



O Papel da Biópsia Líquida no Cancro da Próstata Metastizado

The Role of Liquid Biopsy in Metastatic Prostate Cancer

Joana Glória¹, Diogo Nunes-Carneiro², Avelino Fraga²

Resumo

O cancro da próstata é a segunda neoplasia maligna mais frequente nos homens em todo o mundo. A elevada prevalência do cancro da próstata, bem como o seu curso clínico relativamente indolente e as opções terapêuticas emergentes, conduziram à necessidade de identificação de biomarcadores que possam auxiliar nas decisões clínicas e refletir a resposta aos tratamentos. Na era da medicina de precisão, para uma correta decisão terapêutica é mandatória a caracterização individual de cada tumor.

“Biópsia líquida” é um termo genérico aplicado ao estudo de biomarcadores atribuídos aos tumores que se encontram em circulação nos fluidos corporais de doentes com cancro. Baseia-se no princípio de que nestes doentes existem células tumorais e fragmentos com conteúdo genómico de células tumorais que entram em circulação, podendo ser detetados e usados como biomarcadores para aplicação clínica. A maioria destes biomarcadores correlaciona-se com a carga tumoral, sendo mais frequentemente identificados em indivíduos com doença disseminada.

Os biomarcadores mais estudados em doentes com cancro da próstata podem ser subdivididos em três grandes grupos: células tumorais circulantes (CTCs), material genético livre (como RNA e DNA - designadamente, microRNA (miRNA) e DNA livre circulante (cfDNA), incluindo o cfDNA total do doente e o DNA específico do tumor (cftDNA)) e micro vesículas extracelulares (onde há inclusão de material específico e único do tumor).

Este conhecimento pode permitir desenvolver potenciais aplicações clínicas desde o diagnóstico ao prognóstico, bem como o desenvolvimento de biomarcadores preditivos de resposta aos tratamentos e de monitorização da doença.

Palavras-chave: Biomarcadores Tumorais; Biópsia Líquida; Neoplasias da Prostata

Abstract

Prostate cancer is the second most common malignancy in men. The high prevalence of prostate cancer, as well as its relatively

indolent clinical course and the emerging therapeutic options, have led to the need to identify biomarkers that may aid in clinical decisions and may reflect response to treatments.

“Liquid biopsy” is a generic term applied to the study of biomarkers attributed to tumors that are circulating in the body fluids of cancer patients. It relies on the principle that in these patients there are tumor cells and fragments with genomic content of tumor that circulate and can be detected and used as biomarkers for clinical application. Most of these biomarkers correlate with tumor burden and are most often identified in individuals with metastatic disease.

The most studied biomarkers in prostate cancer patients can be subdivided into three major groups: circulating tumor cells, free genetic material (such as RNA and DNA - namely, microRNA and circulating free DNA) and extracellular vesicles (where there is inclusion of specific material and single tumor).

This knowledge may allow the development of potential clinical applications from diagnosis to prognosis, as well as the development of predictive biomarkers of response to treatment and disease monitoring.

Keywords: Biomarkers, Tumor; Liquid Biopsy; Prostatic Neoplasms

Em 2018 o cancro da próstata (CaP) foi o segundo cancro mais frequente e a quinta principal causa de morte por cancro no sexo masculino, com cerca de 1,3 milhões de novos casos e 359 000 mortes atribuíveis a esta neoplasia. O aumento da incidência de CaP tem sido fortemente influenciado pelo diagnóstico da doença assintomática, especialmente pelo uso do *prostate specific antigen* (PSA). Já as taxas de mortalidade têm diminuído, o que tem sido atribuído ao diagnóstico precoce e aos melhores tratamentos disponíveis.¹

Nos doentes com doença localizada as opções terapêuticas são curativas e a taxa de sobrevida aos 10 anos é superior a 90%. No entanto, alguns já apresentam doença metastática por altura do diagnóstico, e outros recidivam com doença metastática. O CaP metastático é primeiramente abordado com terapêutica de privação androgénica (ADT). No entanto, a progressão para resistência à castração é praticamente inexorável.² A evolução do CaP é indolente, mas com uma grande variabilidade inter-indivíduo. As alterações somáticas ocorrem ao longo da evolução

¹Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, Portugal

² Departamento de Urologia do Hospital de Santo António - Centro Hospitalar e Universitário do Porto, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, i3S/INEB - Universidade do Porto, Porto, Portugal



da doença e com a exposição às terapêuticas.³ Para documentar essa heterogeneidade no panorama genómico em evolução do CaP seriam necessárias biópsias seriadas, o que pode não ser exequível na prática clínica.⁴ Para além disso, uma amostra de tecido obtida num determinado local do tumor, num determinado momento não é capaz de representar todo o perfil molecular da doença. Neste sentido, o estudo de biomarcadores no sangue periférico representa um meio de obtenção de material tumoral para caracterizar as alterações presentes na doença.³

“Biópsia líquida” é o termo genérico aplicado ao estudo das células tumorais e dos ácidos nucleicos atribuídos aos tumores nos fluidos corporais de doentes com cancro. Baseia-se no princípio de que existem células tumorais e fragmentos com conteúdo genómico que entram em circulação e que nesse sentido podem ser detetados e usados como biomarcadores para aplicação clínica.⁴

A biópsia líquida, sendo obtida através de uma amostra sanguínea, é minimamente invasiva.³ Para além disso, o uso de biomarcadores permite uma avaliação longitudinal, com monitorização sequencial da resposta e da progressão, com potencial modificação da estratégia terapêutica baseada nas alterações observadas.⁵

Os biomarcadores mais estudados em doentes com CaP podem ser subdivididos em três grandes grupos: **células tumorais circulantes (CTCs)**, **material genético livre** (DNA livre circulante (cfDNA) e microRNA (miRNA)) e **vesículas extracelulares (EVs)**. O seu conhecimento permitirá desenvolver potenciais aplicações clínicas desde o diagnóstico, prognóstico, predição de resposta aos tratamentos e monitorização da doença.

Células Tumorais Circulantes

As CTCs foram identificadas pela primeira vez em 1869 por Ashworth,⁶ mas só recentemente é que o seu potencial tem vindo a ser explorado.

As CTCs são células do tumor primário ou de metástases que são libertadas na corrente sanguínea e que podem ser quantificadas e usadas para a análise genómica e fenotípica do tumor.³

Apesar de se considerar que são essenciais para o desenvolvimento da doença metastática, os mecanismos específicos que impulsionam e permitem a proliferação das CTCs permanecem pouco compreendidos. Embora já se tenha demonstrado que as CTCs têm potencial metastático, nem todas as CTCs estão destinadas a formar metástases, sendo necessários outros fatores adicionais para que tal ocorra, nomeadamente fatores associados aos locais de nidificação.⁷

Identificação, Isolamento e Enriquecimento:

Relativamente à identificação das CTCs, o primeiro grande desafio relaciona-se com o seu número reduzido relativamente aos restantes elementos celulares.⁸

Para o isolamento de CTCs, as abordagens típicas baseiam-se em características físicas ou na seleção de marcadores tipicamente expressos na sua superfície, nomeadamente a molécula de adesão das células epiteliais (EpCAM).⁴

Até à data, somente o sistema CellSearch[®] foi aprovado pela FDA (Food and Drugs Administration) para contagem de CTCs no CaP metastizado.⁹ Este sistema isola as CTCs de origem epitelial através de técnicas imunomagnéticas, que têm como alvo a EpCAM. Após a captura imunomagnética, por imunofluorescência obtêm-se as potenciais CTCs, que são: EpCAM+, CK+, DAPI+ e CD45- (células nucleadas desprovidas de CD45 e que expressam citoqueratinas).⁵

Contudo, tem-se verificado alguma heterogeneidade das CTCs, podendo daí advir potenciais limitações na identificação dependente somente da EpCAM.⁷ A definição das CTCs como sendo EpCAM+, CK+, DAPI+ e CD45- permite efetivamente identificar as células epiteliais, mas não inclui toda a população de células tumorais em circulação, como é o caso das CTCs que não expressam EpCAM (que sofreram uma transição epitélio-mesenchimatoza (TEM)), e células com diferenciação neuroendócrina, que expressam baixos níveis de marcadores epiteliais. Estas células associam-se a aumento da agressividade do tumor, capacidade de escape ao sistema imune e maior capacidade de nidificação à distância. Portanto, o sistema CellSearch[®] não oferece o crivo completo de todas as potenciais células tumorais em circulação.³

Sabe-se ainda que os tumores não libertam células totalmente intactas na corrente sanguínea, pelo menos até um estadio relativamente tardio da doença, pelo que em estadios mais precoces o número de CTCs em circulação é limitado.⁴

Aplicações Clínicas:

Enumeração de CTCs:

A deteção de CTCs no CaP é estadio-dependente e a sua contagem tem sido avaliada sobretudo nos estadios avançados, com valor prognóstico tanto no cancro da próstata metastizado sensível à castração (mCSPC) como no cancro da próstata resistente à castração (mCRPC), sendo expectável um número maior de CTCs no CaP metastizado, devido ao aumento do volume de doença em circulação.

Em relação ao mCSPC, a presença de CTCs na contagem basal associa-se a fatores de mau prognóstico, como PSA mais elevado, metástases ósseas, doença mais agressiva e tendência a pior *performance status*.¹⁰ A identificação de ≥ 5 CTCs na contagem inicial é o valor que se associa a pior resposta à ADT,¹¹ predizendo a duração e a magnitude da resposta. Portanto, a enumeração de CTCs pode catalogar os doentes com maior risco de progressão para mCRPC antes do início da ADT,¹² pelo que o seu uso na prática clínica poderá ser benéfico para identificar os doentes que potencialmente irão beneficiar de um tratamento mais precoce com quimioterapia.¹⁰⁻¹²



Já no mCRPC, a capacidade de prognóstico das CTCs está bem estabelecido e a sua contagem através do sistema Cell-Search[®] já foi aprovada pela FDA como marcador de prognóstico. A prevalência de CTCs nos estádios avançados da doença é grande, com identificação de CTCs em 95% das contagens iniciais. Considera-se que contagens iniciais desfavoráveis (=5 CTCs) associam-se a menor sobrevida global (11,5 vs 21,7 meses). Adicionalmente, os doentes com contagens iniciais desfavoráveis que se convertem em contagens favoráveis (<5 CTCs) após o início do tratamento, apresentam melhorias similares na sobrevida mediana, demonstrando a capacidade das CTCs em refletir a resposta à terapêutica nestes doentes, sendo a sua quantificação a forma mais precisa de prever a sobrevida global no mCRPC,⁹ com uma diminuição de 30% na contagem de CTCs após o tratamento a associar-se a melhor sobrevida global.¹³

A eficácia prognóstica das CTCs foi estudada no contexto de vários tratamentos sistémicos para o CaP avançado, demonstrando-se consistentemente uma associação com a sobrevida global.^{14,15}

Em suma, a quantificação de CTCs pode ser usada no *follow-up* dos doentes com CaP metastizado, com benefício prognóstico e preditivo, especialmente se for usada como uma variável contínua.^{5,9,15}

Identificação de Fenótipos e Caracterização das CTCs: Recetor dos Androgénios:

Embora existam muitos potenciais alvos para a caracterização das CTCs, a maioria dos estudos clínicos têm-se focado no recetor dos androgénios (AR), dado o seu papel central na terapêutica.⁷ A sinalização persistente do AR, apesar da ADT, é um dos principais determinantes da progressão da doença, nomeadamente da resistência à castração.

O perfil genómico do AR nas CTCs contém muitas das mesmas mutações que já haviam sido implicadas na progressão da doença.^{16,17} Dessa forma, as CTCs poderão ter utilidade para a monitorização seriada de mutações no AR recentemente adquiridas como mecanismo de resistência ao tratamento.

Para além do perfil genómico, o fenótipo de proteína do AR também foi investigado nas CTCs, sendo que doentes com mCRPC nos quais o AR está retido predominantemente no citoplasma das CTC apresentam uma resposta significativamente melhor à quimioterapia com docetaxel, pelo que a monitorização da localização do AR nas CTCs em doentes com mCRPC pode constituir um preditor de resposta aos taxanos.¹⁸

Foram identificadas isoformas do AR, que são variantes independentes de ligandos, que desempenham um papel importante na resistência às terapias com enzalutamida e abiraterona.¹⁹ A presença de qualquer variante do AR associa-se a pior prognóstico, sendo que qualquer alteração no AR influencia a resposta aos tratamentos.²⁰

A variante 7 do recetor dos androgénios (AR-V7) é uma variante do AR constitutivamente ativa, com uma região terminal truncada e sem o domínio de ligação ao ligando, permitindo que a sinalização do AR seja ativada independentemente. A sobre-expressão de um recetor constitutivamente ativo mas que não tem o domínio de ligação ao ligando (onde se ligam algumas drogas anti-androgénicas) confere resistência ao tratamento anti-androgénico.⁴ Os doentes com AR-V7 não detetável nas CTCs têm resposta tanto à enzalutamida como à abiraterona. Já os doentes AR-V7+ apresentam taxa de resposta do PSA, sobrevida livre de progressão e sobrevida global significativamente menores quando tratados com enzalutamida ou abiraterona¹⁹ (mas não com docetaxel ou cabazitaxel²¹). A presença de CTCs AR-V7+ associa-se a pior evolução clínica em comparação com a presença de CTCs AR-V7-, mas que ainda assim é pior do que não ter CTCs. Portanto, a expressão de CTCs baseada no AR-V7 constitui um potencial biomarcador preditivo de resistência à abiraterona e à enzalutamida, favorecendo a escolha dos taxanos como arma terapêutica.²²

O AR-V7 é um marcador dinâmico e a sua análise repetida pode ser capaz de capturar transições no seu *status*, como resultado dos diferentes tratamentos. As conversões de AR-V7 negativo para positivo ocorrem mais comumente em doentes sob terapêutica dirigida ao AR, enquanto reversões inversas parecem ocorrer apenas com taxanos.⁴

Fenótipo Epitélio-Mesenquimatoso e Neuroendócrino:

O fenótipo **mesenquimatoso** e o **fenótipo neuroendócrino** no CaP em **estadio avançado** associam-se a doença mais agressiva. O grau de heterogeneidade fenotípica é caracterizado por uma multiplicidade de subtipos de CTCs não canónicos, que por sua vez parecem ser mais frequentes no mCRPC.²³ A baixa heterogeneidade de CTCs associa-se a melhor sobrevida com terapia anti-androgénica de segunda linha, enquanto uma alta heterogeneidade associa-se a melhor sobrevida com taxanos, pelo que a descrição da heterogeneidade fenotípica das CTCs pode auxiliar na decisão terapêutica.²⁴

Gene de Fusão *TMPRSS2-ERG*:

Outra alteração associada ao CaP que foi identificada nas CTCs de doentes com doença avançada são os rearranjos do oncogene ERG. A expressão androgénica do oncogene ERG após a fusão com a protease transmembranar serina2 (*TMPRSS2*), ocorre em 30%-70% dos CaP terapêuticamente *naïve*.²⁵ Os doentes *TMPRSS2-ERG+* têm uma sobrevida livre de progressão radiográfica e uma resposta do PSA significativamente piores.²⁶

Apesar de não ser possível tirar uma conclusão clara sobre o valor da avaliação dos rearranjos ERG nas CTCs, o seu estudo é tido como promissor.



Perda do *PTEN*:

Outra alteração identificada relaciona-se com a perda do *gene PTEN*, que ocorre frequentemente no mCRPC e tem sido associada à sua progressão. Existe uma concordância entre o *status* do *PTEN* nos tecidos e nas CTCs, podendo desta forma assumir importância clínica, com a perda do *PTEN* nas CTCs a associar-se a pior prognóstico.²⁷ Assim como para os rearranjos ERG, o valor da perda do *PTEN* nas CTCs como potencial biomarcador ainda está pouco estudado, podendo vir a ter importância futura.

Atividade da Telomerase:

Os doentes com contagens elevadas de CTCs (=5), que associadamente têm uma atividade elevada da telomerase apresentam menor sobrevida global.^{28,29}

Concluindo, do ponto de vista clínico, a aplicação das CTCs como biomarcadores de prognóstico e de predição está limitada à capacidade de detetar essas mesmas células, que em muito depende do estadió do CaP, pelo que num futuro próximo é mais provável que o perfil molecular baseado em CTCs tenha impacto na monitorização de estádios avançados da doença.⁴

Material Genético Livre:

DNA Livre Circulante:

O cfDNA refere-se aos fragmentos de DNA que circulam livremente e que são libertados para a corrente sanguínea por todas as células - malignas e não malignas. O DNA livre específico do tumor em circulação, designado por cftDNA (*circulating free tumor DNA*) refere-se aos fragmentos de DNA que circulam livremente e que derivaram especificamente de células tumorais, contendo as mesmas alterações genéticas do local de origem. Os fragmentos de DNA específicos do tumor em circulação podem ter origem no tumor primário, em metástases ou nas CTCs.³ O isolamento das pequenas frações de cftDNA no total de cfDNA exige que se identifiquem alterações genéticas que permitam afirmar a sua origem tumoral.⁷ Uma vez detetado, o cftDNA reflete o perfil genético do tumor “contemporâneo”, já que os ácidos nucleicos livres em circulação têm uma semi-vida muito curta.²

No contexto do CaP existem evidências que a análise do cfDNA tem potencial para futuras aplicações clínicas, constituindo uma ferramenta para avaliação não invasiva do tumor, que não exige equipamento específico (ao contrário das CTCs).³⁰ As aplicações do cfDNA no CaP estão descritas na Tabela 1.

Aplicações Clínicas:

Apesar de quantidades maiores de cfDNA não serem literalmente diagnósticas, os doentes com CaP têm um nível mais elevado em circulação (437 ng/mL), quando comparados com indivíduos saudáveis (99 ng/mL), cujo cfDNA deriva sobretudo de hematopoiése.³⁰⁻⁴⁹

A quantificação do cftDNA, especialmente no contexto da sua evolução ao longo do tempo, consiste num meio para avaliar a carga tumoral e a resposta à terapêutica. Os doentes com CaP metastizado que apresentem uma maior fração de cftDNA têm maior carga de doença e pior prognóstico,³⁷ sendo que doentes com menores níveis de cftDNA respondem melhor à terapêutica.^{37,42}

A quantidade absoluta de cftDNA e sua proporção relativamente ao cfDNA total pode ser usada como biomarcador, com a deteção de quantidades crescentes de cftDNA a correlacionar-se com outros marcadores globais de carga tumoral (como a FA e LDH) e com evolução clínica significativamente pior.³⁷

Nos doentes com mCRPC, a concentração elevada de cfDNA pode ser usada como um preditor independente de sobrevida global, associando-se a má resposta do PSA,³⁹ com relação positiva entre os níveis de cfDNA e a progressão imagiológica.³⁸

Existe concordância entre as alterações do DNA no cftDNA e no tecido tumoral. O cftDNA obtido por biópsia líquida contém todas as alterações do DNA, em frequências alélicas semelhantes, encontradas no sequenciamento genómico completo das lesões metastáticas biopsadas, incluindo alterações como a mutação e amplificação do gene *AR*, mutações nos genes *SPOP*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *RB1*, *APC*, *CDKN1B* e *PIK3R1*.⁵⁰ Para além destes também os genes *BRCA1*,^{51,52} *ATM*, *CHEK2*, *RAD51D*, *PALB2*,⁵² *TMPRSS2-ERG*,^{40,53} *RYBP*, *SHQ1*,⁴⁰ *MYC*,^{40,54} *BRAF*, *TP53*, *NF1*, *EGFR*, *CTNNB1*, *ARID1A*⁵⁴ estão implicados na patogénese do CaP metastizado, com potencial significado clínico. As frequências destas mutações estão apresentadas na Tabela 2.

Dos doentes, 94% com mCRPC apresentam =1 alterações no cftDNA, sendo que a acumulação de alterações, as amplificações dos genes *MYC* e *BRAF* e as alterações no gene *AR* se associam a pior sobrevida global.⁵⁴

A identificação da amplificação e mutações do gene *AR* têm sido especialmente estudadas. No CaP metastático, um maior número de cópias do gene *AR* ou a presença de mutações pontuais (nomeadamente *T878A* ou *L702H*) associa-se a menor sobrevida livre de progressão e menor sobrevida global.^{37,45-47} Existe também uma associação temporal entre a progressão clínica e a emergência de mutações no gene *AR*.⁴⁶ Os doentes sob abiraterona ou enzalutamida com ganho do número de cópias ou com mutações pontuais específicas do gene *AR* têm um menor declínio dos níveis de PSA, assim como menor sobrevida livre de progressão e sobrevida global, comparativamente aos doentes com *AR* normal,^{37,44} e comparativamente ao tratamento com taxanos.⁴⁷ A avaliação do *status* do gene *AR* antes do início do tratamento pode vir a ser útil na previsão da resposta à terapia a instituir. A amplificação do exão 8 do gene *AR* no cftDNA está especificamente associada à resistência à enzalutamida, já que o exão 8 codifica uma parte de um domínio de ligação ao ligando que é o alvo desta terapêutica.⁴³



Tabela 1. Aplicações do cfDNA no diagnóstico, prognóstico e como preditor de recorrência e resposta ao tratamento no cancro da próstata

Aplicação clínica	Análise do cfDNA	
Diagnóstico	Hipermetilação dos genes <i>RASSF1</i> , <i>GSTP1</i> e <i>RARB2</i> nos doentes com CaP (<i>versus</i> indivíduos saudáveis) ³²	cfDNA como biomarcador de diagnóstico no CaP
	Um painel de variações cromossómicas detetado permite discriminar doentes com CaP de indivíduos saudáveis, homens com HBP e prostatite ³³	
	Níveis mais elevados de cfDNA plasmáticos associados ao CaP (<i>versus</i> HBP) ³⁴	
Preditor de recorrência	Níveis de cfDNA plasmáticos mais elevados em doentes com CaP (<i>versus</i> indivíduos saudáveis) ³⁵	Uma metilação aberrante do cftDNA constitui um preditor precoce de recorrência da doença
	Hipermetilação dos genes <i>SRD5A2</i> e <i>CYP11A1</i> nos doentes com CaP com recorrência bioquímica após prostatectomia radical ³⁶	
Prognóstico	Concentrações crescentes de cftDNA nos doentes com mCRPC correlacionam-se com marcadores globais de carga tumoral (FA e LDH), evolução clínica significativamente pior ³⁷ e progressão imagiológica, ³⁸ constituindo um preditor independente de sobrevida global ³⁹	O aparecimento de amplificações focais de novo pode ser usado como um biomarcador prognóstico no follow-up dos doentes, especialmente o ganho de cópias do gene AR
	O surgimento de novas amplificações focais (gene <i>AR</i> e gene <i>MYC</i>) ocorre em 40% dos doentes com progressão metastática da doença ⁴⁰	
Preditor de resposta ao tratamento	Um elevado número de cópias do <i>locus AR</i> detetado no plasma de doentes com mCRPC, mas não em doentes com mCSPC ⁴¹	Mutações e ganho do número de cópias do gene AR associa-se consistentemente a resistência à abiraterona e à enzalutamida
	Doentes com mCRPC com menores níveis de cftDNA têm melhor resposta à terapêutica com abiraterona ³⁷ e enzalutamida ⁴² (<i>versus</i> doentes com níveis mais elevados de cftDNA)	
	Mutações no gene <i>AR</i> associadas a resistência à enzalutamida nos doentes com mCRPC ^{43,44}	
	Ganhos no número de cópias do gene <i>CYP17A1</i> e do gene <i>AR</i> associados aos doentes com mCRPC sob abiraterona com sobrevida livre de progressão e sobrevida global mais curtas (<i>versus</i> doentes com mCRPC sem ganho lactato desidrogena no número de cópias), sugerindo que o ganho no número de cópias do gene <i>AR</i> ou do gene <i>CYP17A1</i> pode ser usado como biomarcador preditivo de resistência à abiraterona ⁴⁵	
	Ganho no número de cópias do gene <i>AR</i> associa-se a resistência à abiraterona nos doentes com mCRPC ⁴⁶	
Preditor de resposta ao tratamento	Amplificações e mutações pontuais específicas do gene <i>AR</i> em doentes com mCRPC faz prever um pior desfecho se tratados com abiraterona ou com enzalutamida (<i>versus</i> tratamento com taxanos) ⁴⁷	
	Diminuição dos níveis plasmáticos de GSTP1 metilado após quimioterapia, sugerindo que a metilação do GSTP1 é um potencial marcador de predição de resposta à quimioterapia ⁴⁸	

CaP - cancro da próstata, HBP - hiperplasia benigna da próstata, AR - recetor dos androgénios, mCRPC - cancro da próstata metastizado resistente à castração, mCSPC - cancro da próstata metastizado sensível à castração, FA - fosfatase alcalina, LDH [adaptado de Di Meo 2017]⁸¹

Resumidamente, as amplificações e mutações do gene AR correlacionam-se com pior prognóstico. O aparecimento, num dado momento, de novas alterações genómicas pode indicar progressão da doença, ao mesmo tempo que aponta para novos mecanismos de resistência que podem ser direcionados terapêuticamente. Portanto, no contexto da biópsia líquida, o cftDNA

será especialmente útil para a análise seriada ao longo do curso da doença.

Mutações noutros Genes:

Existem estudos que se têm focado na linha germinativa e nos defeitos somáticos adquiridos na reparação do DNA envolvendo



Tabela 2. Frequência de genes alterados nos doentes com cancro da próstata metastizado

Gene	Frequência
<i>AR</i>	20% - 64,7% (amplificações) ^{50,53,54}
(amplificações e mutações pontuais - <i>T8T8A</i> , <i>L702H</i>)	22% (mutações) ⁵⁴ 48% (mutações e/ou amplificações) na contagem basal de doentes com mCRPC ⁴² 60% (mutações e/ou amplificações) na progressão de doentes com mCRPC ⁴²
<i>SPOP</i>	8,8% ⁵⁰
<i>BRCA 2</i>	5% - 14% ^{51,52,54}
<i>ATM</i>	1,6 % - 10% ^{51,52}
<i>CHEK2</i>	1,9% - 6% ^{51,52}
<i>BRCA1</i>	0,9% - 6% ^{51,52,54}
<i>RAD51D</i>	0,4% ⁵²
<i>PALB2</i>	0,4% ⁵²
<i>PTEN</i>	20% ⁵³
<i>PT53</i>	36% ⁵⁴
<i>APC</i>	10% ⁵⁴
<i>NF1</i>	9% ⁵⁴
<i>EGFR</i>	6% ⁵⁴
<i>CTNNB1</i>	6% ⁵⁴
<i>ARID1A</i>	6% ⁵⁴
<i>PIK3CA</i>	5% ⁵⁴
<i>MYC</i>	20% ⁵⁴
<i>BRAF</i>	18% ⁵⁴

genes como o *BRCA1* e *2*, *ATM* e o *PALB2*.^{52,55} A presença de mutações germinativas nesses genes foi associada a um risco significativamente aumentado de CaP metastático, doença mais agressiva e pior resposta à terapêutica dirigida ao *AR*,⁵² sendo que mutações somáticas adquiridas também são observadas em frequências muito mais altas nos tumores que progredem para mCRPC.^{55,56}

Os doentes com mCRPC portadores de mutações germinativas *BRCA2* apresentam progressão significativamente pior e menor tempo de sobrevida livre de progressão quando tratados com abiraterona ou enzalutamida.⁵⁷ Por outro lado, os doentes com alterações nos genes de reparação do DNA parecem responder à quimioterapia ou ao inibidor da PARP (obaparib), especialmente no caso de mutações *BRCA*,^{51,58} estando descrito que uma redução = 50% do cfDNA se associa a melhor sobrevida global e a sobrevida livre de progressão radiográfica nas 8 semanas após o tratamento com olaparib.⁵⁹

Estes achados revelam a necessidade de se estabelecerem estratégias de tratamento guiadas por biomarcadores no CaP avançado, sugerindo que a análise do cfDNA pode ser usada para auxiliar na decisão mais precoce de se optar pela quimioterapia ou pela inibição da PARP.

microRNA:

Lee, em 1993, identificou o primeiro microRNA: o “lin-4”.⁶⁰ Atualmente já existem 38589 microRNAs registados na miRBase.⁶¹ Os miRNAs são pequenos segmentos de 18-22 nucleotídeos não codificantes. Um único miRNA é capaz de regular centenas de genes diferentes. A modificação na expressão de um miRNA pode afetar um conjunto de processos biológicos, podendo constituir o gatilho para a tumorigénese e/ou afetar a progressão da doença.³⁰

No caso do cancro, a importância dos miRNAs relaciona-se com o facto destes se localizarem em regiões genómicas “frágeis” muitas vezes alteradas nos tumores.⁶² A expressão de miRNAs forma uma espécie de assinatura, composta por um conjunto de miRNAs sobreexpressos/subexpressos, capaz de identificar o cancro em causa.⁶³

miRNAs podem ser detetados a circular livremente no sangue periférico de doentes com CaP e, nesse sentido são vistos como potenciais biomarcadores, com especial interesse no CaP avançado.

O papel dos miRNAs na oncogénese relaciona-se com o facto destes serem capazes de inibir genes supressores tumorais (por exemplo o *PTEN*) ou por outro lado estimular oncogenes (por exemplo o *MYC* e o *RAS*)⁶⁴⁻⁶⁸

Existem miRNAs que se parecem correlacionar com o CaP, com o prognóstico dos doentes com mCRPC e com a quimiorresistência.^{64,69-72} A sua expressão está descrita nas Tabela 3 e Tabela 4.

Aplicações Clínicas:

A identificação de alterações na regulação de certos miRNAs permite diferenciar indivíduos com CaP de indivíduos saudáveis (ou com doença benigna).^{64,69,74-77,79} Por exemplo, a expressão do miR-15 e do miR-16 séricos está diminuída ou ausente no caso do CaP (*versus* indivíduos saudáveis, doentes com prostatite crónica ou hiperplasia benigna da próstata (HBP)).⁶⁴

No caso do miR-141, a sua sobre-expressão já foi amplamente associada ao CaP: está sobre-expresso nos doentes com CaP (*versus* doentes saudáveis ou com doença benigna),^{69,74-81} com sobre-expressão mais marcada no mCRPC (*versus* CaP localizado),⁸¹ e níveis mais elevados a correlacionarem-se com doença metastática mais extensa.⁸⁰

Estes resultados sugerem que alterações nos níveis de miRNAs plasmáticos permitem estratificar a agressividade do tumor.⁷⁰ Por exemplo, está descrito que um painel que demonstre

**Tabela 3:** miRNAs identificados com potencial utilidade como biomarcadores no cancro da próstata

miRNA	Expressão	Biomarcador	Efeito
let-7a	↓	Diagnóstico Prognóstico	Expressão diminuída no CaP (<i>versus</i> HBP); Expressão diminuída confere maior risco de progressão ⁷⁴
miR-9*	↑	Prognóstico	Sobre-expressão nos doentes com CaP metastático ⁷⁵
Família miR-15a/miR-16-1	↓/∅	Diagnóstico Prognóstico	Expressão diminuída nos doentes com CaP (<i>versus</i> controlos saudáveis, doentes com prostatite crónica e HBP); Níveis muito baixos ou inexistentes associados a estadios metastáticos ⁶⁴
miR-20a	↓	Preditivo Prognóstico	Expressão diminuída (ou inalterada) após quimioterapia com docetaxel associada a pior sobrevida global ⁷²
miR-21	↑	Prognóstico	Sobre-expressão nos doentes com CaP (<i>versus</i> indivíduos saudáveis) ⁷⁶
	↑	Prognóstico	Sobre-expressão em doentes com CaP em estadio mais avançado ⁷⁰
	↑	Diagnóstico Prognóstico	Sobre-expressão em doentes com CaP (<i>versus</i> indivíduos saudáveis); Níveis mais elevados a associados a doença metastizada (<i>versus</i> doença localizada) ⁶⁹
	↑	Preditivo	Sobre-expressão nos doentes com mCRPC; Níveis mais elevados associados a resistência ao docetaxel ⁷¹
miR-24	↓	Prognóstico	Diminuído no CaP (indivíduos saudáveis>baixo risco>risco intermédio>alto risco) ⁷⁷
miR-93	↑	Diagnóstico	Sobre-expressão no CaP (<i>versus</i> indivíduos saudáveis)
		Prognóstico	Níveis progressivamente mais elevados nos tumores mais agressivos ⁷⁷
miR-106a	↑	Prognóstico	Sobre-expressão no CaP agressivo (<i>versus</i> CaP indolente) ⁷⁸
	↑	Prognóstico	Aumentado no CaP:(alto risco >risco intermédio>baixo risco>indivíduos saudáveis) ⁷⁷
	↑	Diagnóstico	Constitui uma assinatura de miRNAs que permite distinguir CaP e HBP em doentes com PSA elevado ⁷⁹
miR-106b	↑	Diagnóstico	Sobre-expressão nos doentes com CaP (<i>versus</i> indivíduos saudáveis) ⁷⁶
miR-130b	↓	Diagnóstico	Constitui uma assinatura de miRNAs que permite distinguir CaP e HBP em doentes com PSA elevado ⁷⁹
miR-135a*	↓	Prognóstico	Expressão diminuída no CaP agressivo (<i>versus</i> CaP indolente) ⁷⁸
miR-141	↑	Diagnóstico	Sobre-expressão no CaP (<i>versus</i> HBP) ⁷⁴
	↑	Prognóstico	Sobre-expressão nos doentes com CaP metastizado ⁷⁵
	↑	Prognóstico	Sobre-expressão nos doentes com metástases ósseas, com níveis mais elevados a correlacionarem-se com a presença de mais de lesões ⁸⁰
	↑	Prognóstico	Sobre-expressão no mCRPC (<i>versus</i> CaP localizado de baixo risco) ⁸¹
	↑	Prognóstico	Sobre-expressão em doentes com CaP (<i>versus</i> indivíduos saudáveis), com níveis mais elevados a associarem-se a doença metastizada (vs.doença localizada) ⁶⁹
	↑	Diagnóstico	Sobre-expressão nos doentes com CaP (<i>versus</i> indivíduos saudáveis) ⁷⁶



miRNA	Expressão	Biomarcador	Efeito
miR-146a	↓	Preditivo Prognóstico	Sub-expressão previamente à quimioterapia com docetaxel associada a não resposta do PSA dos doentes com mCRPC ⁷²
Família miR-200	↑	Preditivo Prognóstico	Sobre-expressão previamente à quimioterapia com docetaxel associa-se a resistência à terapêutica e menor sobrevida nos doentes com mCRPC ⁷²
miR-221	↑	Diagnóstico Prognóstico	Sobre-expressão em doentes com CaP (<i>versus</i> indivíduos saudáveis), com níveis mais elevados a associarem-se a doença metastizada (<i>versus</i> doença localizada) ⁶⁹
miR-222	↓ ↑	Preditivo	Prognóstico Dependendo do contexto, o miR-222 pode ter funções oncogénicas ou supressoras tumorais. Daí que tanto a sua sub-expressão ou sobre-expressão possam ter resultados adversos: Sub-expressão previamente à quimioterapia com docetaxel associa-se a fraca resposta do PSA nos doentes com mCRPC ; Sobre-expressão resulta em proliferação celular ⁷²
miR-223	↓ ↑	Prognóstico Diagnóstico	Dependendo do contexto, o miR-223 pode ter funções oncogénicas ou supressoras tumorais. Daí que tanto a sua sub-expressão ou sobre-expressão possam ter resultados adversos: Sub-expresso no CaP (<i>versus</i> indivíduos saudáveis); Sobre-expresso nos tumores de alto risco <i>versus</i> baixo risco ⁷⁷
	↓	Diagnóstico	Faz parte de uma assinatura de miRNAs que permite distinguir CaP e HBP em doentes com PSA elevado ⁷⁹
miR-301b	↑	Preditivo Prognóstico	Sobre-expressão previamente à quimioterapia com docetaxel associa-se a fraca resposta do PSA nos doentes com mCRPC⁷²
miR-375	↑	Prognóstico	Sobre-expressão nos doentes com CaP metastático⁷⁵
	↑	Prognóstico	Sobre-expressão nos tumores de alto risco e no mCRPC (<i>versus</i> tumores de baixo risco) ⁸¹
	↑	Diagnóstico	Sobre-expressão nos doentes com CaP (<i>versus</i> indivíduos saudáveis) ⁷⁶
miR-378	↑	Prognóstico	Sobre-expressão nos tumores de alto risco e no mCRPC (<i>versus</i> tumores localizados de baixo risco) ⁸¹
miR-409-3p	↓	Prognóstico	Expressão diminuída no mCRPC (<i>versus</i> CaP localizado de baixo risco) ⁸¹
miR-429	↑	Prognóstico Preditivo	Sobre-expressão previamente à quimioterapia com docetaxel associa-se a resistência à terapêutica e menor sobrevida nos doentes com mCRPC⁷²
miR-433	↑	Prognóstico	Sobre-expressão no CaP agressivo (<i>versus</i> CaP indolente) ⁷⁸
miR-451	↑	Diagnóstico Prognóstico	Sobre-expressão nos tumores de alto risco (<i>versus</i> indivíduos saudáveis) ⁷⁷
miR-561a-3p	↑	Prognóstico	Sobre-expressão nos doentes com CaP metastático⁷⁵

Realce dos miRNAs com papel prognóstico e preditivo no cancro da próstata metastizado

CaP - cancro da próstata; HBP - hiperplasia benigna da próstata; mCRPC - cancro da próstata metastizado resistente à castração;
PSA - antígeno específico da próstata

Adaptado de Hoey (2019)⁹⁹

**Tabela 4.** Assinaturas de miRNAs e potencial utilidade do cancro da próstata

Assinaturas de miRNAs		Resultados
miR-24 + miR-223 miR-375	↓ ↑	Distinção entre CaP indolente versus CaP agressivo em doentes em vigilância ativa; Os autores sugerem usar esta assinatura de 3 mi-RNAs + PSA para detetar doença agressiva ⁸²
miR-106a + miR-433 miR-135a* + miR-200c + miR-605	↑ ↓	Distinção entre CaP agressivo de muito alto risco (versus CaP indolente) ⁷⁸
miR-24 + miR-223 miR-93 + miR-106a + miR-451	↓ ↑	Distinção entre doentes com CaP versus Individuos saudáveis ⁷⁷
Rácios: miR-106a/miR-130b miR-106a/miR-223	↑ [rácios mais elevados associam-se a CaP]	Distinção entre doentes com CaP e doentes com HBP (com PSA elevado) ⁷⁸
miR-20a, miR-21 e miR-145	↑	Distinção entre doentes com risco intermédio versus baixo risco (<i>score</i> D'Amico) ⁷⁰
miR-20a, miR-21, miR-145 e miR-221	↑	Distinção entre doentes com alto risco versus baixo risco (<i>score</i> D'Amico) ⁷⁹
miR-200a + miR-200b + miR-429 (família miR-200)	↑	A sobreexpressão da família miR-200 detetada antes de se instituir o tratamento com docetaxel é preditiva de pior sobrevida global nos doentes mCRPC, com resistência ao tratamento com docetaxel ⁷²
miR-375 + miR-378* + miR-141 miR-409-3p	↑ ↓	Distinção entre mCRPC (versus CaP localizado de baixo risco) ⁸¹
miR-96 + miR-183 miR-145 + miR-221	↑ ↓	Distinção entre CaP e controlos saudáveis; Maior agressividade tumoral; Maior risco de metastização; Pior sobrevida global ⁸³
miR-15 + miR-16 miR-21	↓ ↑	Predição de um pior prognóstico no CaP ⁶⁶
miR-141, miR-21, e miR-375	↑	Distinção entre doentes com CaP e saudáveis ⁷⁶

Realce dos painéis de miRNAs com papel prognóstico e preditivo no cancro da próstata metastizado

CaP - cancro da próstata; HBP - hiperplasia benigna da próstata; mCRPC - cancro da próstata metastizado resistente à castração;
PSA - antígeno específico da próstata

a perda do miR-15 e do miR-16 e a sobreexpressão do miR-21 representa uma assinatura promissora no que concerne à predição de um pior prognóstico no CaP,⁶⁶ já que miR-15 e miR-16 são microRNAs supressores tumorais, cuja expressão está diminuída nos doentes com CaP, com níveis muito baixos ou inexistentes associados a estadios metastáticos.⁶⁴ Já o miR-21 é um onco-miRNA, que promove a proliferação celular, a invasão e

a diminuição da apoptose, cuja sobre-expressão se associa a progressão da doença.⁶⁹

Existem alguns microRNAs estudados no contexto da resposta ao tratamento em doentes com mCRPC. Os doentes que não respondem ao docetaxel apresentam níveis de microRNAs da família miR-200 mais elevados antes do início do tratamento com docetaxel (ou níveis diminuídos/inalterados de miR-20a



após o tratamento), pelo que a sua deteção parece ser preditiva de não resposta ao docetaxel e consequentemente menor sobrevida.⁷²

O miR-21 (onco-miRNA) também está sobre-expresso nos doentes com mCRPC, sendo que a expressão de níveis mais elevados se associa a quimiorresistência.⁷¹

A identificação de miRNAs permitirá, no futuro, criar painéis com potencial diagnóstico, prognóstico e preditivo de resposta às terapêuticas, auxiliando na tomada de decisão em oncologia prostática.

Vesículas extracelulares:

As EVs são uma classe heterogénea de partículas com um tamanho que varia de 50 nm-10 µm e que são liberadas por qualquer célula.⁸⁴ O seu conteúdo é muito específico, transportando RNA, proteínas e metabolitos e sua função é partilhar essa informação molecular entre células, podendo dessa forma modificar a atividade da célula recetora.⁸⁵

No caso dos doentes com cancro, há um aumento do número de EVs circulantes, cujo conteúdo representa o local de origem, pelo que a sua análise pode fornecer informação acerca do tumor, constituindo uma fonte de biomarcadores.⁸⁴

As vesículas extracelulares são subdivididas em exossomas, ectossomas e oncosomas. Os exossomas foram descritos pela primeira vez por Pan e Johnstone em 1983⁸⁶ e são um subtipo de EV com 50-100 nm de diâmetro que podem ter origem em células benignas e malignas. Os ectossomas e os oncosomas (1-10 µm) originam-se preferencialmente de células malignas.^{84,87}

Os exossomas estão diretamente envolvidos na carcinogénese e na metastização do CaP, ao transportarem proteínas e material genético que reduzem a capacidade apoptótica, aumentam a proliferação celular e induzem a migração celular. Para além disso, são capazes de afetar a fusão e diferenciação osteoclástica, favorecendo a formação de nichos metastáticos.⁸⁸

Alguns miRNAs exossomais estão descritos como estando implicados no desenvolvimento e progressão do CaP.^{89,90} Níveis mais elevados de miR-1290 e miR-375 em homens com mCRPC associam-se de forma significativa a pior sobrevida global, independentemente da terapia.⁹⁰ A sobre-expressão do miR-1246 exossomal também se correlaciona com o grau patológico, a presença de metástases, pior prognóstico e maior agressividade do tumor.⁹¹

As EVs também parecem ter um papel no desenvolvimento de resistência às terapêuticas em doentes com CaP, podendo dessa forma ser usadas como potenciais biomarcadores de resistência. Por exemplo, a monitoração quantitativa dos exossomas pode auxiliar na identificação de quimiorresistência, uma vez que se objetivam alterações na quantidade de exossomas após resistência à quimioterapia.⁹²

A evolução contínua na deteção e análise diferencial das EVs permitirá caracterizar melhor o seu papel no CaP, com as devidas implicações na sua potencial aplicação clínica.

Conclusão:

A biópsia líquida no CaP é hoje uma realidade na prática clínica, com a quantificação de CTCs aprovada pela FDA para a monitorização do mCRPC. Com certeza que esta aprovação abrirá portas para futuras aprovações na inclusão de mais biomarcadores.

O papel dos biomarcadores é mais efetivo na doença disseminada, o que se justifica pela sua maior quantidade em circulação. Assim, a biópsia líquida constitui uma mais-valia para o *follow-up* destes doentes, especialmente se usada como variável contínua. O resultado da análise destes biomarcadores fornece informação sobre o prognóstico dos doentes com cancro metastizado, assim como prediz a resposta à terapêutica.

O futuro assentará na perspetiva de se combinarem vários algoritmos diferentes e complementares na biópsia líquida, criando um painel de biomarcadores que funcionem como uma ferramenta com elevada acuidade prognóstica e preditiva, incluindo numa só análise a deteção e caracterização de CTCs, cftDNA, miRNAs e/ou exossomas, que poderá ser usada na monitorização minimamente invasiva dos doentes.

Apesar destas promessas, a biópsia líquida como ferramenta de diagnóstico, prognóstico, bem como o seu papel na predição de resposta aos tratamentos necessita ainda de ser validada em mais e maiores ensaios clínicos, sendo a próxima geração de estudos a chave para estabelecer definitivamente a aplicabilidade clínica destes biomarcadores, respondendo à questão central: *as decisões terapêuticas baseadas nos resultados da biópsia líquida representarão uma melhoria significativa no curso da doença, com benefício para o doente?* ●

Responsabilidades Éticas

Conflitos de Interesse: Os autores declaram não possuir conflitos de interesse.

Suporte Financeiro: O presente trabalho não foi suportado por nenhum subsídio o bolsa ou bolsa.

Proveniência e Revisão por Pares: Não comissionado; revisão externa por pares.

Ethical Disclosures

Conflicts of interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Support: This work has not received any contribution grant or scholarship.

Provenance and Peer Review: Not commissioned; externally peer reviewed.



*Autor Correspondente/Corresponding Author:

Joana Glória

Rua da Casticeira, 186 – Borralha

3750-864 Águeda

joana_gloria@hotmail.com

Recebido/Received: 2019-04-15

Aceite/Accepted: 2020-02-23

Publicado / Published: 2020-07-20

© Author(s) (or their employer(s)) 2019. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use.

© Autor (es) (ou seu (s) empregador (es)) 2019. Reutilização permitida de acordo com CC BY-NC. Nenhuma reutilização comercial.

Referências

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394-424.
- Vandekerckhove G, Chi KN, Wyatt AW. Clinical utility of emerging liquid biomarkers in advanced prostate cancer. *Cancer Genet*. 2018;228-9:151-8.
- Morrison GJ, Goldkorn A. Development and Application of Liquid Biopsies in Metastatic Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2018;20:35.
- Riaz IB, Wang L, Kohli M. Liquid biopsy approach in the management of prostate cancer. *Transl Res*. 2018;201:60-70. doi: 10.1016/j.trsl.2018.05.004.
- Hegemann M, Stenzl A, Bedke J, Chi KN, Black PC, Todenhofer T. Liquid biopsy: ready to guide therapy in advanced prostate cancer? *BJU Int*. 2016;118:855-63.
- Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J*. 1869;14:146-9.
- Zainfeld D, Goldkorn A. Liquid Biopsy in Prostate Cancer: Circulating Tumor Cells and Beyond. *Cancer Treat Res*. 2018;175:87-104.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip*. 2014;14:57-62.
- de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6302-9.
- Goldkorn A PM, Agarwal N, Hussain M, Lara P, Vaena DA, et al. Circulating tumor cells (CTCs) in SWOG S1216: A phase 3 multicenter trial in metastatic hormone sensitive prostate cancer (mHSPC). *J Clin Oncol*. 2016;34.
- Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Immunomagnetic quantification of circulating tumor cells as a prognostic factor of androgen deprivation responsiveness in patients with hormone naive metastatic prostate cancer. *J Urol*. 2008;180:1342-7.
- Goodman OB, Jr., Symanowski JT, Loudyi A, Fink LM, Ward DC, Vogelzang NJ. Circulating tumor cells as a predictive biomarker in patients with hormone-sensitive prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2011;9:31-8.
- Lorente D, Olmos D, Mateo J, Bianchini D, Seed G, Fleisher M, et al. Decline in Circulating Tumor Cell Count and Treatment Outcome in Advanced Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2016;70:985-92.
- Goldkorn A, Ely B, Quinn DI, Tangen CM, Fink LM, Xu T, et al. Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2014;32:1136-42.
- Scher HI, Heller G, Molina A, Attard G, Danila DC, Jia X, et al. Circulating tumor cell biomarker panel as an individual-level surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33:1348-55.
- Magbanua MJ, Sosa EV, Scott JH, Simko J, Collins C, Pinkel D, et al. Isolation and genomic analysis of circulating tumor cells from castration resistant metastatic prostate cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:78.
- Jiang Y, Palma JF, Agus DB, Wang Y, Gross ME. Detection of androgen receptor mutations in circulating tumor cells in castration-resistant prostate cancer. *Clin Chem*. 2010;56:1492-5.
- Darshan MS, Loftus MS, Thadani-Mulero M, Levy BP, Escuin D, Zhou XK, et al. Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer. *Cancer Res*. 2011;71:6019-29.
- Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Lubber B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*. 2014;371:1028-38.
- De Laere B, van Dam PJ, Whittington T, Mayrhofer M, Diaz EH, Van den Eynden G, et al. Comprehensive Profiling of the Androgen Receptor in Liquid Biopsies from Castration-resistant Prostate Cancer Reveals Novel Intra-AR Structural Variation and Splice Variant Expression Patterns. *Eur Urol*. 2017;72:192-200.
- Antonarakis ES, Lu C, Lubber B, Wang H, Chen Y, Nakazawa M, et al. Androgen Receptor Splice Variant 7 and Efficacy of Taxane Chemotherapy in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1:582-91.
- Antonarakis ES, Lu C, Lubber B, Wang H, Chen Y, Zhu Y, et al. Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *J Clin Oncol*. 2017;35:2149-56.
- McDaniel AS, Ferraldeschi R, Krupa R, Landers M, Graf R, Louw J, et al. Phenotypic diversity of circulating tumour cells in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*. 2017;120:E30-E44.
- Scher HI, Graf RP, Schreiber NA, McLaughlin B, Jendrisak A, Wang Y, et al. Phenotypic Heterogeneity of Circulating Tumor Cells Informs Clinical Decisions between AR Signaling Inhibitors and Taxanes in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2017;77:5687-98.
- Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AH, Vickers E, A'Hern R, et al. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*. 2009;69:2912-8.
- Reig O, Marin-Aguilera M, Carrera G, Jimenez N, Pare L, Garcia-Recio S, et al. TMPRSS2-ERG in Blood and Docetaxel Resistance in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2016;70:709-13.
- Punnoose EA, Ferraldeschi R, Szafer-Glusman E, Tucker EK, Mohan S, Flohr P, et al. PTEN loss in circulating tumour cells correlates with PTEN loss in fresh tumour tissue from castration-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer*. 2015;113:1225-33.
- Goldkorn A, Ely B, Tangen CM, Tai YC, Xu T, Li H, et al. Circulating tumor cell telomerase activity as a prognostic marker for overall survival in SWOG 0421: a phase III metastatic castration resistant prostate cancer trial. *Int J Cancer*. 2015;136:1856-62.
- Xu T, Lu B, Tai YC, Goldkorn A. A cancer detection platform which measures telomerase activity from live circulating tumor cells captured on a microfilter. *Cancer Res*. 2010;70:6420-6.
- Marrugo-Ramirez J, Mir M, Samitier J. Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy. *Int J Mol Sci*. 2018;19 pii: E2877. doi: 10.3390/ijms19102877.
- Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer*. 2017;16:80.
- Sunami E, Shinozaki M, Higano CS, Wollman R, Dorff TB, Tucker SJ, et al. Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients. *Clin Chem*. 2009;55:559-67.
- Schutz E, Akbari MR, Beck J, Urnovitz H, Zhang WW, Bornemann-Kolatzki K, et al. Chromosomal instability in cell-free DNA is a serum biomarker for prostate cancer. *Clin Chem*. 2015;61:239-48.
- Chun FK, Muller I, Lange I, Friedrich MG, Erbersdobler A, Karakiewicz PI, et al. Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer. *BJU Int*. 2006;98:544-8.
- Altimari A, Grigioni AD, Benedettini E, Gabusi E, Schiavina R, Martinelli A, et al. Diagnostic role of circulating free plasma DNA detection in patients with localized prostate cancer. *Am J Clin Pathol*. 2008;129:756-62.
- Horning AM, Awe JA, Wang CM, Liu J, Lai Z, Wang VY, et al. DNA methylation screening of primary prostate tumors identifies SRD5A2 and CYP11A1 as candidate markers for assessing risk of biochemical recurrence. *Prostate*. 2015;75:1790-801.
- Romanel A, Gasi Tandefelt D, Conteduca V, Jayaram A, Casiraghi N, Wetterkog D, et al. Plasma AR and abiraterone-resistant prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2015;7:312re10.
- Kwee S, Song M-A, Cheng I, Loo L, Tiirikainen M. Measurement of Circulating Cell-Free DNA in Relation to 18F-Fluorocholine PET/CT Imaging in Chemotherapy-Treated Advanced Prostate Cancer. *Clinical and Translational Science*. 2012;5:65-70.
- Kienel A, Porres D, Heidenreich A, Pfister D. cfDNA as a Prognostic Marker of Response to Taxane Based Chemotherapy in Patients with Prostate Cancer. *J Urol*. 2015;194:966-71.
- Ulz P, Belic J, Graf R, Auer M, Lafer I, Fischereider K, et al. Whole-genome plasma sequencing reveals focal amplifications as a driving force in metastatic prostate cancer. *Nat Commun*. 2016;7:12008.
- Heitzer E, Ulz P, Belic J, Gutsch S, Quehenberger F, Fischereider K, et al. Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome Med*. 2013;5:30.
- Wyatt AW, Azad AA, Volik SV, Annala M, Beja K, McConeghy B, et al. Genomic Alterations in Cell-Free DNA and Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2:1598-606.



43. Azad AA, Volik SV, Wyatt AW, Haegert A, Le Bihan S, Bell RH, et al. Androgen Receptor Gene Aberrations in Circulating Cell-Free DNA: Biomarkers of Therapeutic Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21:2315-24.
44. Lallous N, Volik SV, Awrey S, Leblanc E, Tse R, Murillo J, et al. Functional analysis of androgen receptor mutations that confer anti-androgen resistance identified in circulating cell-free DNA from prostate cancer patients. *Genome Biol.* 2016;17:10.
45. Salvi S, Casadio V, Conteduca V, Burgio SL, Menna C, Bianchi E, et al. Circulating cell-free AR and CYP17A1 copy number variations may associate with outcome of metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone. *Br J Cancer.* 2015;112:1717-24.
46. Carreira S, Romanel A, Goodall J, Grist E, Ferraldeschi R, Miranda S, et al. Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. *Sci Transl Med.* 2014;6:254ra125.
47. Conteduca V, Wetterskog D, Sharabiani MTA, Grande E, Fernandez-Perez MP, Jayaram A, et al. Androgen receptor gene status in plasma DNA associates with worse outcome on enzalutamide or abiraterone for castration-resistant prostate cancer: a multi-institution correlative biomarker study. *Ann Oncol.* 2017;28:1508-16.
48. Mahon KL, Qu W, Devaney J, Paul C, Castillo L, Wykes RJ, et al. Methylated Glutathione S-transferase 1 (mGSTP1) is a potential plasma free DNA epigenetic marker of prognosis and response to chemotherapy in castrate-resistant prostate cancer. *Br J Cancer.* 2014;111:1802-9.
49. Wroclawski ML, Serpa-Neto A, Fonseca FL, Castro-Neves-Neto O, Pompeo AS, Machado MT, et al. Cell-free plasma DNA as biochemical biomarker for the diagnosis and follow-up of prostate cancer patients. *Tumour Biol.* 2013;34:2921-7.
50. Wyatt AW, Annala M, Aggarwal R, Beja K, Feng F, Youngren J, et al. Concordance of Circulating Tumor DNA and Matched Metastatic Tissue Biopsy in Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109. doi: 10.1093/jnci/djx118.
51. Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373:1697-708.
52. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H, et al. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375:443-53.
53. Xia S, Kohli M, Du M, Dittmar RL, Lee A, Nandy D, et al. Plasma genetic and genomic abnormalities predict treatment response and clinical outcome in advanced prostate cancer. *Oncotarget.* 2015;6:16411-21.
54. Sonpavde G, Agarwal N, Pond GR, Nagy RJ, Nussenzveig RH, Hahn AW, et al. Circulating tumor DNA alterations in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer.* 2019;125:1459-69. doi: 10.1002/cncr.31959.
55. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell.* 2015;161:1215-28.
56. Kumar A, Coleman I, Morrissey C, Zhang X, True LD, Gulati R, et al. Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. *Nat Med.* 2016;22:369-78.
57. Annala M, Struss WJ, Warner EW, Beja K, Vandekerkhove G, Wong A, et al. Treatment Outcomes and Tumor Loss of Heterozygosity in Germline DNA Repair-deficient Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2017;72:34-42.
58. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med.* 2009;361:123-34.
59. Goodall J, Mateo J, Yuan W, Mossop H, Porta N, Miranda S, et al. Circulating Cell-Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition. *Cancer Discov.* 2017;7:1006-17.
60. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75:843-54.
61. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D155-D62.
62. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431:350-5.
63. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2257-61.
64. Zidan HE, Abdul-Maksoud RS, Elsayed WSH, Desoky EAM. Diagnostic and prognostic value of serum miR-15a and miR-16-1 expression among Egyptian patients with prostate cancer. *IUBMB Life.* 2018;70:437-44.
65. Musumeci M, Coppola V, Addario A, Patrizi M, Maugeri-Sacca M, Memeo L, et al. Control of tumor and microenvironment cross-talk by miR-15a and miR-16 in prostate cancer. *Oncogene.* 2011;30:4231-42.
66. Bonci D, De Maria R. miR-15/miR-16 loss, miR-21 upregulation, or deregulation of their target genes predicts poor prognosis in prostate cancer patients. *Mol Cell Oncol.* 2016;3:e1109744.
67. Jin W, Chen F, Wang K, Song Y, Fei X, Wu B. miR-15a/miR-16 cluster inhibits invasion of prostate cancer cells by suppressing TGF-beta signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018;104:637-44.
68. Hasegawa T, Glavich GJ, Pahuski M, Short A, Semmes OJ, Yang L, et al. Characterization and Evidence of the miR-888 Cluster as a Novel Cancer Network in Prostate. *Mol Cancer Res.* 2018;16:669-81.
69. Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol.* 2011;32:583-8.
70. Shen J, Hruby GW, McKiernan JM, Gurvich I, Lipsky MJ, Benson MC, et al. Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *Prostate.* 2012;72:1469-77.
71. Zhang HL, Yang LF, Zhu Y, Yao XD, Zhang SL, Dai B, et al. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *Prostate.* 2011;71:326-31.
72. Lin HM, Castillo L, Mahon KL, Chiam K, Lee BY, Nguyen Q, et al. Circulating microRNAs are associated with docetaxel chemotherapy outcome in castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer.* 2014;110:2462-71.
73. Hoey C, Liu SK. Circulating blood miRNAs for prostate cancer risk stratification: miRroring the underlying tumor biology with liquid biopsies. *Res Rep Urol.* 2019;11:29-42.
74. Kelly BD, Miller N, Sweeney KJ, Durkan GC, Rogers E, Walsh K, et al. A Circulating MicroRNA Signature as a Biomarker for Prostate Cancer in a High Risk Group. *J Clin Med.* 2015;4:1369-79.
75. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Falth M, Haese A, Steuber T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2011;128:608-16.
76. Porzycki P, Ciszkowicz E, Semik M, Tyrka M. Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. *Int Urol Nephrol.* 2018;50:1619-26.
77. Moltzahn F, Olshen AB, Baehner L, Peek A, Fong L, Stoppler H, et al. Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer Res.* 2011;71:550-60.
78. Alhasan AH, Scott AW, Wu JJ, Feng G, Meeks JJ, Thaxton CS, et al. Circulating microRNA signature for the diagnosis of very high-risk prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:10655-60.
79. Sharova E, Grassi A, Marcer A, Ruggero K, Pinto F, Bassi P, et al. A circulating miRNA assay as a first-line test for prostate cancer screening. *Br J Cancer.* 2016;114:1362-6.
80. Zhang HL, Qin XJ, Cao DL, Zhu Y, Yao XD, Zhang SL, et al. An elevated serum miR-141 level in patients with bone-metastatic prostate cancer is correlated with more bone lesions. *Asian J Androl.* 2013;15:231-5.
81. Nguyen HC, Xie W, Yang M, Hsieh CL, Drouin S, Lee GS, et al. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *Prostate.* 2013;73:346-54.
82. Liu RSC, Olkhov-Mitsel E, Jayapala R, Zhao F, Comisso K, Klotz L, et al. Assessment of Serum microRNA Biomarkers to Predict Reclassification of Prostate Cancer in Patients on Active Surveillance. *J Urol.* 2018;199:1475-81.
83. Larne O, Martens-Uzunova E, Hagman Z, Edsjo A, Lippolis G, den Berg MS, et al. miQ—a novel microRNA based diagnostic and prognostic tool for prostate cancer. *Int J Cancer.* 2013;132:2867-75.
84. Minciacci VR, Zijlstra A, Rubin MA, Di Vizio D. Extracellular vesicles for liquid biopsy in prostate cancer: where are we and where are we headed? *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017;20:251-8.
85. Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. *N Engl J Med.* 2018;379:958-66.
86. Pan B-T, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983;33(3):967-78.
87. O'Driscoll L. Expanding on exosomes and ectosomes in cancer. *N Engl J Med.* 2015;372:2359-62.
88. Giulietti M, Santoni M, Cimadamore A, Carozza F, Piva F, Cheng L, et al. Exploring Small Extracellular Vesicles for Precision Medicine in Prostate Cancer. *Front Oncol.* 2018;8:221.
89. Sanchez CA, Andahur EI, Valenzuela R, Castellon EA, Fulla JA, Ramos CG, et al. Exosomes from bulk and stem cells from human prostate cancer have a differential microRNA content that contributes cooperatively over local and pre-metastatic niche. *Oncotarget.* 2016;7:3993-4008.
90. Huang X, Yuan T, Liang M, Du M, Xia S, Dittmar R, et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.* 2015;67:33-41.
91. Bhagirath D, Yang TL, Bucay N, Sekhon K, Majid S, Shahyari V, et al. microRNA-1246 Is an Exosomal Biomarker for Aggressive Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2018;78:1833-44.
92. Kharaziha P, Chioureas D, Rutishauser D, Baltatzis G, Lennartsson L, Fonseca P, et al. Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel. *Oncotarget.* 2015;6:21740-54.