para que possam ser implementadas durante a prática clínica.

Palavras-chave: biópsias líquidas, biomarcadores, células tumorais circulantes, ADN tumoral circulante, exossomas.

ABSTRACT

Cancer is a major threat to our society, both economically and with respect to quality of life. Early diagnosis can increase the likelihood of cure and improve survival conditions.

Blood cancer is detected by tumor biomarkers. Nowadays, the main markers used don't have the desired specificity and sensitivity. The exceptions in which they are used in cancer practice are rare.

Liquid biopsies have brought a new concept to the field of oncology. They consist of noninvasive detection techniques and analysis of genetic biomarkers from tumor cells. The main biomarkers studied are: circulating tumor cells (CTC), circulating tumor DNA (ctDNA) and exosomes (EXO). These markers may prove to be a solution for cancer detection and diagnosis, as they allow the study of temporal and spatial heterogeneity.

This master's thesis is a bibliographical review that will focus on the clinical importance of these clinical tests in cancer detection, the biogenesis and characteristics of these biomarkers and on the isolation techniques used. As well as the challenges and expectations so that they can be implemented during clinical practice.

Keywords: liquid biopsies, biomarkers, circulating tumor cells, circulating tumor DNA, exosomes.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP – Alfafetoproteína

APC - *Adenomatosis-polyposis-coli*

BEAMing - *Beads, emulsion, amplification and magnetics*

CCR – Cancro colo-rectal

cfDNA - *Circulating free DNA*

CHC - Carcinoma hepatocelular

CO – Cancro do ovário

CTC - Células Tumorais Circulantes

DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*

ddPCR - *droplet digital polymerase chain reaction*

DEP – Dielectroforese

EAU - *European Association of Urology*

FDA - *Food and Drug Administration*

FHIT - *Fragile histidine triad*

GPC1 – Glipicanos-1

EMT - *Epithelial-mesenchymal transition*

EpCAM - *Epithelial cell adhesion molecule*

ESMO - *European Society for Medical Oncology*

ISSET – *Isolation by size of epithelial tumor cells*

g – Gramas

mRNA - RNA mensageiros

miRNA - microRNA

ml – Milímetro

NGS - *next generation sequencing*

nm – Nanometro

ng – Nanograma

PSA – *Prostate Specific Antigen*

RASSF1A - *Ras association domain family 1*

TAC - Tomografia Axial Computorizada

TAm-Seq - *tagged amplicon deep sequencing*)

WHO – *World Health Organization*

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO	11
1.1 Biomarcadores tumorais.....	14
1.1.1 Antígeno Específico da Próstata	14
1.1.2 Antígeno carcino-embrionário	15
1.1.3 Alfafetoproteína	16
1.1.4 Antígeno carbohidratado 19-9	17
1.1.5 Antígeno carbohidratado 125	18
1.2 Biópsias Líquidas.....	20
1.2.1 Células tumorais circulantes	21
1.2.1.1 Métodos de detecção	22
1.2.1.1.1 Propriedades físicas.....	23
1.2.1.1.2 Propriedades biológicas	24
1.2.1.2 As CTC como biomarcador.....	26
1.2.2 Ácido desoxirribonucleico tumoral circulante.....	26
1.2.2.1 Métodos de detecção	27
1.2.2.2 ctDNA e biomarcadores tumorais	28
1.2.3 Exossomas	30
1.2.3.1 Métodos de detecção	32
1.2.3.2 Exossomas e biomarcadores tumorais.....	33
1.2.3.2.1 Proteínas.....	33
1.2.3.2.2 MicroRNA	36
CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS	40

ÍNDICE DE QUADROS

Quadros 1. Proteínas exossomais estudadas para o diagnóstico de cancro.	35
Quadros 2. microRNA exossomais estudados para o diagnóstico de cancro.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biópsias líquidas	21
Figura 2. Técnicas de isolamento das células tumorais circulantes	25
Figura 3. Biogénese dos exossomas	31

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que as doenças cancerígenas são uma das principais causas de morte no mundo e responsáveis por 9.6 milhões de mortes segundo as estimativas realizadas em 2018 (World Health Organization [WHO], 2018a). Entre os mais diagnosticados está o cancro dos pulmões (18,4% do total de casos), seguido do cancro da mama (11,6%), próstata (7,1%), colo-rectal (6,1%) e estômago (5,7%) (Bray et al., 2018).

Em Portugal, esse número chegou às 28.960 mortes registadas. Os novos casos diagnosticados apontam para os 58.199, e entre os mais comuns estão o cancro colo-rectal (17,6% do total de casos), da mama (12%), próstata (11,4%), pulmões (9,1%) e estômago (5%) (International Agency for Research on Cancer [IARC], 2018).

O cancro metastizado é a principal causa de mortalidade e morbilidade, é responsável por 90% das mortes em doentes oncológicos (Guan, 2015; Seyfried & Huysentruyt, 2013). Estas elevadas percentagens tornam a detecção e o diagnóstico precoce da doença extremamente relevantes para a patologia. A detecção do cancro num estágio inicial pode permitir que o tratamento seja mais eficaz, reduzindo os custos associados e melhorando os resultados obtidos, com consequente aumento da probabilidade de sobrevivência dos doentes (WHO, 2017). Torna-se fundamental conhecer e compreender toda a fisiopatologia por trás desta doença, de forma a encontrar melhores métodos para a sua detecção e diagnóstico.

A medicina actual recorre cada vez mais a biomarcadores na detecção e diagnóstico de patologias. Estes marcadores podem ser definidos como qualquer parâmetro que possa ser medido, e que seja capaz de reflectir a interacção entre um sistema biológico e um potencial perigo, que pode ser químico, físico ou biológico. A resposta medida pode resultar, a nível celular, de uma forma funcional e fisiológica, bioquímica ou através de uma interacção molecular. Os marcadores podem incluir desde a pressão sanguínea e os batimentos cardíacos até às análises laboratoriais ao sangue e tecidos (Mitchell, Casimir, & Lynch, 2010).

Ao longo dos anos, a análise sérica de biomarcadores tem tido um papel cada vez mais predominante na detecção e controlo das neoplasias. As decisões clínicas importantes

são cada vez mais baseadas nesses resultados, desde o rastreio, previsão da doença, monitorização e controlo de recaídas. Estes biomarcadores, também denominados de marcadores tumorais são indicadores bioquímicos da presença de um tumor e podem ser constituídas por uma variedade de substâncias como antígenos, proteínas citoplasmáticas, enzimas, hormonas, receptores, oncogenes (Duffy, 2012; Sharma, 2009).

As duas principais características destes marcadores devem ser a sensibilidade e a especificidade para um determinado tumor. Contudo, os biomarcadores hoje em dia não apresentam os valores desejados para estes parâmetros e os níveis séricos de um marcador podem estar associados a mais do que um tipo de patologia (Duffy, 2012). Desta maneira, faz com que não possam ser utilizados de forma isolada e exclusiva, mas como exames complementares aos exames imagiológicos e às biópsias teciduais no diagnóstico do cancro (National Institutes of Health [NIH], 2019).

De forma a encontrar biomarcadores mais específicos e que permitam uma caracterização global e actualizada do cancro, os investigadores têm vindo a desenvolver o conceito de biópsias líquidas. Esta técnica consiste na análise de uma amostra de sangue, visando a detecção e caracterização de células e outros constituintes celulares provenientes de células neoplásicas. Os principais compostos que têm vindo a ser estudados são as células tumorais, o ácido desoxirribonucleico tumoral circulante e os exossomas (Ried, Eng, & Sali, 2017).

O desenvolvimento desta ideia deve-se principalmente ao conceito, cada vez mais aceite, de medicina personalizada. Esta abordagem veio revolucionar a practica clínica oncológica, sugerindo que o tratamento oncológico seja individualizado, segundo o perfil genético do doente e do próprio tipo de cancro (Shin, Bode, & Dong, 2017). As doenças neoplásicas estão em constante evolução, sofrendo constantes mutações, o que faz com que apresentem heterogeneidade intertumoral e intratumoral. E o tratamento dependerá de informações específicas e actualizadas sobre as características moleculares do cancro, nomeadamente através de um diagnóstico específico. (Domínguez-Vigil, Moreno-Martínez, Wang, Roehrl, & Barrera-Saldaña, 2018) É neste contexto, que as biópsias líquidas têm gerado muita atenção, sendo uma alternativa mais practica às técnicas convencionais.

Esta tese de mestrado é uma revisão bibliográfica que pretende descrever alguns dos marcadores mais conhecidos e utilizados para a detecção e monitorização dos principais tipos de cancro.

Esta dissertação vai ser dividida em dois capítulos; o primeiro vai descrever os principais marcadores proteicos utilizados diariamente na prática clínica. Contudo, embora estes marcadores sejam mais amplamente conhecidos e estudados, continuam a ser alvo de alguma indeterminação uma vez que podem ser influenciados por outros tipos de condições benignas ou por outras neoplasias para além das aqui mencionadas. E a segunda parte vai focar-se na descrição de novos biomarcadores provenientes directamente das células tumorais, que podem resolver a falta de especificidade dos marcadores tradicionais e que podem permitir uma caracterização em tempo real do tumor.

1.1 Biomarcadores tumorais

Os biomarcadores tumorais são moléculas que podem estar presentes em concentrações mais elevadas no sangue, urina, ou noutros fluídos corporais e tecidos em doentes com cancro (Sturgeon, Lai, & Duffy, 2009; Duffy, 2012). Estes indicadores bioquímicos são libertados para a circulação, pelas células tumorais ou pelo organismo, em resposta à presença de tumor (Nagpal, Singh, Singh, Chauhan, & Zaidi, 2017).

A avaliação sérica destes marcadores é uma importante fonte de informação para os clínicos. Na prática oncológica, esta avaliação é útil no rastreio de cancro, confirmação de diagnóstico, classificação e estágio do tumor, determinação do prognóstico, avaliação da resposta ao tratamento e controlo da recidiva (Sturgeon et al., 2009). O valor de um marcador, na detecção ou no controlo da doença, depende de duas principais características, a sensibilidade e a especificidade desse marcador para um determinado tipo de cancro (Handy, 2009).

Os biomarcadores tumorais apresentam grande potencial na detecção de cancro em indivíduos assintomáticos, mas a sua utilidade na prática clínica ainda não foi totalmente confirmada (Nagpal et al., 2017). A falta de especificidade e sensibilidade dos marcadores limitam a sua utilização no rastreio de cancro (Handy, 2009). Muitos dos biomarcadores utilizados hoje em dia podem apresentar valores elevados em condições benignas (Sharma, 2009). Contudo, os marcadores continuam a ser alvo de estudos e avaliações de forma a serem utilizados no rastreio de neoplasias.

Seguidamente, serão abordados alguns dos marcadores tumorais mais estudados e utilizados na prática clínica.

1.1.1 Antígeno Específico da Próstata

O cancro da próstata em 2018 foi responsável por 1.3 milhões de novos casos diagnosticados e 359.000 das mortes registadas no mundo. É o segundo cancro com maior incidência e a quinta causa de morte no homem (Bray et al., 2018). Ao longo dos anos o número de novos casos tem vindo a aumentar, devido ao desenvolvimento e divulgação do teste de rastreio ao PSA do inglês *prostate specific antigen* ou antígeno específico da próstata. Este marcador foi descoberto em 1970 por Richard Ablin, mas só em 1991 foi

reconhecido o seu potencial na detecção precoce do cancro (Catalona et al., 1994). É uma glicoproteína produzida no epitélio da próstata e segregada no líquido seminal, onde actua como fluidificante. Este marcador circula geralmente complexado à proteínas α 1-antiquimotripsina e à α 2-macroglobulina, e apenas uma pequena porção do PSA permanece na sua forma livre (Nogueira, Corradi, & Eastham, 2009).

Segundo as directrizes da Associação Europeia de Urologia (EAU do inglês, *European Association of Urology*) o PSA é utilizado no rastreio, diagnóstico, estágio e monitorização do cancro. O rastreio é feito a homens com elevados factores de risco, que incluem; idade superior a 50 anos, indivíduos com mais de 45 anos e com história familiar de cancro da próstata e indivíduos de raça negra com mais de 45 anos (Mottet et al., 2018).

O PSA apresenta problemas no que diz respeito à sua especificidade, uma vez que os seus valores também aumentam no caso de outras patologias benignas, como a prostatite e a hiperplasia da próstata (Kim et al., 2015). Contudo, tem havido progressos na análise deste marcador, de forma a aumentar a sua especificidade. Foram desenvolvidos testes complementares, nomeadamente; a medição da densidade do PSA, a sua monitorização ao longo do tempo e a determinação da razão PSA livre/PSA total (Nogueira, Corradi, & Eastham, 2009; Prensner, Rubin, Wei, & Chinnaiyan, 2012).

1.1.2 Antigénio carcino-embrionário

O antigénio carcino-embrionário (CEA) é uma glicoproteína produzida durante o desenvolvimento fetal, mas que pode ser um sinal de malignidade se for produzida depois do nascimento (Fernandes & Matos, 2002; Nagpal et al., 2017). Este antigénio oncofetal é o principal marcador tumoral utilizado no cancro colo-rectal (CCR) (Duffy et al., 2007; Sotaro et al., 2016). Este tipo de cancro afecta principalmente os homens, e tem uma incidência elevada a nível mundial. O CCR registou em 2018 o terceiro maior número de novos casos diagnosticados e em termos da taxa de mortalidade está em segundo lugar (Bray et al., 2018).

A análise do CEA no rastreio e diagnóstico do cancro colo-rectal ainda não foi completamente aceite. É um marcador que apresentou uma sensibilidade entre 46-59% e uma especificidade de 80%, num estudo realizado com doentes com CCR, mas a principal preocupação deve-se ao facto de os valores de CEA poderem ser influenciados por outras

condições e patologias (Gao et al., 2018). Os valores podem estar elevados em patologias benignas, como; o tabagismo, infeções gastrointestinais, úlceras pépticas, doença inflamatória intestinal, pancreatite, hipotireoidismo, cirrose, obstrução biliar (Younesi, 2016). Pode também estar associado a outros tipos de cancro, como o cancro do pulmão, da tiroide, do ovário e o melanoma (Chen et al., 2018; Latteri et al., 2018; Meng et al., 2017; Turkdogan et al., 2018)

A medição do CEA é especialmente utilizada na monitorização do doente e é uma importante ferramenta no seu seguimento, bem como no controlo de recaídas ou de metástases após uma cirurgia curativa (Duffy et al., 2007; Locker et al., 2006). Os estudos demonstram que uma vigilância rigorosa, a cada 2-3 meses, pode aumentar a sobrevida do doente (Duffy et al., 2007; Locker et al., 2006).

1.1.3 Alfafetoproteína

A alfafetoproteína (AFP) é uma proteína encontrada no soro fetal e é produzida inicialmente no saco vitelino e posteriormente pelo fígado do embrião. Depois do nascimento, os níveis séricos baixam drasticamente após um ano e no adulto são bastante baixos (De Mees, Bakker, Szpirer & Szpirer, 2006). A elevação da dosagem sérica deste marcador está relacionada com o carcinoma hepatocelular (CHC) (Bruix, Reig & Sherman, 2016; Galle et al., 2018). Em 2018, foi o sexto cancro mais diagnosticado, e a quarta causa de morte por cancro no mundo (Bray et al., 2018). Aproximadamente 90% dos casos deste carcinoma estão associados etiologias subjacentes como hepatite B e C, ingestão de álcool e exposição de aflatoxina (Galle et al., 2018; McGlynn, Petrick, & London, 2015).

A quantificação da AFP identifica apenas 60% dos doentes com CHC (Bolondi et al., 2001; Bruix et al., 2016). A avaliação sérica pode fornecer falsos positivos, visto que os níveis deste marcador também estão aumentados em doentes com cirrose, hepatite crónica e colangiocarcinoma (Bruix et al., 2016).

Este marcador é útil no diagnóstico precoce em populações de risco. Os níveis séricos da AFP aumentam progressivamente com o tamanho do tumor e com o estágio da doença (Rehman, Samiullah, Sharif, & Farhat, 2016). Os estudos demonstram que a análise quantitativa do AFP sérica, juntamente com as técnicas de ultrassonografia, aumentam a

sensibilidade para a detecção do CHC em doentes com cirrose hepática (Tzartzeva et al., 2018).

1.1.4 Antígeno carbohidratado 19-9

O antígeno carbohidratado 19-9 (CA 19-9, do inglês *carbohydrate antigen*) é o principal biomarcador utilizado no cancro pancreático. E define-se como uma glicoproteína presente na membrana celular e no citoplasma de células tumorais. Normalmente são sintetizadas nas células dos ductos pancreáticos e pelos epitélios cólico, gástrico, da vesícula biliar, endometrial e salivar (Manso et al., 2011).

O cancro pancreático é bastante agressivo e letal, com uma esperança de vida em cinco anos de apenas 5% (Ducreux et al., 2015). Este prognóstico está relacionado com o facto de ser um cancro que apresenta um desenvolvimento rápido e que é diagnosticado apenas nas fases avançadas da doença. A identificação e o rastreio de populações de risco é importante para encontrar doentes nas fases assintomáticas, que ainda possam ser curadas atempadamente (Ducreux et al., 2015).

O uso deste marcador no rastreio de doentes é limitado. O valor preditivo é bastante baixo (0,5-0,9%) (Ballehaninna & Chamberlain, 2012). No que diz respeito ao diagnóstico do cancro pancreático, este marcador apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 80% e uma especificidade de 90% para doentes sintomáticos (Al-Shamsi, Alzahrani, & Wolff, 2016; Onal, Colakoglu, Ulasan, Yapar, & Kayaselcuk, 2012). Contudo, condições benignas como a cirrose, colestasis, colangite e pancreatite também podem elevar os valores séricos da glicoproteína CA 19-9 (Maestranzi, Przemioslo, Mitchell, & Sherwood, 1998; Teng et al., 2018). Outra limitação relacionada com este marcador consiste no facto de 5% da população não produzir este marcador (Ballehaninna & Chamberlain, 2011; Duffy et al., 2009). As pessoas com um grupo sanguíneo com um genótipo Lewis a- b- não produzem o CA 19-9 (Duffy et al., 2009). Ou seja, estas pessoas podem ter o cancro, mas não é detectado na análise quantitativa deste marcador.

As directrizes da Sociedade Europeia de Oncologia Médica indicam que este marcador pode fornecer informações importantes e ser utilizado como factor prognóstico da doença, ajudando na medição da agressividade do cancro, permitindo deste modo a tomada de determinadas decisões clínicas em relação ao tratamento a ser adoptado (Ducreux et al.,

2015). Por exemplo, os doentes apresentam um pior prognóstico, quanto maior for o nível sérico medido no pré-operatório. São especialmente valiosos na avaliação da ressecabilidade tumoral (Zhang, Wang, Sun, Lu, & Wu, 2008). Em alguns estudos foram demonstrados que 96% dos cancros operáveis detectados, apresentavam valores acima dos 1000 U/mL (Al-Shamsi et al., 2016; Colakoglu et al., 2012). Desta forma, estes resultados podem ajudar na monitorização e avaliação da resposta à quimioterapia numa fase avançada da doença, uma vez que uma descida dos valores de CA 19-9, representa melhores respostas nos doentes (Ballehaninna & Chamberlain, 2012; Bauer et al., 2013).

1.1.5 Antigénio carbohidratado 125

O cancro do ovário foi responsável por 295.414 novos casos e por 184.799 das mortes registadas em 2018 (Global Cancer Society [GLOBOCAN], 2019). Este cancro é geralmente diagnosticado na fase mais avançada da doença e apresenta uma taxa de sobrevivência, em cinco anos, que varia entre os 30-40% (Brett et al., 2017). Essa taxa aumenta para 90% se for diagnosticado no primeiro estágio da doença (National Cancer Institute [NCI], 2018).

O antigénio carbohidratado 125 (CA 125, do inglês *cancer antigen 125*), também conhecido como MUC16, é uma glicoproteína membrana da família das mucinas, cujo a elevação sérica encontra-se associada ao cancro do ovário (Felder et al., 2014). Este marcador pode também estar associado a outras patologias, como é o caso de algumas condições benignas (endometriose, gravidez, menstruação, inflamação pélvica e cistos ovarianos) e neoplásicas (por exemplo: pulmão, mama, colon e pancreático) (Ledermann et al., 2013).

A utilidade da CA 125 na detecção precoce do cancro do ovário, assim como na monitorização da doença, ainda não foi comprovada, mas apresenta grande potencial. A sensibilidade deste marcador varia entre 24% e 90%, de acordo com o estágio e o tipo histológico do carcinoma. Pode existir um aumento consoante a extensão da doença (Henriques, Horta, Cunha & Correia, 2015). A elevação dos valores é encontrada em 85% das mulheres com cancro, mas apenas em 50% dos doentes em estágio I (Scholler, Urban, & Gene, 2010; Henriques et al. 2015).

Depois desta sintética abordagem dos principais biomarcadores proteicos conhecidos e utilizados na prática clínica, vou aprofundar outro tipo de marcadores tumorais que têm sido alvo de muito interesse e o foco de vários estudos desenvolvidos ao longo dos anos. O estudo de células ou componentes provenientes dos tumores na detecção do cancro é também denominado de biópsias líquidas.

1.2 Biópsias Líquidas

Os avanços da medicina e da biotecnologia resultaram na descoberta de novas técnicas de diagnóstico, e de avaliação de biomarcadores que permitam a detecção mais prática e precisa de cancro. A biópsia líquida foi uma das descobertas que veio revolucionar a prática clínica oncológica.

A biópsia líquida é uma nova ferramenta de diagnóstico, que consiste no isolamento do sangue periférico de compostos derivados dos tumores e na sua avaliação genómica e proteómica (De Rubis, Rajeev Krishnan, & Bebawy, 2019). Os principais parâmetros estudados nestes métodos são: as células tumorais circulantes (CTC, do inglês *circulating tumor cell*), o ácido desoxirribonucleico tumoral circulante (ctDNA, do inglês *circulating tumoral DNA*) e os exossomas (EXO) (Mathai et al., 2019; Palmirotta et al., 2018).

Esta ferramenta apresenta grande potencial na medida em que pode ultrapassar as limitações das biópsias teciduais (Palmirotta et al., 2018). As biópsias líquidas conseguem identificar mutações de uma forma não invasiva e mais rápida (Kwapisz & Dorota, 2017). Para além disso, conseguem fornecer informações sobre heterogeneidade temporal e espacial dos tumores (Crowley, Di Nicolantonio, Loupakis, & Bardelli, 2013; Sharma, 2009)

De forma a compreender melhor esta técnica é importante estudar os diferentes tipos de constituintes derivados do cancro.

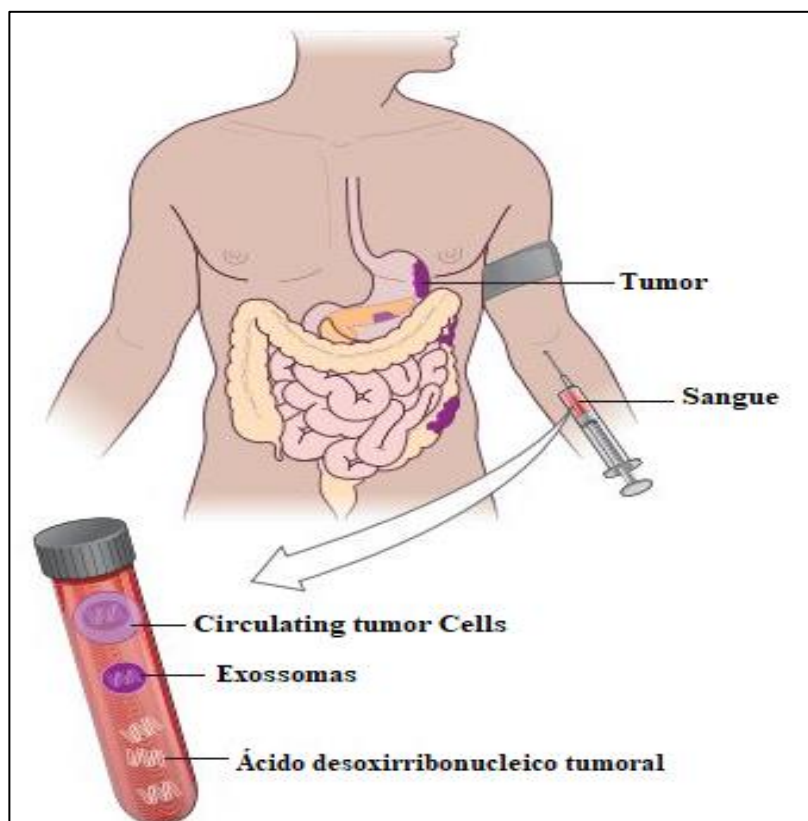


Figura 1. Biópsias líquidas. Adaptado de (Nordgård, Tjensvoll, Gilje, & Søreide, 2018)

1.2.1 Células tumorais circulantes

As células tumorais circulantes foram descritas pela primeira vez por Thomas Ashworth, em 1860. Desde então, o desenvolvimento de novos estudos permitiram descobrir a sua potencialidade na prática oncológica (Zhang et al., 2017).

As CTC são um conjunto de células provenientes de tumores primários ou secundários, que são encontradas na corrente sanguínea (Domínguez-Vigil et al. 2018; Potdar & Lotey, 2015). O número de CTC é extremamente baixo, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento do cancro, podendo chegar a uma CTC por 10^6 - 10^7 leucócitos por milímetro de sangue (Dimitrova et al., 2017; Stott et al., 2010). Estas células são excretadas principalmente durante o crescimento inicial do cancro e podem circular de forma individual ou em aglomerados (Haber & Velculescu, 2014; Ferreira, Ramani, & Jeffrey, 2016; Hanahan & Weinberg, 2011).

Alguns estudos demonstram que a libertação das células para a circulação é feita de duas formas; por transição epitélio-mesenquial (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal*

transition) ou de forma passiva (Chen et al., 2017; Thiery et al., 2009). A EMT consiste na conversão do fenótipo epitelial em mesenquimal. As células epiteliais perdem parcial ou completamente os marcadores epiteliais e adoptam as características de células mesenquimais, tornando-as mais plásticas, favorecendo a migração e a capacidade produzir metástases (Hong & Zhang, 2016; Nieto, 2013; Thiery et al., 2009). A infiltração de forma passiva pode resultar de forças externas, como crescimento tumoral e forças mecânicas (exemplo: cirurgia). Ao contrário dos processos activos, as CTC mantém o fenótipo epitelial (Camara et al., 2006; Chen et al., 2017; Zhang et al., 2017).

Uma vez libertadas, as CTC possuem um tempo de vida curto (Haber & Velculescu, 2014; Sawabata et al., 2016). Estas, podem morrer em circulação por tensões mecânicas tangenciais, por apoptose, por ataques imunitários ou por não terem capacidade para se adaptar a um microambiente estranho (Mitchell & King, 2013; Douma et al., 2004; Schölch et al., 2014).

Os resultados obtidos em estudos realizados com as CTC têm demonstrado um potencial promissor o que pode facilitar a detecção precoce, o prognóstico, a selecção da terapêutica, bem como a monitorização da resposta (Chen et al., 2017).

1.2.1.1 Métodos de detecção

O principal desafio na detecção das CTC consiste na identificação e caracterização das restantes células presentes no sangue (Marrugo-Ramírez, Mir, & Samitier, 2018). As técnicas de detecção encontram alguns obstáculos, como o facto de existirem em pequenas quantidades em circulação e a sua inerente heterogeneidade biológica. Desta forma, é extremamente importante a utilização de meios de detecção com elevada sensibilidade e especificidade (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

Uma análise sérica às CTC começa por um processo de isolamento, de forma a aumentar a concentração de CTC, para que depois possam ser analisadas (Alix-Panabiè Res & Pantel, 2012; Chen et al., 2017). Os vários métodos utilizados baseiam-se nas diferenças físicas e biológicas entre as CTC e as restantes células (Alix-Panabiè Res & Pantel, 2012; Mathai et al., 2019).

1.2.1.1.1 Propriedades físicas

Os métodos de enriquecimento dependem da capacidade para discriminar as CTC das restantes células, tendo por base as suas propriedades físicas, como o tamanho, a densidade e a carga eléctrica (Ramani et al., 2016).

Os métodos de isolamento com base nas propriedades físicas das CTC incluem a filtração por tamanho, centrifugação por gradiente de densidade e separação por dielectroforese (DEP, do inglês *dielectrophoretic*) (Chen et al., 2017).

A filtração por tamanho baseia-se no precedente que as CTC (12-25 μm) são maiores e menos deformáveis que os leucócitos (7-12 μm) (Sollier et al., 2014). Esta técnica consiste em passar o sangue por filtros membranares policarbonados, com poros de aproximadamente 8 μm . Como em princípio as CTC são maiores que o poro, estas vão ficar presas no filtro (Harouaka, Nisic, & Zheng, 2013; Vona et al., 2011). Contudo, estas células são muito heterogéneas, e pode haver CTC mais pequenas que o tamanho do poro que são filtradas. Outra limitação desta técnica resulta da falta de pureza das amostras obtidas, onde pode haver uma misturas das CTC com leucócitos de maior tamanho (Chen et al., 2017). O ISET® (do inglês, *Isolation-by-Size-of-Epithelial-Tumour*) é dos testes mais conhecidos que utilizam este tipo de filtração (Vona et al., 2011).

A centrifugação foi uma das primeiras técnicas utilizadas para o isolamento das CTC (Ramani et al., 2016). A Ficoll-Paque® é o método mais utilizado pelos investigadores e baseia-se na diferença de densidades das CTC das restantes células no sangue. O problema desta técnica é a perda de CTC com densidades elevadas, são capazes apenas de recuperar aproximadamente 70% das células (Chen et al., 2017). De forma a evitar essa perda, foi desenvolvida uma técnica OncoQuick®, onde foram combinadas a centrifugação por densidade e a filtração, adicionando uma barreira porosa ao sistema de forma a capturar as CTC (Ramani et al., 2016).

A técnica de DEP explora as diferenças morfológicas e eléctricas entre as diferentes células (Becker et al., 1995). O teste ApoStream® utiliza este método na separação de células (Gupta et al., 2012). Embora sejam capazes recuperar as CTC com uma viabilidade na ordem dos 97%, apresentam uma taxa de recuperação de aproximadamente 70% (Gupta et al., 2012).

Um dos métodos mais inovadores consiste na utilização de dispositivos microfluídicos. As técnicas baseiam-se em teorias hidrodinâmicas e envolvem o fluxo de sangue em canais, no qual as partículas do fluido movem-se em linhas rectas e paralelas às paredes do tubo (Figura 2). Nestes dispositivos, as células circulam em dois caminhos distintos com diâmetros diferentes. As células maiores não conseguem entrar no tubo mais pequeno, e passam para um caminho secundário de maior tamanho. Como em média as CTC são maiores que os leucócitos, conseguem separar os dois tipos de células (Yu, Stott, Toner, Maheswaran, & Haber, 2011).

O isolamento de acordo com as propriedades físicas oferece algumas vantagens. Não depende da expressão de biomarcadores e deste modo é possível obter células viáveis, intactas e podem ser utilizadas para futuras caracterizações, para além de ser rápidos e baratos (Lozar, Gersak, Cemazar, Kuhar, & Jesenko, 2019). Contudo, os resultados obtidos apresentam baixa especificidade (Shen, Wu, & Chen, 2017).

1.2.1.1.2 Propriedades biológicas

Estes métodos são baseados em processos imunológicos e isolam as CTC mediante a utilização de anticorpos (Haber & Velculescu, 2014; Yu et al. 2011). O isolamento pode ser feito por seleção positiva, na qual os anticorpos capturam os CTC ligando-se a marcadores específicos presentes na superfície destas células. (Chen et al., 2017; Ramani et al., 2016). A outra forma de isolamento pode actuar por depleção dos leucócitos no sangue, utilizando anticorpos que captam antígenos exclusivamente expressados nestas células (exemplo: anti-CD4) (Yang et al., 2009).

O CellSearch® é o único teste aprovado pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) para a detecção das CTC. A sua utilização foi aceite na monitorização de doentes com cancro da mama metastizado, bem como em casos de cancros da próstata e do cólon (Harouaka et al., 2013). Esta técnica funciona por selecção positiva, isolando as CTC que derivam de tumores epiteliais e que possuam marcadores de superfície específicos das células epiteliais, o EpCAM (do inglês, *epithelial cell adhesion molecule*) (Pantel, Brakenhoff, & Brandt, 2008). As CTC são depois identificadas e quantificadas utilizando reagentes fluorescentes, como o anti-CK-ficoeritrina, específico para a citoqueratinas (proteínas específicas das células epiteliais), o DAPI (do inglês, *4',6-diamidino-2-*

phenylindole) que cora o núcleo das células, e o anti-CD45- alofococianina que é específico para os leucócitos. Posteriormente, as CTC que exibam o fenótipo EpCAM⁺/CK⁺/CD4⁻ são atraídas por um forte campo magnético (Andree, van Dalum, & Terstappen, 2016). Esta técnica consegue resultados com um elevado grau de pureza, mas apresenta algumas limitações. Uma desvantagem desta técnica consiste em só conseguir detectar células que possuam marcadores EpCAM. Não consegue detectar células tumorais que tenham sofrido uma EMT ou que circulem em grupos, e que não possuam estes marcadores (Hofman et al., 2011; Ried, Eng, & Sali, 2017b; Smit & Peeper, 2010).

Alguns dispositivos microfluídicos têm vindo a ser desenvolvidos, capazes de separar e detectar CTC com elevada sensibilidade (Pantel et al., 2008). O dispositivo CTC-chip (Figura 1) é um deles e consiste num chip de silicone com milhares de colunas, ou *microposts* revestidos de anticorpos EpCAM. Estes postos aumentam o contacto entre as células e os anticorpos, permitindo um isolamento mais eficaz (Dimitrova et al., 2017; Lingala & Ghany, 2016).

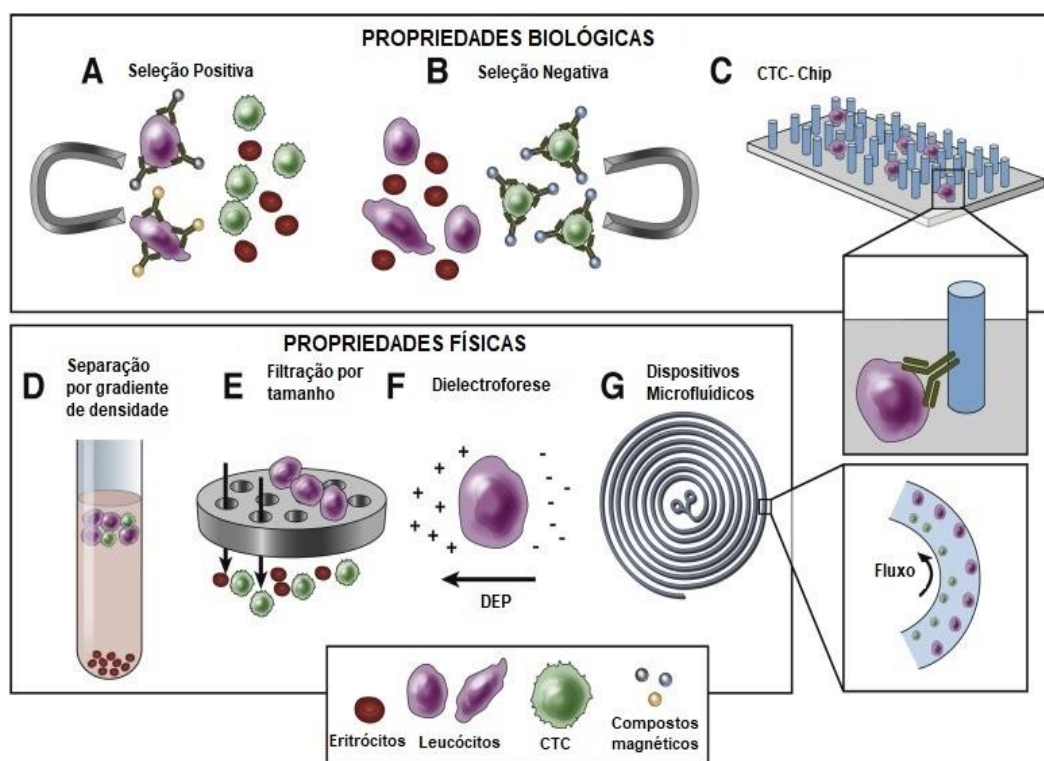


Figura 2. Técnicas de isolamento das células tumorais circulantes (Marrugo-Ramírez et al., 2018, p.4)

1.2.1.2 As CTC como biomarcador

As CTC são células bastante dinâmicas e sofrem constantes alterações durante o decurso da doença e do tratamento (Micalizzi, Maheswaran, & Haber, 2017). Actualmente, as CTC são reconhecidas pelo seu papel no prognóstico e no controlo da efectividade do tratamento da doença (Ried et al., 2017a). Alguns estudos indicam que o número de CTC está directamente relacionado com a progressão da doença e a sobrevivência do doente (Cristofanilli et al., 2004). Por exemplo, uma maior contagem de CTC no cancro da mama metastizado, cancro do cólon, e cancro da próstata está associado a um pior prognóstico e a um maior risco de malignidade (Cristofanilli, 2006; Di Costanzo et al., 2008; Mehra, Zafeiriou, Lorente, Terstappen, & De Bono, 2015). O modo como circulam no sangue é também um factor que indica um maior potencial de metastização e de menor sobrevida. O facto de as CTC circularem em grupo indica um maior probabilidade de metastização (Wang et al., 2017).

A presença destas células em circulação está associada também a um aumento do risco carcinogénico. Durante a carcinogénese, a migração das CTC na circulação inicia-se cedo, mesmo antes de o cancro ser detectável em imagens clínicas. Estudos realizados em modelos animais indicam que estas células encontram-se em circulação, com tumores inferiores a 1 nm (Rhim et al., 2012).

O factor previsional destas células foi demonstrado num estudo feito em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crónica, dos quais em 3% vieram posteriormente a desenvolver cancro pulmonar num período de 1-4 anos (Ilie et al., 2014).

No estudo levado a cabo por Ried et al. (2017), as CTC mostraram também ser um marcador fiável na detecção do cancro da próstata, tendo sido confirmada a sua presença em 50% dos doentes assintomáticos, em 20% dos quais foi depois efectivamente detectada a presença de cancro. Neste grupo, 25% dos doentes não apresentavam valores significativos de PSA.

1.2.2 Ácido desoxirribonucleico tumoral circulante

As primeiras evidências do ácido desoxirribonucleico livre circulante (cfDNA, do inglês *cell-free deoxyribonucleic acid*) no sangue foram reportadas em 1948, por Mendel and Métais em doentes saudáveis (Diaz & Bardelli, 2014; Fiala & Diamandis, 2018). Mas

foi apenas em 1977 que Leon et al. (1977) provaram a correlação entre estas células e o cancro, uma vez que a concentração destas células aumentava em doentes com cancro pancreático. Desde a sua descoberta emergiram um número de estudos, juntamente com a evolução da tecnologia. Hoje em dia, estão a ser estudadas as suas aplicações na detecção precoce de cancro, na determinação do prognóstico, na selecção do tratamento, na monitorização do tratamento e na detecção de recaídas (Fiala & Diamandis, 2018).

Os cfDNA são pequenos fragmentos de ácido desoxirribonucleico que são libertados para a circulação sanguínea, por necrose ou apoptose das células normais e cancerosas (Domínguez-Vigil et al., 2018). A porção proveniente dos tumores é denominada de ácido desoxirribonucleico tumoral circulante (ctDNA) e pode ser encontrado em vários fluidos corporais, como sangue, urina, líquido cefalorraquidiano (Cheng, Su, & Qian, 2016). A concentração destes fragmentos em doentes com cancro pode variar entre 0 e 1000 ng/mL de sangue. No caso de doentes saudáveis, os valores variam entre 0 a 100 ng/mL de sangue (Schwarzenbach, B Hoon, & Pantel, 2011). Em doentes com cancro, as ctDNA representam uma pequena porção das cfDNA, entre 0,1% a 10% consoante a carga tumoral, o estágio do cancro, *turnover* ou renovação celular, e a resposta ao tratamento (Diehl et al., 2008). Estes fragmentos podem carregar várias características específicas dos tumores que lhes deram origem. Contudo, podem possuir mutações, variações no número de cópias génicas, alteração de metilações ou integração de sequências virais (Domínguez-Vigil et al., 2018).

Actualmente, têm sido amplamente estudados devido ao seu potencial como biomarcadores tumorais. A quantificação, a detecção de variações e as mutações nas ctDNA podem ser de especial interesse para a prática clínica.

1.2.2.1 Métodos de detecção

Os principais problemas encontrados na detecção dos ctDNA estão relacionado com a discriminação entre os ctDNA e os cfDNA, a quantificação de porções reduzidas destas moléculas e a quantificação precisa dos fragmentos mutantes numa amostra (Diaz & Bardelli, 2014). A fração de fragmentos de ctDNA em relação ao cfDNA pode ser inferior a 0,1%, dificultando os métodos de detecção e quantificação (Diehl et al., 2008).

O desenvolvimento de novas tecnologias digitais veio facilitar a detecção das ctDNA, uma vez que permitem a pesquisa mais aprofundada das alterações genómicas do

ADN. A detecção pode ser feita segundo duas linhas de ação. A primeira consiste numa abordagem direccionada, através da análise de alterações específicas conhecidas dos tumores primários. Para detectar estas alterações são usadas tecnologias com base na técnica de PCR, como o ddPCR (do inglês, *droplet digital polymerase chain reaction*), o BEAMing (do inglês, *Beads, emulsion, amplification and magnetics*), que apresentam uma elevada sensibilidade (entre 1% a 0,001%) (Elazezy & Joosse, 2018; Palmirotta et al., 2018). Ou através de tecnologias com base na sequenciação de nova geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*), como o TAM-Seq (do inglês *tagged amplicon deep sequencing*) e o CAPP-Seq (do inglês, *cancer personalized profiling by deep sequencing*). A desvantagem desta estratégia direccionada é depender da informação prévia detalhada do genoma tumoral, mas em contrapartida, a análise apresenta uma especificidade e sensibilidade elevada, com um bom custo-efetividade (Cristofanilli & Braun, 2010; Freidin et al., 2015).

A segunda estratégia de detecção consiste na análise geral do genoma das ctDNA, com o objetivo de encontrar mutações pontuais ou rearranjos cromossomais, por sequenciação de todo o genoma tumoral ou por análise do sequenciação completo do exoma (Elazezy & Joosse, 2018; Glenn, 2011). Ao contrário do outro método, este não precisa de informações prévias sobre o genoma tumoral. Pode ser especialmente importante para detectar alterações específicas tumorais, para ajudar a monitorização da doença, detecção de resistências moleculares e novos alvos terapêuticos. A desvantagem está na necessidade de elevadas concentrações de ctDNA para a reconstrução das mudanças genómicas tumorais e apresenta uma sensibilidade reduzida (5%–10%) (Elazezy & Joosse, 2018).

1.2.2.2 ctDNA e biomarcadores tumorais

A análise das ctDNA na detecção precoce do cancro tem gerado muito interesse, mas ainda não se chegou a nenhum consenso em relação ao seu papel na detecção precoce de cancro.

No geral, a quantidade de ctDNA presente no sangue aumenta com a carga tumoral, que pode chegar até 1% do total de cfDNA nos estádio iniciais e até as 40% nos estádios mais avançados da doença (Bettegowda et al., 2014). A quantificação de cfDNA tem sido estudada de forma a rastrear pessoas com cancro. Por exemplo, no caso de doentes com cancro do pulmão de não-pequenas células (tipo mais comum de cancro do pulmão, com um crescimento e metastização mais lentos, por oposição ao cancro do pulmão de pequenas

células, menos comum e que cresce mais rapidamente) foram detectados níveis muito maiores de ctDNA do que em pessoas saudáveis, com uma sensibilidade entre 69–79% e especificidade entre os 83–89% (Catarino et al., 2012; Elazezy & Joosse, 2018). Esta análise também apresentou bons resultados na detecção e prognóstico do cancro da mama (Hashad, Sorour, Ghazal, & Talaat, 2012). Contudo, são muitos os estudos que não apresentam resultados tão favoráveis. O facto de serem moléculas pouco estáveis e com um tempo médio de vida que varia muito, que pode chegar entre os quinze minutos até algumas horas (Hashad et al., 2012). E por isso, os resultados obtidos não são tão consistentes.

Alguns estudos demonstram que a concentração destas moléculas está relacionada com o volume tumoral e com a diminuição da sobrevida global, como se pode ver em estudos realizados com o cancro da mama, ovário, pulmões e colo-rectal (Diehl et al., 2008; Olsson et al., 2015; Shao et al., 2015; Yoon, Park, Sang, Jin, & Jin, 2009). As ctDNA também podem ser utilizadas para detectar doenças residuais mínimas após cirurgias curativas. Foi demonstrado que no cancro do colo-rectal, mama e estômago, a quantidade destes fragmentos no sangue está associada a um pior prognóstico e maior probabilidade de reincidência (Kim et al., 2014; Olsson et al., 2015; Tie et al., 2016).

As vantagens que estas moléculas apresentam, e nas quais os estudos se baseiam, é o facto das ctDNA serem um reflexo das células de origem. As alterações detectadas nestas células vão corresponder às mesmas alterações somáticas da célula original (Phallen et al., 2017). Esta especificidade pode ser muito útil na detecção de cancro.

Os principais obstáculos desta técnica devem-se principalmente a desafios tecnológicos. A identificação de pequenas quantidades de ctDNA em circulação e a separação das restantes cfDNA. Outro problema está relacionado com escolha certa das alterações específicas dos tumores a serem analisadas (Alix-Panabières & Pantel, 2016).

No estudo realizado por Bettgowda et al. (2014) foi avaliada a capacidade de detecção das ctDNA, utilizando técnicas de PCR em 640 doentes com vários tipos de cancros. Embora tenham sido promissores, não foram satisfatórios. Foram identificados entre 47% a 69% dos doentes com cancros localizados, com cancro colo-rectal, cancro pancreático, cancro gastroesofágico e cancro adenocarcinoma. A falta de sensibilidade da técnica utilizada influenciou os resultados.

Outra área de investigação consiste no estudo dos padrões de metilações nas ctDNA, que são uma assinatura epigenética das células de origem. Os recentes estudos utilizam essas modificações no rastreio e detecção precoce de tumores e na monitorização da resposta do doente ao tratamento (Warton, Mahon, & Samimi, 2016).

No caso do cancro da próstata foi encontrada uma metilação no gene da glutathione S-transferase (GSTP1 do inglês, *glutathione S-transferase P*) envolvida nas primeiras etapas da carcinogénese, que pode ser bastante útil no diagnóstico do cancro (Martignano et al., 2016). Alguns estudos indicam que pode ser um exame complementar ao teste PSA (Wu et al., 2011).

A metilação da região promotora do gene da proteína SEPT9 (do inglês, *septin 9*) é o único biomarcador metilado aprovado pelo FDA para o cancro colo-rectal. Os estudos apresentam para este marcador uma elevada sensibilidade (71,1 to 95,6%) e especificidade para a detecção deste cancro (Ma, Williams, Cheng, & Leung, 2019).

A hipermetilação das regiões promotoras do gene da proteína RASSF1A (do inglês, *Ras association domain family 1*) podem ser encontradas em diferentes tipos de cancro. No estudo de Hoque et al. (2006) este marcador apresentou uma sensibilidade 62% e uma especificidade de 82% na detecção de cancro da mama. A combinação de mais do que um gene metilado pode aumentar a sensibilidade do teste, como o caso do RASSF1A e *RARβ* (do inglês, *Retinoic acid receptor beta*)

A hipermetilação encontrada no gene RASSF1A, FHIT (do inglês *fragile histidine triad*), and APC (do inglês, *adenomatosis-polyposis-coli*) podem ser importantes biomarcadores para detecção do cancro renal, com uma elevada sensibilidade (77,9–92,3%) e especificidade (86,7–93,3%) (Skrypkina et al., 2016).

O desenvolvimento de técnicas mais sensíveis é fundamental para que possam ser usados na prática clínica.

1.2.3 Exossomas

Os exossomas (EXO) são vesículas membranares com um diâmetro aproximado entre 40 a 100 nm, que se formam dentro de compartimentos intracelulares multivesiculares, que são excretadas através da fusão com a membrana plasmática (Figura 3) (Théry, 2011).

Estas nanovesículas são libertadas por vários tipos de células e podem ser encontrados em muitos dos fluidos biológicos, como soro, plasma, urina, saliva, líquido cefalorraquidiano e ascite (Raposo & Stoorvogel, 2013; Tai, Chen, Hsieh, & Shen, 2018). Desde a sua descoberta, em 1983, que ao longo dos anos têm sido alvo de vários estudos com interesse na sua composição e função.

Estas nanovesículas estão ligadas aos mecanismos de comunicação intercelular, regulando e participando em processos biológicos e patológicos, incluindo o cancro (De Rubis et al., 2019; Sumrin et al., 2018). Os exossomas transportam diferentes componentes, entre elas; proteínas, lípidos, microRNA (miRNA) e RNA mensageiros (mRNA). No caso dos exossomas tumorais, estes estão associados à estimulação do crescimento tumoral, à supressão da resposta imunitária, na indução de angiogénese e na formação de metástases (Perakis & Speicher, 2017; Skog et al., 2017).

O potencial dos exossomas como biomarcadores tumorais depende do facto dos componentes transportados por estas vesículas possuírem como que a impressão digital molecular da célula de origem, que é mantida estável pela proteção membrana lipídica (Liu et al., 2019; Torrano et al., 2016).

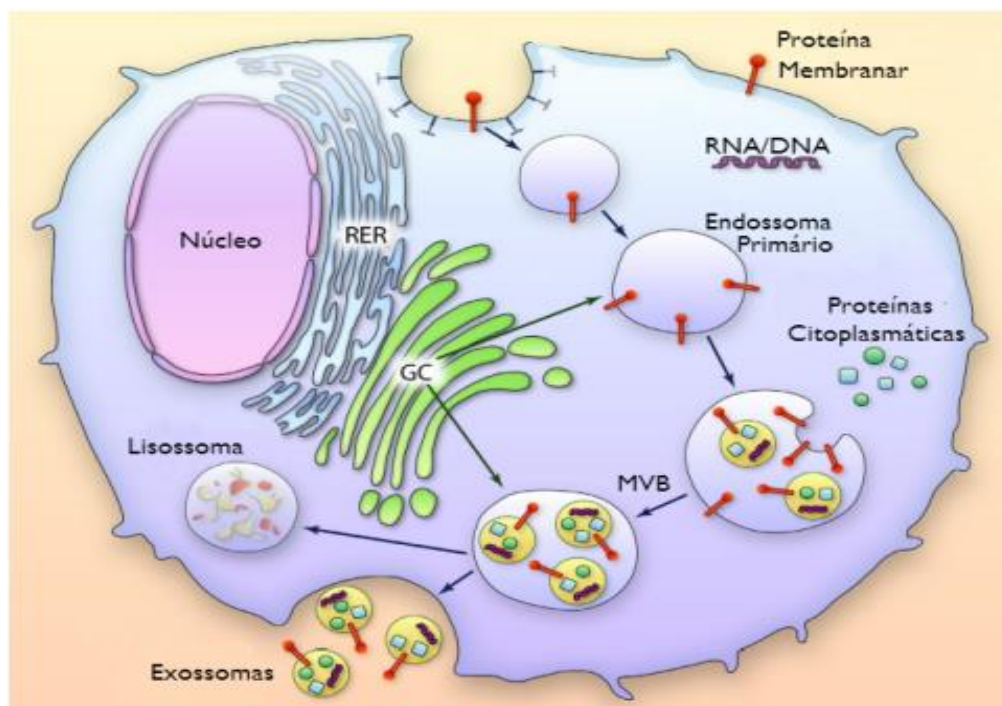


Figura 3. Biogénese dos exossomas (Silva, 2015, p.6).

1.2.3.1 Métodos de detecção

O isolamento dos EXO é feito tendo em conta as propriedades físicas (densidade e tamanho) e propriedades biológicas (expressão dos marcadores) das vesículas (Armstrong & Wildman, 2018).

As técnicas mais utilizadas para o isolamento das vesículas são a centrifugação diferencial e/ou ultracentrifugação e a centrifugação por gradiente de densidade. Entre estas, a ultracentrifugação diferencial é considerada a técnica padrão para o isolamento dos EXOs. Estas técnicas dependem de equipamento dispendioso, são lentas e não garantem a pureza destas vesículas (Armstrong & Wildman, 2018).

O isolamento de acordo com o tamanho é feito por filtração e por cromatografia da exclusão molecular (SEC, do inglês *size-exclusion chromatography*). A SEC tem melhores resultados na recuperação das vesículas comparado com a ultracentrifugação (Taylor & Shah, 2015).

Outro método alternativo consiste no isolamento dos exossomas por precipitação utilizando polímeros, como por exemplo a técnica ExoQuick[®]. É um método simples, fácil, muito rápido (aproximadamente 30 minutos) e que não precisa de equipamento especializado (Li et al., 2017).

O isolamento por imunoafinidade permite isolar determinadas EXO, de acordo com os marcadores apresentados à superfície destas vesículas. Este método utiliza partículas magnéticas conjugadas com anticorpos específicos para se ligar a antígenos específicos, expressos na superfície exossomal (CD63, CD9 e CD81) (Armstrong & Wildman, 2018; Peterson, Otoc, Sethi, Gupta, & Antes). Esta técnica é rápida (4-12 h), fácil e de alto rendimento (Li, Zhang, Zheng, Liu, & Chen, 2017).

Outro método comum de isolamento, especialmente indicado para os exossomas, é a precipitação com polímeros. O polímero reduz a solubilidade das vesículas, para depois serem separadas por centrifugação (Wang, Luo, & Wang, 2018). A ExoQuick[®] é uma das técnicas que utiliza este princípio. É um método simples, fácil, muito rápido (aproximadamente 30 minutos) e que não precisa de equipamento especializado. Esta metodologia apresenta elevados índices de recuperação, mas baixo grau de pureza (Li et al., 2017).

Os exossomas derivadas dos tumores depois de isoladas e analisadas ao microscópio eletrónico ou por citometria de fluxo, a expressão proteica e o perfil genético são investigados de forma encontrar possíveis marcadores de diagnóstico ou prognóstico (Palmirotta et al., 2018).

1.2.3.2 Exossomas e biomarcadores tumorais

Depois de serem isolados e caracterizados, a expressão proteica e o perfil genómico dos exossomas são estudados de forma a encontrar um possível marcador para diagnóstico ou prognóstico. A carga celular que os exossomas transportam, como as proteínas, os mRNA e miRNA podem fornecer muita informação sobre as células, das quais os EXO são excretadas (Peterson et al. 2015).

A quantidade de EXO presentes em circulação está relacionada com a presença de cancro e da sua carga tumoral, como se pode ver no caso do cancro da mama e do cancro pancreático (Melo, Luecke, Kahlert, Fernandez, Gammon, Kaye, LeBleu, et al., 2015). Estas vesículas são muito estáveis em circulação e são encontrados em quase todos os fluidos corporais (Halvaei et al., 2018).

Os EXO apresentam algumas vantagens em relação aos outros componentes nas biópsias líquidas. Comparado com as CTC e as ctDNA, os EXO têm um tamanho mais homogéneo e a sua forma em copo torna-os facilmente reconhecíveis através do microscópio eletrónico (Luga et al., 2012). A segunda vantagem consiste no facto de existirem muitos protocolos disponíveis para o isolamento e caracterização, ao contrário das CTC (Lobb et al., 2015).

1.2.3.2.1 Proteínas

O desenvolvimento de novas biotecnologias e a análise proteómica vieram aprofundar as pesquisas relacionadas com marcadores proteicos. Estes avanços levaram ao estudo das proteínas presentes nos exossomas (Sumrin et al., 2018).

Os exossomas possuem algumas proteínas que são específicas deste tipo de vesículas como as proteínas citosólicas, a actina e a tubulina, assim como as anexinas e as proteínas Rab (envolvidas nos processos de transporte e fusão membranares). Outro grupo

de famílias de proteínas presentes nos exossomas são as proteínas de choque térmico, nomeadamente as HSP70 (do inglês, *heat shock protein` 70*) e HSP90 que estão implicadas na apresentação de antigénio. Um dos grupos proteicos mais abundantes nestas vesículas são as tetraspaninas, como as CD9, CD63, CD81 and CD82 (do inglês, *cluster of differentiation*), que podem ser um marcador específico destas vesículas, e são responsáveis por um conjunto de processos biológicos que passam pela adesão celular, motilidade, invasão membranar, assim como pela sinalização proteica (Théry, Zitvogel, & Amigorena, 2002).

A composição exossomal pode fornecer informações, nomeadamente o estado da célula original e a sua origem. Desta forma, também pode conter muita informação biológica sobre as células tumorais. As proteínas presentes nestas vesículas possuem o perfil específico das células tumorais de origem (Halvaei et al., 2018). Por exemplo, no estudo de Melo et al. (2015) foram identificadas proteínas, glipicanos-1 (GPC1) à superfície dos exossomas derivados das células cancerígenas. Estas proteínas foram especialmente encontradas nestes exossomas. As GPC1 desses exossomas possuem mutações específicas que podem ser utilizadas para distinguir doentes com doenças pancreáticas benignas dos doentes com cancro pancreático (Melo et al., 2015).

No caso do cancro da mama, os estudos realizados por Moon et al. (2016) demonstraram que as proteínas EDIL3 (do inglês, *Epidermal Growth Factor-like repeats and Discoidin I-Like Domains 3*) e a fibronectina apresentavam potencial para biomarcadores na detecção precoce do cancro, uma vez que registavam níveis significativamente superiores nos doentes com cancro do que nas pessoas saudáveis (Moon, Lee, Cho, Lee, Chae, et al., 2016). A EDIL3 é uma proteína da matriz extracelular e desempenha um papel importante na mediação da angiogénese, e na migração e adesão celular (Moon et al., 2016). A fibronectina também pertence à matriz extracelular e ambas se ligam às integrinas (proteínas membranares) e actuam nos processos de adesão e migração celular (Moon et al., 2016).

A survivina pertence ao grupo de proteínas inibidoras da apoptose, e está associada ao desenvolvimento e progressão do cancro da próstata (Khan et al., 2012). No estudo realizado sobre o uso desta proteína na detecção precoce deste cancro foi detectada a presença desta proteína tanto nos exossomas de pessoas saudáveis como nos de doentes com

este cancro. Contudo, o número de exossomas detectados foi significativamente superior nos doentes com cancro (Khan et al., 2012).

O estudo de Zhao et al. (2016) combinou três marcadores associados ao cancro do ovário como CA-125, EpCAM, CD24, e obteve resultados satisfatórios no diagnóstico deste cancro (Zhao, Yang, Zeng, & He, 2016).

O glioblastoma é o mais agressivo dos tumores cerebrais, sendo uma patologia com mau prognóstico. O estudo realizado por Skog et al. (2017) mostrou que o receptor epidermal do factor de crescimento VIII ou EGFRvIII (do inglês, *epidermal growth factor receptor variant III*) foi encontrado nos exossomas de 7 dos 25 doentes com esta doença, e não foi encontrado em doentes saudáveis. Esta proteína é expressa apenas em alguns tumores, e pode contribuir para processos de angiogénese (Skog et al., 2017).

O quadro 1 resume as proteínas exossomais que apresentam potencial como biomarcadores na detecção de cancro.

Quadros 1. Resumo das proteínas exossomais estudadas para o diagnóstico de cancro.

CANCRO	BIOMARCADORES	REFERÊNCIAS
Glioblastoma	Recetor epidermal do fator de crescimento VIII	Skog et al., 2017
Mama	Fibronectina e EDIL3	Moon et al., 2016
Melanoma	CD63, caveolina-1	Logozzi et al., 2009
Ovário	EpCAM, CD24	Zhao, Yang, Zeng, & He, 2016
Pâncreas	Glipicano-1	Melo, Luecke, Kahlert, Fernandez, Gammon, Kaye, LeBleu, et al., 2015
Próstata	Survivina	Khan et al., 2012

1.2.3.2.2 MicroRNA

Os microRNA (miRNA ou mi-R) são pequenas moléculas de RNA não-codificantes, com 19 a 24 nucleótidos, cuja principal função é regular a expressão génica pós-transcricional (Domínguez-Vigil et al., 2018). Estes ligam-se às sequências complementares na região 3' não-traduzida dos RNA mensageiros (mRNA), promovendo a degradação dos mRNA ou o bloqueio da tradução de proteínas (Etheridge, Lee, Hood, Galas, & Wang, 2011).

A quantidade e a composição destes fragmentos varia entre os indivíduos saudáveis e os doentes, o que os torna potenciais biomarcadores (Sumrin et al., 2018; Taylor & Gercel-Taylor, 2008). Eles funcionam inibindo genes supressores tumorais e/ou genes que controlam a diferenciação celular e a apoptose, promovendo o desenvolvimento tumoral (Iorio et al., 2007; Sumrin et al., 2018).

O estudo feito por Taylor & Gercel-Taylor (2008) mostrou que o perfil das miRNA exossomais em circulação podem ser um reflexo do tumor. O padrão de expressão destes componentes é específico do tumor, sendo que diferentes tumores apresentam diferentes padrões de miRNA.

Os estudos conduzidos em diferentes tipos de cancro têm demonstrado possíveis miRNA exossomais como biomarcadores. Por exemplo, um conjunto de oito miRNA (miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200c, miR-200b, miR-203, miR-205 e miR-214), conhecidos como biomarcadores de diagnóstico do cancro do ovário, foram encontrados nos exossomas tumorais das doentes com este cancro (Taylor & Gercel-Taylor, 2008). Outro exemplo, são os miR-375 e miR-141 que apresentam maior número nos doentes com cancro da próstata comparado com os indivíduos saudáveis, havendo a possibilidade de discriminar uma pessoa doente de uma pessoa saudável (Porzycki, Ciszkowicz, Semik, & Tyrka, 2018). No caso do cancro de células escamosas do esófago, o estudo de Tanaka et al. (2013) veio a demonstrar que os níveis de miR-21 exossomais são relativamente maiores nos doentes com este cancro, do que nos doentes com doenças benignas. Estes valores também estão relacionados com um aumento na progressão e agressividade da doença. Alguns dos miRNA exossomais são específicos do tipo de cancro, enquanto que outros podem ser marcadores de diagnóstico e prognóstico para mais de um tipo de cancro (Sumrin et al., 2018). Um desses casos é o

miRNA 21 que pode ser um marcador para os cancros colorectal, ovário, pâncreas, próstata e retinoblastoma (Quadro 2).

No Quadro 2. vai ser apresentado um resumo dos biomarcadores com potencial para o diagnóstico de outros tipos de cancro.

Quadros 2. Resumo dos microRNA exossomais estudados para o diagnóstico de cancro.

Cancro	Biomarcadores	Referências
Colorectal	let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223 e miR-23a	Ogata-Kawata et al., 2014
Glioblastoma	miR-320 e miR-574-3p	Manterola et al., 2014
Hepatocelular	miR-18a, miR-221, miR-222, e miR-224	Sohn et al., 2015
Ovário	miR-373, miR-200a, miR-200b e miR-200c	Meng et al., 2016
	miR-21, miR-141, miR200a, miR-200c, miR-200b, miR-203, miR-205 e miR-214	Mitchell et al., 2008
Mama	miR-106a	Zhao et al., 2016
Pâncreas	miR-17-5p e miR-21	Que, Ding, Chen, & Cao, 2013
Próstata	miR-4289, miR-326, miR-152-3p, miR-98-5p	Matin et al., 2018
	miR-141	Mitchell et al., 2008; Li et al., 2016
Pulmão	miR-125a-5p, miR-145 e miR-146a	Wang, Zheng, Wang, & Zhang, 2015

CONCLUSÃO

A detecção e um diagnóstico precoce do cancro são de extrema importância de forma a reduzir o impacto desta doença no doente e aumentar a possibilidade de cura.

Os biomarcadores proteicos mais utilizados na prática clínica apresentam algumas limitações, no que diz respeito ao rastreio e diagnóstico do cancro. A análise sérica dos marcadores é especialmente utilizada como um factor preditivo da doença, na monitorização do tratamento e no controlo de recaídas. No que diz respeito ao rastreio e diagnóstico, este tipo de marcadores ainda não são muito aceites pelos clínicos, e são raros os casos que são aprovados pelas directrizes médicas. Uma excepção é o PSA, que é amplamente utilizado como um auxiliar no rastreio e diagnóstico do cancro da próstata, mas que é visto com alguma precaução uma vez que pode ser influenciado por outras patologias. A reticência no uso na prática clínica baseia-se principalmente na falta de especificidade e sensibilidade apresentadas pelos marcadores.

As biópsias líquidas têm emergido como uma técnica revolucionária e trouxeram uma nova perspectiva para a prática oncológica. É um conceito promissor capaz de caracterizar a doença cancerígena, de uma forma minimamente invasiva. E desta forma, pode ser usada para melhorar o diagnóstico e o prognóstico da doença. As células tumorais circulantes, o ácido desoxirribonucleico tumoral circulante e os exossomas oferecem uma vasta gama de informações que podem ser utilizados na prática clínica. Ao contrário das biópsias tradicionais, esta técnica pode fornecer informações actualizadas e capazes de abranger a heterogeneidade espacial e temporal do cancro.

As CTC já demonstraram o seu potencial na monitorização do tratamento oncológico, como é o caso do cancro da mama, através de técnicas já aprovadas pela FDA. Mas a sua aplicação na detecção e diagnóstico da doença oncológica ainda não foi validada. O facto de existirem em quantidades muito reduzidas no sangue, dificulta a sua detecção, o que impede que se possam tirar resultados satisfatórios. Outro factor importante depende do facto de os métodos de isolamento existentes para estas células ainda não possuírem a especificidade e sensibilidade adequadas para a detecção destas células, o que pode influenciar os resultados obtidos.

O ácido desoxirribonucleico tumoral circulante tal como as CTC também podem apresentar quantidades bastante reduzidas em circulação, principalmente nas fases iniciais

do desenvolvimento do cancro. São compostos muito variáveis e com um tempo médio de vida também bastante variável. Todas estas variáveis tornam a quantificação e a detecção destes compostos bastante difíceis, tornando-se imperativo o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e específicas. Contudo, os estudos têm apresentado resultados bastante promissores na detecção do cancro, principalmente o estudo das metilações encontradas nos ctDNA, como é o caso da metilação no gene da glutathione S-transferase, para o cancro da próstata e a metilação do gene da septina-9, para o cancro colo-rectal. A análise destas alterações ainda é bastante recente, e são necessários mais estudos para que seja confirmada a sua utilidade na prática clínica.

Os exossomas apresentam algumas vantagens em relação às CTC e às ctDNA, nomeadamente o facto de apresentarem estabilidade em circulação e de manterem o seu conteúdo protegido. Para além disso, os métodos de isolamento para este tipo são viáveis, embora não sejam específicos para exossomas tumorais. O seu conteúdo permite ter uma informação bastante completa relativamente às células tumorais. Os exossomas têm apresentado resultados bastantes animadores, mas o desenvolvimento de novos estudos é essencial para que se possa confirmar a sua utilidade clínica.

O uso desta técnica tem sido cada vez mais recorrente na prática clínica. E embora esta técnica apresente um grande potencial, alguns obstáculos têm que ser ultrapassados para que possa ser usado na prática oncológica. Um importante problema que deve ser abordado no futuro são as limitações na quantificação e caracterização dos diferentes analitos. A falta de métodos padronizados e os resultados insatisfatórios relativamente à sensibilidade e à especificidade dos procedimentos apresentam alguns dos desafios desta técnica. Devem também ser realizados estudos de maior escala de forma a validar este procedimento e avaliar a sua utilidade clínica em diferentes populações.

Contudo, as vantagens e a versatilidade apresentadas pelas biópsias líquidas tornam-nas numa ferramenta promissora para o diagnóstico e prognóstico do cancro.

REFERÊNCIAS

- Al-Shamsi, H. O., Alzahrani, M., & Wolff, R. A. (2016). The clinical utility of normal range carbohydrate antigen 19-9 level as a surrogate marker in evaluating response to treatment in pancreatic cancer-a report of two cases. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 7(3), E45–E51. doi:10.21037/jgo.2016.01.05
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2016). Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discovery*, 6(5), 479–491. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1483
- Andree, K. C., van Dalum, G., & Terstappen, L. W. M. M. (2016). Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Molecular Oncology*, 10(3), 395–407. doi:10.1016/j.molonc.2015.12.002
- Armstrong, D., & Wildman, D. E. (2018). Extracellular Vesicles and the Promise of Continuous Liquid Biopsies. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 52, 1–8. doi:10.4132/jptm.2017.05.21
- Ballehaninna, U. K., & Chamberlain, R. S. (2011). Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer-A Comprehensive Review. *Indian Journal of Surgical Oncology*, 2(2), 88–100. doi:10.1007/s13193-011-0042-1
- Ballehaninna, U. K., & Chamberlain, R. S. (2012). The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(2), 105–119. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021
- Bauer, T. M., El-Rayes, B. F., Li, X., Hammad, N., Philip, P. A., Shields, A. F., ... Bekaii-Saab, T. (2013). Carbohydrate antigen 19-9 is a prognostic and predictive biomarker in patients with advanced pancreatic cancer who receive gemcitabine-containing chemotherapy: A pooled analysis of 6 prospective trials. *Cancer*, 119(2), 285–292. doi:10.1002/cncr.27734
- Becker, F. F., Wang, X., Huang, Y., Pethigt, R., Vykoukal, J., & Gascoyne, P. R. C. (1995). Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 860–864. doi:10.1073/PNAS.92.3.860

- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., ... Diaz, L. A. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*, 6(224). doi:10.1126/scitranslmed.3007094
- Bolondi, L., Sofia, S., Siringo, S., Gaiani, S., Casali, A., Zironi, G., ... Bologna, U. (2001). Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma : a cost e V ectiveness analysis. *Gut*, 48, 251–259. doi:10.1136/gut.48.2.251
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Brett M., R., Jennifer B., P., Thomas A., S., Brett M., R., Jennifer B., P., & Thomas A., S. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biology & Medicine*, 14(1), 9–32. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084
- Bruix, J., Reig, M., & Sherman, M. (2016). Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 150(4), 835–853. doi:10.1053/j.gastro.2015.12.041
- Camara, O., Kavallaris, A., Nöschel, H., Rengsberger, M., Jörke, C., & Pachmann, K. (2006). Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: The fate of malignant and benign mobilized cells. *World Journal of Surgical Oncology*, 4, 1–7. doi:10.1186/1477-7819-4-67
- Catalona, W. J., Smith, Deborah, S., Ratliff, T. L., Dodds, K. M., Coplen, D. E., Yuan, J. J. J., ... Andriole, G. L. (1994). Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 325(3), 147–152.
- Catarino, R., Coelho, A., Araújo, A., Gomes, M., Nogueira, A., Lopes, C., & Medeiros, R. (2012). Circulating DNA: Diagnostic tool and predictive marker for overall survival of NSCLC patients. *PLoS ONE*, 7(6), 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0038559

- Chen, F., Shen, J., Wang, J., Cai, P., & Huang, Y. (2018). Clinical analysis of four serum tumor markers in 458 patients with ovarian tumors : diagnostic value of the combined use of HE4 , CA125 , CA19-9 , and CEA in ovarian tumors. *Cancer Management and Research*, 10, 1313–1318. doi:10.2147/CMAR.S155693
- Chen, L., Bode, A. M., & Dong, Z. (2017). Circulating tumor cells: Moving biological insights into detection. *Theranostics*, 7(10), 2606–2619. doi:10.7150/thno.18588
- Cheng, F., Su, L., & Qian, C. (2016). Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*, 7(30), 48832–48841. doi:10.18632/oncotarget.9453
- Colakoglu, T., Onal, C., Ulsan, S. N., Yapar, A. F., & Kayaselcuk, F. (2012). Biliary obstruction induces extremely elevated serum ca 19-9 levels: Case report. *Onkologie*, 35(12), 780–782. doi:10.1159/000345110
- Cristofanilli, M. (2006). Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *Seminars in Oncology*, 33, 9–14. doi:10.1053/j.seminoncol.2006.03.016
- Cristofanilli, M., & Braun, S. (2010). Circulating tumor cells revisited. *Journal of the American Medical Association*, 303(11), 1092–1093. doi:10.1001/jama.2010.292
- Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., ... Hayes, D. F. (2004). Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(8), 781–791. doi:10.1056/NEJMoa040766
- Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., & Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(8). doi:10.1038/nrclinonc.2013.110
- De Mees, C., Bakker, J., Szpirer, J., & Szpirer, C. (2006). Alpha-Fetoprotein: From a Diagnostic Biomarker to a Key Role in Female Fertility. *Biomarker Insights*, 1. doi:10.1177/117727190600100002
- De Rubis, G., Rajeev Krishnan, S., & Bebawy, M. (2019). Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(3), 172–186. doi:10.1016/j.tips.2019.01.006

- Di Costanzo, F., Pinzani, P., Orlando, C., Gasperoni, S., Vannini, L., Antonuzzo, L., & Mario, P. (2008). Circulating tumour cells in colorectal cancer. *European Journal of Cancer, Supplement*, 6(14), 52–59. doi:10.1016/j.ejcsup.2008.06.097
- Diaz, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology*, 32(6), 579–586. doi:10.1200/JCO.2012.45.2011
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., ... Diaz, L. A. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine*, 14(9), 985–990. doi:10.1038/nm.1789
- Dimitrova, N., Zamudio, J. R., Jong, R. M., Soukup, D., Resnick, R., Sarma, K., ... Jacks, T. (2017). Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients by microchip technology. *PLoS ONE*, 32(7), 736–740. doi:10.1371/journal.pone.0178059
- Domínguez-Vigil, I. G., Moreno-Martínez, A. K., Wang, J. Y., Roehrl, M. H. A., & Barrera-Saldaña, H. A. (2018). The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget*, 9(2), 2912–2922. doi:10.18632/oncotarget.23131
- Douma, S., Douma, S., Van Laar, T., Van Laar, T., Zevenhoven, J., Zevenhoven, J., ... Peeper, D. S. (2004). Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature*, 430(7003), 1034–1039. doi:10.1038/nature02778.1.
- Ducieux, M., Cuhna, A. S., Caramella, C., Hollebecque, A., Burtin, P., Goéré, D., ... Arnold, D. (2015). Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26(5), v56–v68. doi:10.1093/annonc/mdv295
- Duffy, M. J., Sturgeon, C., Lamerz, R., Haglund, C., Holubec, V. L., Klapdor, R., ... Heinemann, V. (2009). Tumor markers in pancreatic cancer: A European Group on Tumor Markers (EGTM) status report. *Annals of Oncology*, 21(3), 441–447. doi:10.1093/annonc/mdp332
- Duffy, M. J., van Dalen, A., Haglund, C., Hansson, L., Holinski-Feder, E., Klapdor, R., ... Topolcan, O. (2007). Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *European Journal of Cancer*, 43(9), 1348–1360. doi:10.1016/j.ejca.2007.03.021

- Duffy, Michael J. (2012). Tumor markers in clinical practice: A review focusing on common solid cancers. *Medical Principles and Practice*, 22(1), 4–11. doi:10.1159/000338393
- Elazezy, M., & Joosse, S. A. (2018a). Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 370–378. doi:10.1016/j.csbj.2018.10.002
- Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D., & Wang, K. (2011). Extracellular microRNA: a new resource of biomarkers. *Mutation Research*, 717(2), 85–90. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.03.004.Extracellular
- Felder, M., Kapur, A., Gonzalez-Bosquet, J., Horibata, S., Heintz, J., Albrecht, R., ... Patankar, M. S. (2014). MUC16 (CA125): Tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress. *Molecular Cancer*, 13(1), 1–15. doi:10.1186/1476-4598-13-129
- Fernandes, L., & Matos, D. (2002). Marcadores tumorais no câncer colorrectal. *Revista Do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 29(2), 106–111. doi:10.1590/S0100-69912002000200009
- Fiala, C., & Diamandis, E. P. (2018). Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection. *BMC Medicine*, 16(1), 1–10. doi:10.1186/s12916-018-1157-9
- Freidin, M. B., Freydina, D. V., Leung, M., Fernandez, A. M., Nicholson, A. G., & Lim, E. (2015). Circulating tumor DNA outperforms circulating tumor cells for KRAS mutation detection in thoracic malignancies. *Clinical Chemistry*, 61(10), 1299–1304. doi:10.1373/clinchem.2015.242453
- Galle, P. R., Forner, A., Llovet, J. M., Mazzaferro, V., Piscaglia, F., Raoul, J. L., ... Vilgrain, V. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 69(1), 182–236. doi:10.1016/j.jhep.2018.03.019
- Gao, Y., Wang, J., Zhou, Y., Sheng, S., Qian, S. Y., & Huo, X. (2018). Evaluation of Serum CEA , CA19-9 , CA72-4 , CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal Cancer. *Scientific Reports*, (October 2017), 1–9. doi:10.1038/s41598-018-21048-y
- Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11(5), 759–769. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x

- Global Cancer Observatory [Globocan]. (2019). Ovary. Retirado de <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/25-Ovary-fact-sheet.pdf>
- Guan, X. (2015). Cancer metastases: Challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 402–418. doi:10.1016/j.apsb.2015.07.005
- Gupta, V., Jafferji, I., Garza, M., Melnikova, V. O., Hasegawa, D. K., Pethig, R., & Davis, D. W. (2012). ApoStream™, a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. *Biomicrofluidics*, 6(2), 1–14. doi:10.1063/1.4731647
- Haber, D. A., & Velculescu, V. E. (2014). Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Cancer Discovery*, 4(6), 650–661. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-1014
- Halvaei, S., Daryani, S., Eslami-S, Z., Samadi, T., Jafarbeik-Iravani, N., Bakhshayesh, T. O., ... Esmaeili, R. (2018). Exosomes in Cancer Liquid Biopsy: A Focus on Breast Cancer. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 10, 131–141. doi:10.1016/j.omtn.2017.11.014
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Handy, B. (2009). The Clinical Utility of Tumor Markers. *Laboratory Medicine*, 40(2), 99–103. doi:10.1309/lmtrkskyw4gi6sbj
- Harouaka, R. A., Nisic, M., & Zheng, S. Y. (2013). Circulating Tumor Cell Enrichment Based on Physical Properties. *Journal of Laboratory Automation*, 18(6), 455–468. doi:10.1177/2211068213494391
- Hashad, D., Sorour, A., Ghazal, A., & Talaat, I. (2012). Free Circulating Tumor DNA as a Diagnostic Marker for Breast Cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 26(6), 467–472. doi:10.1002/jcla.21548
- Henriques, I., Horta, M., Cunha, T.M., Correia, P. (2015). Diagnóstico clínico e radiológico do cancro do ovário. In Vaz, F., & Pereira, D (Eds.), *100 perguntas chave no Cancro do Ovário* (2ª ed, pp.17-22). Lisboa, Portugal: Permanyer Portugal.
- Hofman, V. J., Ilie, M. I., Bonnetaud, C., Selva, E., Long, E., Molina, T., ... Hofman, P. M.

- (2011). Cytopathologic detection of circulating tumor cells using the isolation by size of epithelial tumor cell method: Promises and pitfalls. *American Journal of Clinical Pathology*, 135(1), 146–156. doi:10.1309/AJCP9X8OZBEIQVVI
- Ilie, M., Hofman, V., Long-Mira, E., Selva, E., Vignaud, J. M., Padovani, B., ... Hofman, P. (2014). “Sentinel” circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with Chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS ONE*, 9(10). doi:10.1371/journal.pone.0111597
- International Agency for Research on Cancer [IARC]. (2018). *Fact Sheet Cancer - Portugal*. Retirado de <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheets.pdf>
- Iorio, M. V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., ... Croce, C. M. (2007). MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Research*, 67(18), 8699–8707. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1936
- Khan, S., Jutzy, J. M. S., Valenzuela, M. M. A., Turay, D., Aspe, J. R., Ashok, A., ... Wall, N. R. (2012). Plasma-Derived Exosomal Survivin, a Plausible Biomarker for Early Detection of Prostate Cancer. *PLoS ONE*, 7(10). doi:10.1371/journal.pone.0046737
- Kim, J. S., Ryu, J. G., Kim, J. W., Hwang, E. C., Jung, S. Il, Kang, T. W., ... Park, K. (2015). Prostate-specific antigen fluctuation: What does it mean in diagnosis of prostate cancer? *International Brazilian Journal of Urology*, 41(2), 258–264. doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.02.11
- Kim, K., Shin, D. G., Park, M. K., Baik, S. H., Kim, T. H., Kim, S., & Lee, S. Y. (2014). Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: Diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Annals of Surgical Treatment and Research*, 86(3), 136–142. doi:10.4174/ast.2014.86.3.136
- Kwapisz, & Dorota. (2017). The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Annals of Translational Medicine*, 5(3). doi:10.21037/13580
- Latteri, S., Catania, V., Malaguarnera, G., Peri, A., Bertino, G., Frazzetto, G., ... Malaguarnera, M. (2018). Carcinoembryonic Antigen Serum Levels in Nonmelanoma Skin Cancer. *Biomedicine*, 6(1), 24. doi:10.3390/biomedicine6010024

- Ledermann, J. A., Raja, F. A., Fotopoulou, C., Gonzalez-Martin, A., Colombo, N., & Sessa, C. (2013). Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 24(SUPPL.6). doi:10.1093/annonc/mdt333
- Li, A., Zhang, T., Zheng, M., Liu, Y., & Chen, Z. (2017). Exosomal proteins as potential markers of tumor diagnosis. *Journal of Hematology and Oncology*, 10(1), 1–9. doi:10.1186/s13045-017-0542-8
- Li, Z., Ma, Y. Y., Wang, J., Zeng, X. F., Li, R., Kang, W., & Hao, X. K. (2016). Exosomal microRNA-141 is upregulated in the serum of prostate cancer patients. *Oncotargets and Therapy*, 9, 139–148. doi:10.2147/OTT.S95565
- Lingala, S. M., & Ghany, M. G. M. Mhs. (2016). The CTC-Chip: An Exciting New Tool to Detect Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients. *Journal of Thoracic Oncology*, 25(3), 289–313. doi:110.1016/j.bbi.2017.04.008
- Liu, S., Zhan, Y., Luo, J., Feng, J., Lu, J., Zheng, H., ... Fan, S. (2019). Roles of exosomes in the carcinogenesis and clinical therapy of non-small cell lung cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 111, 338–346. doi:10.1016/j.biopha.2018.12.088
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen, S. W., Wong, C. S. F., Wiegmans, A. P., Leimgruber, A., & Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1). doi:10.3402/jev.v4.27031
- Locker, G. Y., Hamilton, S., Harris, J., Jessup, J. M., Kemeny, N., Macdonald, J. S., ... Bast, R. C. (2006). ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(33), 5313–5327. doi:10.1200/JCO.2006.08.2644
- Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabrò, L., Spada, M., ... Fais, S. (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS ONE*, 4(4). doi:10.1371/journal.pone.0005219
- Lozar, T., Gersak, K., Cemazar, M., Kuhar, C. G., & Jesenko, T. (2019). The biology and clinical potential of circulating tumor cells. *Radiology and Oncology*, 53(2), 131–147. doi:10.2478/raon-2019-0024

- Luga, V., Zhang, L., Viloria-Petit, A. M., Ogunjimi, A. A., Inanlou, M. R., Chiu, E., ... Wrana, J. L. (2012). Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*, 151(7), 1542–1556. doi:10.1016/j.cell.2012.11.024
- Ma, Z., Williams, M., Cheng, Y. Y., & Leung, W. K. (2019). Roles of methylated DNA biomarkers in patients with colorectal cancer. *Disease Markers*, 2019. doi:10.1155/2019/2673543
- Maestranzi, S., Przemioslo, R., Mitchell, H., & Sherwood, R. A. (1998). The effect of benign and malignant liver disease on the tumour markers CA19-9 and CEA. *Annals of Clinical Biochemistry*, 35(1), 99–103. doi:10.1177/000456329803500113
- Manso, M. M., Kitamura, N. E., Souza, J. R. M. de, Gonçalves, J. E., Matos, L. L., Mader, A. M. A. A., ... Waisberg, J. (2011). Níveis séricos e imunoexpressão tecidual do marcador CA 19-9 no carcinoma colorretal e comprometimento linfonodal. *Arquivos Brasileiros de Ciências Da Saúde*, 36(1), 29–34. doi:10.7322/abcs.v36i1.72
- Manterola, L., Guruceaga, E., Pérez-Larraya, J. G., González-Huarriz, M., Jauregui, P., Tejada, S., ... Alonso, M. M. (2014). A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. *Neuro-Oncology*, 16(4), 520–527. doi:10.1093/neuonc/not218
- Marrugo-Ramírez, J., Mir, M., & Samitier, J. (2018). Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2877). doi:10.3390/ijms19102877
- Martignano, F., Gurioli, G., Salvi, S., Calistri, D., Costantini, M., Gunelli, R., ... Casadio, V. (2016). GSTP1 Methylation and Protein Expression in Prostate Cancer: Diagnostic Implications. *Disease Markers*, 2016. doi:10.1155/2016/4358292
- Mathai, R. A., Valli, R., Vidya, S., Reddy, B. S., Thomas, L., Udupa, K., ... Rao, M. (2019). Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors : Implications in the Precision Oncology. *Journal of Clinical Medicine*, 8(373), 1–17. doi:10.3390/jcm8030373

- Matin, F., Jeet, V., Moya, L., Selth, L. A., Chambers, S., Clements, J. A., ... Kerr, K. (2018). A Plasma Biomarker Panel of Four MicroRNAs for the Diagnosis of Prostate Cancer. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. doi:10.1038/s41598-018-24424-w
- McGlynn, K. A., Petrick, J. L., & London, W. T. (2015). Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Clinics in Liver Disease*, 19(2), 223–238. doi:10.1016/j.cld.2015.01.001
- Mehra, N., Zafeiriou, Z., Lorente, D., Terstappen, L. W. M. M., & De Bono, J. S. (2015). CCR 20th anniversary commentary: Circulating tumor cells in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(22), 4992–4995. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3129
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., ... Carus, G. (2015). Glypican1 identifies cancer exosomes and facilitates early detection of cancer. *Nature*, 523(7559), 177–182. doi:10.1038/nature14581
- Meng, Q., Shi, S., Liang, C., Liang, D., Xu, W., Ji, S., ... Yu, X. (2017). Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*, 10, 4591–4598. doi:10.2147/OTT.S145708
- Meng, X., Müller, V., Milde-Langosch, K., Trillsch, F., Pantel, K., & Schwarzenbach, H. (2016). Circulating cell-free miR-373, miR- 200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 924(13), 3–8. doi:10.1007/978-3-319-42044-8_1
- Micalizzi, D. S., Maheswaran, S., & Haber, D. A. (2017). A conduit to metastasis: Circulating tumor cell biology. *Genes and Development*, 31, 1827–1840. doi:10.1101/gad.305805.117
- Mitchell, M. J., & King, M. R. (2013). Computational and Experimental Models of Cancer Cell Response to Fluid Shear Stress. *Frontiers in Oncology*, 3, 1–11. doi:10.3389/fonc.2013.00044
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-agadjanyan, E. L., ... Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10513–10518. doi:10.1073/pnas.0804549105

- Mitchell, R. S., Casimir, D. J., & Lynch, L. J. (2010). what are Biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177. What
- Moon, P. G., Lee, J. E., Cho, Y. E., Lee, S. J., Chae, Y. S., Jung, J. H., ... Baek, M. C. (2016). Fibronectin on circulating extracellular vesicles as a liquid biopsy to detect breast cancer. *Oncotarget*, 7(26), 40189–40199. doi:10.18632/oncotarget.9561
- Moon, P. G., Lee, J. E., Cho, Y. E., Lee, S. J., Jung, J. H., Chae, Y. S., ... Baek, M. C. (2016). Identification of developmental endothelial locus-1 on circulating extracellular vesicles as a novel biomarker for early breast cancer detection. *Clinical Cancer Research*, 22(7), 1757–1766. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0654
- Mottet, N., Bergh, R. C. N. Van Den, Vice-chair, P. C., Santis, M. De, Gillessen, S., Govorov, A., ... Willemsse, P. M. (2018). EAU-ESUR-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. *European Association of Urology*. Retirado de <http://uroweb.org/guidelines/compilations-of-all-guidelines/>
- Nagpal, M., Singh, S., Singh, P., Chauhan, P., & Zaidi, M. (2017). Tumor markers: A diagnostic tool. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 7(1), 17. doi:10.4103/0975-5950.196135
- National Cancer Institute [NCI]. (2018). *Cancer facts and figures, special section: ovarian cancer*. Retirado de <http://surveillance.cancer.gov/devcan/>
- National Institutes of Health [NCI]. (2019). Tumor Markers. Retirado de <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet>
- Nieto, M. (2013). Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science*, 342(6159), 1234850. doi:10.1126/science.1234850
- Nogueira, L., Corradi, R., & Eastham, J. A. (2009). Prostatic specific antigen for Prostate Cancer detection. *International Brazilian Journal of Urology*, 35(5), 521–529. doi:10.1590/S1677-55382009000500003
- Nordgård, O., Tjensvoll, K., Gilje, B., & Søreide, K. (2018). Circulating tumour cells and DNA as liquid biopsies in gastrointestinal cancer. *British Journal of Surgery*, 105(2), 110–120. doi:10.1002/bjs.10782

- Ogata-Kawata, H., Izumiya, M., Kurioka, D., Honma, Y., Yamada, Y., Furuta, K., ... Tsuchiya, N. (2014). Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS ONE*, 9(4). doi:10.1371/journal.pone.0092921
- Olsson, E., Winter, C., George, A., Chen, Y., Howlin, J., Tang, M. E., ... Saal, L. H. (2015). Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Molecular Medicine*, 7(8), 1034–1047. doi:10.15252/emmm.201404913
- Palmirotta, R., Lovero, D., Cafforio, P., Felici, C., Mannavola, F., Pellè, E., ... Silvestris, F. (2018). Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 10, 1–24. doi:10.1177/1758835918794630
- Pantel, K., Brakenhoff, R. H., & Brandt, B. (2008). Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, 8(5), 329–340. doi:10.1038/nrc2375
- Perakis, S., & Speicher, M. R. (2017). Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Medicine*, 15(75). doi:10.1186/s12916-017-0840-6
- Peterson, M. F., Otoc, N., Sethi, J. K., Gupta, A., & Antes, T. J. (2015). Integrated systems for exosome investigation. *Methods*, 87, 31–45. doi:10.1016/j.ymeth.2015.04.015
- Phallen, J., Sausen, M., Adleff, V., Leal, A., Hruban, C., White, J., ... Velculescu, V. E. (2017). Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Science Translational Medicine*, 9(403). doi: 10.1126/scitranslmed.aan2415
- Porzycki, P., Ciszkowicz, E., Semik, M., & Tyrka, M. (2018). Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. *International Urology and Nephrology*, 50(9), 1619–1626. doi:10.1007/s11255-018-1938-2
- Potdar, P., & Lotey, N. (2015). Role of circulating tumor cells in future diagnosis and therapy of cancer. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. doi:10.4103/2394-4722.158803
- Prensner, J. R., Rubin, M. A., Wei, J. T., & Chinnaiyan, A. M. (2012). Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers. *Science Translational Medicine*, 4(127). doi:10.1126/scitranslmed.3003180

- Que, R., Ding, G., Chen, J., & Cao, L. (2013). Analysis of serum exosomal microRNAs and clinicopathologic features of patients with pancreatic adenocarcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*, 11, 1–9. doi:10.1186/1477-7819-11-219
- Ramani, V. C., Jeffrey, S. S., & Ferreira, M. M. (2016). Circulating tumor cell technologies. *Molecular Oncology*, 10(3), 374–394. doi:10.1016/j.molonc.2016.01.007
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. doi:10.1083/jcb.201211138
- Rehman, D. K. ur, Samiullah, P. D. M., Sharif, S., & Farhat, D. S. (2016). Hepatocellular Carcinoma; Correlation of Serum Alpha Fetoprotein and Tumor Size. *The Professional Medical Journal*, 23(02), 209–212. doi:10.17957/tpmj/16.3178
- Rhim, A. D., Mirek, E. T., Aiello, N. M., Maitra, A., Bailey, J. M., McAllister, F., ... Stanger, B. Z. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148(1–2), 349–361. doi:10.1016/j.cell.2011.11.025
- Ried, K., Eng, P., & Sali, A. (2017). Screening for Circulating Tumour Cells Allows Early Detection of Cancer and Monitoring of Treatment Effectiveness: An Observational Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(8), 2275–2285. doi:10.22034/APJCP.2017.18.8.2275
- Sawabata, N., Funaki, S., Hyakutake, T., Shintani, Y., Fujiwara, A., & Okumura, M. (2016). Perioperative circulating tumor cells in surgical patients with non-small cell lung cancer: does surgical manipulation dislodge cancer cells thus allowing them to pass into the peripheral blood? *Surgery Today*, 46(12), 1402–1409. doi:10.1007/s00595-016-1318-4
- Schölch, S., Niemietz, T., Iwata, N., García, S. A., Behrens, B., Voigt, A., ... Steinert, G. (2014). Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Research*, 74(6), 1694–1704. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1885
- Scholler, N., Urban, N., & Gene, C. a. (2010). CA125 in Ovarian Cancer. *Biomarkers in Medicine*, 1(4), 513–523. doi:10.2217/17520363.1.4.513.CA125

- Schwarzenbach, H., B Hoon, D. S., & Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11, 426–437. doi:10.1038/nrc3066
- Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 18(1–2), 43–73. doi: 10.1615/CritRevOncog.v18.i1-2.40
- Shao, X., He, Y., Ji, M., Chen, X., Qi, J., Shi, W., ... Ju, S. (2015). Quantitative analysis of cell-free DNA in ovarian cancer. *Oncology Letters*, 10(6), 3478–3482. doi:10.3892/ol.2015.3771
- Sharma, S. (2009). Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 30(1), 1–8. doi:10.4103/0971-5851.56328
- Shen, Z., Wu, A., & Chen, X. (2017). Current detection technologies for circulating tumor cells. *Chemical Society Reviews*. doi:10.1039/c6cs00803h
- Shin, S. H., Bode, A. M., & Dong, Z. (2017). Precision medicine: the foundation of future cancer therapeutics. *Nature Partners Journal*, 1(12). doi:10.1038/s41698-017-0016-z
- Silva, M. J. (2015). *Exossomas e o seu papel na comunicação intercelular* (Tese de Mestrado). Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Skog, J., Wurdington, T., Van Rijn, S., Meijer, D., Gainche, L., Sena-Esteves, M., ... Breakefield, X. O. (2017). Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12), 1470–1476. doi:10.1097/CCM.0b013e31823da96d.Hydrogen
- Skrypkina, I., Tsyba, L., Onyshchenko, K., Morderer, D., Kashparova, O., Nikolaienko, O., ... Rynditch, A. (2016). Concentration and Methylation of Cell-Free DNA from Blood Plasma as Diagnostic Markers of Renal Cancer. *Disease Markers*, 2016. doi:10.1155/2016/3693096
- Smit, M. A., & Peeper, D. S. (2010). Epithelial-mesenchymal transition and senescence: Two cancer-related processes are crossing paths. *Aging*, 2(10), 735–741. doi:10.18632/aging.100209

- Sohn, W., Kim, J., Kang, S. H., Yang, S. R., Cho, J. Y., Cho, H. C., ... Paik, Y. H. (2015). Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Experimental and Molecular Medicine*, 47(9). doi:10.1038/emm.2015.68
- Sollier, E., Go, D. E., Che, J., Gossett, D. R., O'Byrne, S., Weaver, W. M., ... Di Carlo, D. (2014). Size-selective collection of circulating tumor cells using Vortex technology. *Lab on a Chip*, 14(1), 63–77. doi:10.1039/c3lc50689d
- Sotaro, S., Saito, G., Okada, K., Tanaka, A., Suzuki, T., & Kamijo, A. (2016). Relation between Carcinoembryonic Antigen Levels in Colon Cancer Tissue and Serum Carcinoembryonic Antigen Levels at Initial Surgery and Recurrence. *Oncology*, 91(2), 85–89. doi:10.1159/000447062
- Stott, S. L., Richard, L., Nagrath, S., Min, Y., Miyamoto, D. T., Ulkus, L., ... Maheswaran, S. (2010). Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Science Translational Medicine*, 2(25). doi:10.1126/scitranslmed.3000403
- Sturgeon, C. M., Lai, L. C., & Duffy, M. J. (2009). Serum tumour markers: How to order and interpret them. *BMJ*, 339(7725), 852–858. doi:10.1136/bmj.b3527
- Sumrin, A., Moazzam, S., Khan, A. A., Ramzan, I., Batool, Z., Kaleem, S., ... Bilal, M. (2018). Exosomes as biomarker of cancer. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61. doi:10.1590/1678-4324-2018160730
- Tai, Y. L., Chen, K. C., Hsieh, J. T., & Shen, T. L. (2018). Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Science*, 109, 2364–2374. doi:10.1111/cas.13697
- Taylor, D. D., & Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 110(1), 13–21. doi:10.1016/j.ygyno.2008.04.033
- Taylor, D. D., & Shah, S. (2015). Methods of isolating extracellular vesicles impact downstream analyses of their cargoes. *Methods*. doi:10.1016/j.ymeth.2015.02.019
- Teng, D., Wu, K., Sun, Y., Zhang, M., Wang, D., Wu, J., ... Li, W. (2018). Significant increased CA199 levels in acute pancreatitis patients predicts the presence of pancreatic cancer. *Oncotarget*, 9(16), 12745–12753. doi:10.18632/oncotarget.23993

- Théry, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biology Reports*, 3(15). doi:10.3410/b3-15
- Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2(8), 569–579. doi:10.1038/nri855
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
- Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I., ... Gibbs, P. (2016). Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Science Translational Medicine*, 8(346). doi:10.1126/scitranslmed.aaf6219
- Torrano, V., Royo, F., Ctor Peinado, H., Loizaga-Iriarte, A., Unda, M., Falcó N-Perez, J. M., & Carracedo, A. (2016). Vesicle-MaNiA: extracellular vesicles in liquid biopsy and cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 29, 47–53. doi:10.1016/j.coph.2016.06.003
- Turkdogan, S., Forest, V.-I., Hier, M. P., Tamilia, M., Florea, A., & Payne, R. J. (2018). Carcinoembryonic antigen levels correlated with advanced disease in medullary thyroid cancer. *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery*, 47(1), 1–7. doi:10.1186/s40463-018-0303-x
- Tzartzeva, K., Obi, J., Rich, N. E., Parikh, N. D., Marrero, J. A., Yopp, A., ... Singal, A. G. (2018). Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. *Gastroenterology*, 154(6), 1706-1718.e1. doi:10.1053/j.gastro.2018.01.064
- Vona, G., Sabile, A., Louha, M., Sitruk, V., Romana, S., Schütze, K., ... Paterlini-Bréchet, P. (2011). Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells. *The American Journal of Pathology*, 156(1), 57–63. doi:10.1016/s0002-9440(10)64706-2
- Wang, C., Mu, Z., Chervoneva, I., Austin, L., Ye, Z., Rossi, G., ... Yang, H. (2017). Longitudinally collected CTCs and CTC-clusters and clinical outcomes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 161(1), 83–94. doi:10.1007/s10549-016-4026-2

- Wang, R. J., Zheng, Y. H., Wang, P., & Zhang, J. Z. (2015). Serum miR-125a-5p, miR-145 and miR-146a as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(1), 765–771.
- Wang, W., Luo, J., & Wang, S. (2018). Recent Progress in Isolation and Detection of Extracellular Vesicles for Cancer Diagnostics. *Advanced Healthcare Materials*. doi:10.1002/adhm.201800484
- Warton, K., Mahon, K. L., & Samimi, G. (2016). Methylated circulating tumor DNA in blood: Power in cancer prognosis and response. *Endocrine-Related Cancer*, 23(3), R157–R171. doi:10.1530/ERC-15-0369
- World Health Organization [WHO]. (2017). GUIDE TO CANCER - Guide to cancer early diagnosis. Genebra, Suíça: Autor.
- World Health Organization [WHO]. (2018). Cancer. Retirado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Wu, T., Giovannucci, E., Welge, J., Mallick, P., Tang, W. Y., & Ho, S. M. (2011). Measurement of GSTP1 promoter methylation in body fluids may complement PSA screening: A meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 105(1), 65–73. doi:10.1038/bjc.2011.143
- Yang, L., Lang, J. C., Balasubramanian, P., Jatana, K. R., Schuller, D., Agrawal, A., ... Chalmers, J. J. (2009). Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2), 521–534. doi:10.1002/bit.22066
- Yoon, K. A., Park, S., Sang, H. L., Jin, H. K., & Jin, S. L. (2009). Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls. *Journal of Molecular Diagnostics*, 11(3), 182–185. doi:10.2353/jmoldx.2009.080098
- Younesi, M. R. (2016). A Prospective Study of Serum Carcinoembryonic Antigen in Patients with Newly Diagnosed Colorectal Cancer and Healthy Individuals. *Annals of Clinical and Laboratory Research*, 4(2), 1–5. doi:10.21767/2386-5180.100098
- Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S., & Haber, D. A. (2011). Circulating tumor cells: Approaches to isolation and characterization. *Journal of Cell Biology*, 192(3), 373–382. doi:10.1083/jcb.201010021

- Zhang, S., Wang, Y. M., Sun, C. D., Lu, Y., & Wu, L. Q. (2008). Clinical value of serum CA19-9 levels in evaluating resectability of pancreatic carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 14(23), 3750–3753. doi:10.3748/wjg.14.3750
- Zhang, W., Xia, W., Lv, Z., Ni, C., Xin, Y., & Yang, L. (2017). Liquid Biopsy for Cancer: Circulating Tumor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes? *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(2), 755–768. doi:10.1159/000458736
- Zhao, Q., Deng, S., Wang, G., Liu, C., Meng, L., Qiao, S., ... Yu, Z. (2016). A direct quantification method for measuring plasma MicroRNAs identified potential biomarkers for detecting metastatic breast cancer. *Oncotarget*, 7(16), 21865–21874. doi:10.18632/oncotarget.7990
- Zhao, Z., Yang, Y., Zeng, Y., & He, M. (2016). A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis. *Lab on a Chip*, 16(3), 489–496. doi:10.1039/c5lc01117e