VICTOR NOWOSH

Detecção de células tumorais circulantes (CTCs) por isolamento baseado em tamanho e reação em cadeia da polimerase via transcriptase-reversa em tempo real (RT-qPCR) em cães com melanoma oral

São Paulo

2022

VICTOR NOWOSH

Detecção de células tumorais circulantes (CTCs) por isolamento baseado em tamanho e reação em cadeia da polimerase via transcriptase-reversa em tempo real (RT-qPCR) em cães com melanoma oral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Prof.ª Dr.ª Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4219
FMVZ

Nowosh, Victor
Detecção de células tumorais circulantes (CTCs) por isolamento baseado em tamanho e reação em cadeia da polimerase via transcriptase-reversa em tempo real (RT-qPCR) em cães com melanoma oral / Victor Nowosh. – 2022.
157 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes.

1. Biópsia líquida. 2. Expressão gênica. 3. ISET. 4. Imunocitoquímica. 5. Microfiltração. I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Detecção de células tumorais circulantes em sangue e linfonodos sentinela de cães acometidos por melanoma por meio de RT-PCR e sua eficácia como ferramenta para avaliação de prognóstico e de eficiência protocolo de tratamento", protocolada sob o CEUA nº 8500210717 (ID 003948), sob a responsabilidade de **Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes** *e equipe; Victor Nowosh* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/08/2017.

We certify that the proposal "Detection of circulating tumor cells in blood and sentinel lymph nodes of dogs with melanoma by RT-PCR and its efficacy as a tool for prognosis and treatment protocol efficiency evaluation", utilizing 30 Dogs (males and females), protocol number CEUA 8500210717 (ID 003948), under the responsibility of **Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes** *and team; Victor Nowosh* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/03/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 08/2017 a 12/2020 Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem:	HOVET/FMVZ/USP						
Espécie:	Cães	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	0 a 20 anos	N:	30
Linhagem:	Qualquer raça			Peso:	0 a 80 kg		

Local do experimento: A etapa de coleta de amostras será realizada no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, ou em clínicas veterinárias e centros cirúrgicos especializados externos ao FMVZ. O processamento de amostras será realizado no laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada/USP.

São Paulo, 30 de junho de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NOWOSH, Victor

Título: Detecção de células tumorais circulantes (CTCs) por isolamento baseado em tamanho e reação em cadeia da polimerase via transcriptase-reversa em tempo real (RT-qPCR) em cães com melanoma oral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

DATA: _____/_____/_____

Banca examinadora

Prof.ª Dr.ª Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes

Instituição: Universidade de São Paulo. Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

“Se eu fosse só, já não estaria mais aqui
Meu Orixá quem me ajudou a persistir”

Antes de mais nada eu gostaria de agradecer à espiritualidade, por ter me acompanhado nessa trajetória. A meu pai Oxóssi, por ter me apontado o caminho com sua flecha certeira. A minha mãe Oxum, por ter me banhado com suas águas nos momentos que precisei de acalanto. A todos os guias que estiveram a meu lado nessa etapa final, pois pude sentir a sua presença me incentivando a seguir em frente. Muito obrigado e muito axé.

Um agradecimento especial à minha orientadora, prof. ª Dr.ª Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, sem cujos direcionamentos nada disso seria possível. Obrigado por confiar em mim, antes mesmo de me conhecer. Por saber ser em quais momentos ser dura e em quais momentos ser uma grande amiga. Levo comigo os ensinamentos e o carinho de mais uma “mãe” que apareceu minha vida.

Agradeço imensamente também à Prof.ª Dr.ª Ludmilla Thomé Domingos Chinén e a toda a equipe do Centro Internacional de Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center, mais especificamente às pesquisadoras Dr.ª Alexcia Camila Braun e doutoranda Anna Paula Carreta Ruano pelo maior envolvimento nesta pesquisa. Pelos nossos resultados, acredito que demos início a algo muito inovador na medicina veterinária, e espero que nossos pacientes, humanos e animais, possam se beneficiar do resultado dessa pesquisa dentro do âmbito de saúde única. Obrigado pela parceria.

Agradeço aos professores do Departamento de Patologia Experimental e Comparada que ajudaram direta ou indiretamente na concepção e realização da pesquisa, especialmente aos professores Dr. Bruno Cogliati, Dr.ª Terezinha Knöbl, Dr. José Luiz Catão Dias, Dr. Luciano Freitas Felício e Dr.ª Maria Lucia Zaidan Dagli, por permitirem o uso da infra-estrutura de seus laboratórios.

A todos os funcionários do departamento com quem tive a oportunidade de conviver ao longo desses anos, muito obrigado pelos momentos de sabedoria. Agradeço especialmente a Herculano Pinho Pereira, grande companheiro e parceiro para todos os momentos, e a Dennis Albert Zanatto, cuja ajuda foi fundamental nessa pesquisa.

A todos os pós-graduandos do VPT, companheiros de caminhada com os quais tive o prazer de criar laços de amizade que levarei comigo, muito obrigado. Agradecimentos especiais a Vivian Fratti Penna Ríspoli, Cássia Corrêa Yasumaru, Júlia de Carvalho

Nakamura, Mariana de Souza Aranha, Isis Paixão de Jesus, Juliana Correa Sanchez, Gabriela Toledo, Luana Carvalho Cezar e Jessica Soares Garcia. Agradeço também a Marco Aurelio Amador Pereira, pós-graduando do VCI e amigo de outras pós-graduações, que foi o responsável por me trazer para a USP.

Agradeço ainda a todos os veterinários que ajudaram fornecendo amostras para essa pesquisa e a todos os pacientes que participaram do estudo. Que sua participação traga benefícios e permita menos sofrimento a novos pacientes no futuro.

No âmbito pessoal, gostaria de iniciar agradecendo ao meu noivo Daivson Pereira dos Santos. Obrigado por todo o apoio de perto nesse momento tão importante. É muito bom seguir em frente com a certeza de que estou com a pessoa certa. Eu te amo por essa e por outras vidas.

Agradeço também aos meus pais, Márcia Regina Nowosh e Leo Nowosh Filho, por todo o apoio nos momentos de aperto e que me ajudaram até que eu conseguisse me estabelecer. Amo vocês, não deixem que a distância faça vocês esquecerem disso. Agradeço também a meus irmãos, Nikolai Nowosh e Sylvia Helena Nowosh, cunhados, Marianna Zattar e Leonardo Checcacci, sobrinhos, Tom e Bibi, e à minha sogra, Daisy Lúcia Pereira dos Santos. Obrigado por serem essa família que tanto me apoia, que eu amo e que me faz feliz.

Tenho o prazer de ser abençoado com muitas amizades, portanto não tenho como agradecer a cada um de meus amigos nominalmente, mas que todos vocês saibam que, estando mais perto ou mais longe de acordo com a fase da vida, o laço que nos une é mais forte que a distância. Agradeço especialmente a Paulo Vitor Dias de Carvalho e Maicon ‘Pato’ Souza por terem ajudado na confecção dessa tese, mesmo que tenha sido com o simples gesto de me presentearem com chocolates.

Agradeço aos meus filhos e sobrinhos de quatro patas, motivos pelo qual segui essa carreira. Aos que estão conosco, Miguel, Zeca, Preta, Joana e Zoya, e aos que já partiram, Jorginho, Sarah, Nina, Margareth, Floquinho e Dolly, meu amor eterno a vocês.

Escolho deixar este agradecimento para o final pois julgo ser o mais importante. Em tempos tão sombrios para a pesquisa científica no Brasil, é de extrema importância dar destaque e valorizar aqueles que resistem financiando a ciência e buscando o esclarecimento da população. Portanto, agradeço imensamente à **Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES**), sem cujo apoio essa tese não teria se concretizado.

Esta pesquisa foi cadastrada sob o Processo nº 2017/22374-0 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

NOWOSH, V. **Detecção de células tumorais circulantes (CTCs) por isolamento baseado em tamanho e reação em cadeia da polimerase via transcriptase-reversa em tempo real (RT-qPCR) em cães com melanoma oral. 157p.** Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O câncer figura como uma relevante causa de morte em humanos e pequenos animais. Uma das neoplasias mais desafiadoras em ambas as situações é o melanoma, com um comportamento agressivo e alto índice de metástases. As similaridades existentes entre as neoplasias malignas em ambas as espécies despertam o interesse no uso de cães como modelos para estudos oncológicos em humanos. Atualmente, a medicina tem focado na medicina de precisão e, dentro dela, na biópsia líquida. Esta é uma ferramenta inovadora que detecta biomarcadores tumorais, incluindo células tumorais circulantes (CTCs). Ela apresenta potencial para prognóstico, diagnóstico e avaliação do tratamento. Apesar do grande interesse em oncologia humana, estudos de biópsia líquida são escassos em veterinária e focam mais em outros marcadores. Baseando-se nisso, o objetivo dessa tese foi aplicar dois métodos de detecção de CTCs em cães com melanoma oral. No primeiro capítulo, foi feita uma revisão bibliográfica dos temas “melanoma em cães” e “biópsia líquida.” No segundo capítulo, foi testada a metodologia de enriquecimento por centrifugação por gradiente de densidade e de caracterização por PCR transcriptase-reversa em tempo real para os transcritos melan-A e tirosinase. O grupo de estudo analisado foi de 31 pacientes. Um estudo-piloto demonstrou boa sensibilidade da técnica, e 29/31 pacientes (93%) apresentaram resultados positivos, porém, os controles apontaram 43% de falsos-positivos. A eletroforese em gel de agarose sugeriu amplificações inespecíficas. Muitas dificuldades inerentes à técnica e particularidades da realidade veterinária podem ter contribuído para o resultado observado, e essa experiência é discutida em mais detalhes. No terceiro capítulo, foi testada a metodologia de microfiltração pelo método *Isolation by Size of Tumor Cells* (ISET), seguida pela caracterização imunocitoquímica com os marcadores melan-A, PNL2 e S100. O grupo de estudo analisado foi de 10 pacientes. CTCs foram encontradas e caracterizadas em 9/10 casos. A média de CTCs encontradas foi de 1,1 célula/mL de sangue. 3/10 casos foram positivos para melan-A, 3/10 para PNL2 e 8/10 para S100, demonstrando

a heterogeneidade das CTCs. No entanto, amostras de neoplasias não melanocíticas também marcaram para S100, apontando baixa especificidade deste marcador. Um paciente com progressão tumoral rápida apresentou 18 células isoladas e microêmbolos tumorais, porém um paciente sem CTCs detectadas teve progressão similar, logo a ausência de CTCs não pode ser sempre correlacionada a um prognóstico melhor. A avaliação estatística demonstrou correlação significativa entre o número de CTCs e a presença de metástases linfonodais, sugerindo uma potencial capacidade de avaliação prognóstica. Conclui-se que metodologias já estabelecidas em humanos, mediante as devidas adaptações, permitem a detecção de CTCs em pacientes caninos com melanoma oral. A ISET apresentou uma boa capacidade de detectar as CTCs, e seus resultados demonstram uma possível aplicação para avaliação prognóstica do paciente. Ensaios clínicos em larga escala são desejados para que comprovar a sua utilidade clínica e para que tanto os cães quanto os humanos possam se beneficiar mais dessa técnica.

Palavras-chave: Biópsia líquida. Expressão gênica. ISET. Imunocitoquímica. Microfiltração.

ABSTRACT

NOWOSH, V. **Circulating tumoral cells (CTCs) detection by size-based isolation and reverse-transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) in dogs with oral melanoma. 157p.** Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Cancer is a relevant cause of death among humans and companion animals. In both cases, melanoma is a challenging diagnosis, with highly aggressive behavior and a high risk of metastasis. Similarities between malignant neoplasms in these species motivate the use of dogs as models for medical oncology studies. Nowadays, there is a focus on personalized medicine and, consequently, on liquid biopsy. This novel tool detects tumoral biomarkers, including circulating tumor cells (CTCs). It has the potential for patients' prognostic, diagnostic, and therapeutic assessment. Besides its considerable interest in human oncology, liquid biopsy studies are still lacking in veterinary medicine and tend to focus on other biomarkers. Based on this, this thesis aims to apply two CTC detection methods in dogs with oral melanoma. In the first chapter, a bibliographic review was conducted on the subjects "canine melanoma" and "liquid biopsy." In the second chapter, we tested the enrichment of cells by density-gradient centrifugation and characterization by real-time reverse-transcriptase PCR for melan-A and tyrosinase transcripts. There were 31 dogs enrolled in this study. A pilot study has shown good sensitivity to this technique, and 29/31 patients (93%) had positive results. However, controls have shown a 43% false-positive rate. Agarose gel electrophoresis results suggested unspecific amplification. Many challenges inherent to the technique and particularities inherent to veterinary reality may have contributed to these results, and this experience is further discussed. In the third chapter, we tested the enrichment of cells by microfiltration, specifically Isolation by Size of Tumor Cells (ISET), followed by characterization with immunocytochemistry for melan-A, PNL2 and S100 markers. There were 10 dogs enrolled in this study. CTCs were detected and stained positive in 9/10 samples. The mean count of CTCs was 1,1 cells/mL of blood. 3/10 samples were positive for melan-A, 3/10 for PNL2, and 8/10 for S100, showing how heterogeneous these cells are. However, samples from non-melanocytic neoplasms were also stained for S100, showing this marker's low specificity. A patient with fast tumoral progression had 18 total individual cells and tumoral microemboli.

However, a patient with no detected CTCs had a similar progression. Thus, the absence of CTCs can not always be correlated with a better prognosis. Statistical analysis has shown a significant correlation between CTC count and lymph node metastasis, suggesting a potential capacity in prognosis assessment. We conclude that, with its adaptations, well-established methods in human medicine allow the detection of CTC in dogs with oral melanoma. ISET demonstrated a good performance in detecting CTCs and it also has shown a potential application in patient prognosis assessment. Large-scale clinical trials are needed to validate its clinical utilities, and dogs and humans may benefit more from these techniques.

Keywords: Gene expression. Immunocytochemistry. ISET. Liquid biopsy. Microfiltration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 01. Estadiamento de melanomas caninos segundo a Organização Mundial da Saúde. 36

Quadro 02. Utilidades e limitações da biópsia tecidual e da biópsia líquida. 45

Quadro 03. Utilidades e limitações dos principais marcadores de biópsia líquida. 46

CAPÍTULO 02 – ARTIGO 01

Figure 1. Dot-plot and histogram representative of flow-cytometry analysis of peripheral blood mononuclear cells isolated from a healthy dog spiked with serially lower quantities of CFSE stained tumoral cells from a primary metastatic melanoma cell line. **Upper row:** Dot-plot graphs. **Lower row:** Histogram graphs. **a)** Sample spiked with 10^3 cells/mL of blood. **b)** Sample spiked with 10^2 cells/mL of blood. **c)** Sample spiked with 10 cells/mL of blood. **d)** Sample spiked with 1 cell/mL of blood. Analysis performed on FlowJo® v.10.8 Software (BD Life Sciences). 2022. 118

Figure 2. Gel picture of RT-qPCR performed for patients with canine oral melanoma. **Lane 1.** 100bp-ladder. **Lanes 2-3.** Positive controls. **Lanes 4-12.** Samples. Faint smears on samples suggest fluorescence detected correspond to unspecific amplification. 2022. 121

CAPÍTULO 03 – ARTIGO 02

Figure 1. Results of positive and negative control samples submitted to isolation by Size of Tumoral Cells (ISET) method and stained by Immunocytochemistry. **A.** Positive control. Arrows point to five melan-A-stained melanoma cells from a primary cell culture (MeLN-cells). Asterisks represent micropores on ISET module membrane **B.** Positive control. Three S100-stained MeLN-cells are seen. **C.** Positive control. One PNL2-stained MeLN-cell is seen. Numerous leukocytes were retained due to platelet clumping and were not stained. **D.** Negative control. Numerous leukocytes are retained. CD45 stained positive in these cells. DAB-chromogen. 2022. 143

Figure 2. Results of samples from canine patients with oral melanoma submitted to isolation by Size of Tumoral Cells (ISET) method and stained by immunocytochemistry. **A.** Circulating tumoral cell (CTC) stained by melan-A. **B.** CTC stained by S100. **C.** Retained cell with morphology suggestive of CTC. **D.** Microembolus containing many cells stained by PNL2. DAB-chromogen. 2022. 145

Figure 3. Boxplot analysis comparing CTC counts in patients with and without lymph node metastasis (LNM) at sampling. Mean CTC count was significantly higher in patients with LNM ($p<0,05$). 2022. 146

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 03 – ARTIGO 02

Table 1. Characterization of 10 patients with oral melanoma. 2022..... 140

Table 2. Circulating tumor cell counting and immunostaining by Isolation by Size of Tumor Cells methods in 10 dogs with oral melanoma, a dog with fibrosarcoma, and a dog with osteosarcoma. 2022..... 144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B7-H3	*B7 homolog 3 protein*
BRAF	*Serine* / *Threonine kinase proto-oncogene*
CDKI	*Cyclin-dependent kinase inhibitor gene*
CD146	*Cluster of differentiation 146* / Molécula de adesão celular do melanoma
CD45	*Cluster of differentiation 45* / Antígeno comum leucocitário
CD63	*Cluster of differentiation 63* / Tetraspaninas
COX	Ciclo-oxigenase
CSPG4	*Chondroitin sulfate proteoglycan 4*
Ct	*Cycle threshold*
CTC	Células tumorais circulantes
cfDNA	DNA livre circulante
ctDNA	DNA tumoral circulante
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
EGFR	*Epidermal Growth Factor Receptor marker*
EpCAM	*Epithelial Cellular Adhesion Molecule*
EV	Vesícula extracelular
HER	*Human Epidermal Growth Factor Receptor*
HMW-MAA	*Human high molecular weight-melanoma-associated antigen*
ISET	*Isolation by SizE of Tumoral cells*
Ki-67	Antígeno marcador de proliferação Ki-67
MART-1	*Melanoma-associated antigen recognized by T-cells*
Melan-A	*Melanoma Antigen marker*
miRNA	Micro-RNA
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMCs	*Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-1	*Programmed Cell-Death Receptor-1*
PD-L1	*Programmed Cell-Death Ligand-1*
PNL-2	Antígeno associado ao melanoma
P53	*Tumor supressor protein gene 53*

PSA	*Prostate-specific antigen*
RACK1	*Receptor for Activated C Kinase 1*
RB-1	*Retinoblastoma protein gene*
RNA	Ácido ribonucléico
RT-qPCR	PCR transcriptase-reversa quantitativa
TEPs	Plaquetas educadas por tumores
TK-1	Thymidine-kinase 1
TNM	*Tumor* / *Node* / *Metastasis*
TRP	*Tyrosinase related protein*
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
bp	Pares de base
cm	Centímetro
kbp	Quilobase
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
x *g*	Força gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

CAPÍTULO 1 – REVISÂO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA 23
2.1 MELANOMA EM CÃES 23
2.1.1 Conceitos 23
2.1.2 Etiopatogenia 24
2.1.3 Apresentação clínico-patológica 25
2.1.4 Diagnóstico 26
2.1.4.1 Citopatologia e imunocitoquímica 27
2.1.4.2 Histopatologia 29
2.1.4.3 Imuno-histoquímica 30
2.1.4.4 Outros exames de apoio 33
2.1.5 Tratamento 34
2.1.6 Estadiamento e prognóstico 36
2.1.7 Cães como modelos para melanomas em humanos 39
2.2 BIÓPSIA LÍQUIDA 41
2.2.1 Conceitos 41
2.2.2 Biópsia líquida e biópsia tecidual convencional 43
2.2.3 Biomarcadores para biópsia líquida 45
2.2.3.1 DNA tumoral circulante 47
2.2.3.2 Células tumorais circulantes 50
2.2.3.3 Vesículas extracelulares 57
2.2.3.4 Plaquetas educadas por tumores 61
2.2.3.5 RNA tumoral circulante 63
2.2.3.6 Proteômica 64
2.2.3.7 Outros biomarcadores 65
2.2.4 Aplicações da biópsia líquida 66
2.2.5 Limitações e desafios da biópsia líquida 68
2.2.6. Biópsia líquida aplicada a melanomas humanos 71

2.2.7 Realidade da biópsia líquida em medicina veterinária 75
REFERÊNCIAS 79

CAPÍTULO 2 – ARTIGO 01

3 LIMITATIONS OF REAL-TIME REVERSE-TRANSCRIPTASE PCR AS A METHOD FOR CHARACTERIZE CIRCULATING TUMOR CELL GENE EXPRESSION IN DOGS WITH ORAL MELANOMA 112
3.1 ABSTRACT 112
3.2 INTRODUCTION 113
3.3 MATERIALS AND METHODS 114
3.3.1 Ethics committee 114
3.3.2 Patient selection 114
3.3.3 Control samples 115
3.3.4 Density-gradient centrifugation 115
3.3.5 Real-time reverse transcriptase PCR 116
3.4 RESULTS 117
3.4.1 Testing of control samples 117
3.4.2 Testing of patient samples 120
3.5 DISCUSSION 121
3.5.1 Results illustrate the challenges of liquid biopsies 121
3.5.2 Lack of standardization makes it unfeasible to predict which method will lead to better results 122
3.5.3 Necessity of high sensitivity may have introduced bias to the technique 124
3.5.4 Sample handling and quality are critical due to the low viability of CTCs 125
3.5.5 Veterinary medicine still has challenges of its own to overcome to implement liquid biopsy techniques 127
3.6 CONCLUSION 128
3.7 ACKNOWLEDGEMENTS 129
REFERENCES 129

CAPÍTULO 3 – ARTIGO 02

4 THE POTENTIALITY OF LIQUID BIOPSY: ISOLATION BY SIZE OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN CANINE ORAL MELANOMA AND ITS RELATION TO LYMPH NODE METASTASIS 135
4.1 ACKNOWLEDGEMENTS 135
4.2 ABSTRACT 136
4.3 INTRODUCTION 136
4.4 MATERIALS AND METHODS 138
4.4.1 Ethics disclaimer 138
4.4.2 Cell line validation statement 138
4.4.3 Control samples 139
4.4.4 Patient Selection and Sample Collection 139
4.4.5 Processing for Microfiltration 140
4.4.6 Staining and Immunocytochemistry 141
4.4.7 Statistical analysis 142
4.5 RESULTS 142
4.6 DISCUSSION 146
4.7 CONCLUSION 150
REFERENCES 151

5 CONCLUSÃO 157

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas, coletivamente chamadas de câncer, são a principal causa de morte de seres humanos. Em 2020, estimam-se 19,3 milhões de novos casos de câncer, com em torno de 10 milhões de mortes, figurando como uma das principais causas de óbito em indivíduos antes dos 70 anos em mais de 120 países. Esses números refletem o envelhecimento da população e o aumento de sua exposição a fatores de risco (SUNG *et al.*, 2021).

Dados semelhantes são observados em animais. Os animais de companhia têm sido considerados parte da família, e melhores condições de abrigo, higiene e saúde levam a uma maior longevidade, o que consequentemente aumenta o número de casos de câncer em medicina veterinária (TANAKA; YAMAGUCHI; IWASA, 2020). Em países mais desenvolvidos, onde doenças infecciosas são bem controladas, as neoplasias malignas são a maior causa de morte de cães (BONNETT *et al.*, 2005; FLEMING; CREEVY; PROMISLOW, 2011; INOUE *et al.*, 2015). Em países como o Brasil, onde ainda há uma grande incidência de doenças infecciosas, o câncer aparece como a segunda mais frequente causa de morte em cães de todas as idades e a principal quando são considerados apenas cães idosos (BENTUBO *et al.*, 2007; DE FREITAS *et al.*, 2021). Estima-se que a incidência de câncer em cães seja 10 vezes maior que em humanos devido a sua menor estimativa de vida (CHIBUK *et al.*, 2021).

Existem muitas similaridades entre o desenvolvimento de tumores em humanos e em cães. Muitas neoplasias se desenvolvem com características anatômicas e fisiológicas semelhantes entre as espécies, incluindo a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases (BARUTELLO *et al.*, 2018; PAOLONI; KHANNA, 2007). Além disso, como vivem no mesmo ambiente, ambos estão expostos aos mesmos agentes ambientais (NISHIYA *et al.*, 2016). Estas semelhanças permitem o uso de cães como modelos experimentais em estudos pré-clínicos para humanos (BARUTELLO *et al.*, 2018; NISHIYA *et al.*, 2016).

O melanoma é um dos tumores de maior importância para ambas as espécies. Em cães, esta neoplasia frequentemente apresenta um prognóstico desfavorável, devido a sua progressão rápida, diagnóstico tardio e alto potencial metastático. Sua apresentação mais frequente é a oral, correspondendo a 60–70% dos melanomas nesta espécie (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Em humanos, a

apresentação mais frequente é a cutânea. Estima-se um total de 324.635 novos casos de melanoma cutâneo no ano de 2020 (SUNG *et al.*, 2021). A forma bucal em humanos corresponde a apenas 1% dos casos, mas o seu comportamento é semelhante ao observado em cães, sendo extremamente agressivo, com progressão rápida (MA *et al.*, 2021; MINHAHN *et al.*, 2019).

Os melanomas orais caninos apresentam numerosas semelhanças com os melanomas bucais humanos. Os fatores relacionados com o seu desenvolvimento são pouco conhecidos e não parece haver relação com a exposição com a luz UV como observado na forma cutânea. São tumores extremamente heterogêneos e com padrões de mutações tumorais diversos (ALSAIHATI *et al.*, 2021; GRZYWA; PASKAL; WŁODARSKI, 2017; MA *et al.*, 2021). Dessa forma, os esforços voltados para o estudo de melanomas orais em cães são vistos como potenciais benefícios para os melanomas bucais em humanos, já que esses são pouco estudados devido a sua raridade (NISHIYA *et al.*, 2016; PROUTEAU; ANDRÉ, 2019).

Recentemente, a medicina de precisão ascendeu como uma área de grande interesse em pesquisa em oncologia. Esta é definida como a área da medicina que utiliza a informação genética do tumor para um planejamento personalizado para cada paciente (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2014). Novas técnicas diagnósticas estão sendo desenvolvidas com este foco, e uma das ferramentas que está atraindo a atenção da comunidade científica é a biópsia líquida (ALIX-PANABIÈRES, 2020; FERNÁNDEZ-LÁZARO *et al.*, 2020; HEIDRICH *et al.*, 2021; IGNATIADIS; SLEDGE; JEFFREY, 2021; ROSSI; IGNATIADIS, 2019).

A biópsia líquida é definida como um teste realizado em uma amostra de sangue para procurar células tumorais ou fragmentos de seu DNA na circulação (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2014). Os biomarcadores mais comumente utilizados são as células tumorais circulantes (CTC) e o DNA tumoral circulante (ctDNA), com novos biomarcadores sendo estudados (FERNÁNDEZ-LÁZARO *et al.*, 2020; MARTINS *et al.*, 2021). As suas potenciais aplicações são a avaliação prognóstica, a avaliação da heterogeneidade tumoral, o monitoramento em tempo real e a personalização do tratamento (CHIBUK *et al.*, 2021; MARTINS *et al.*, 2021).

Em oncologia humana, a biópsia líquida está sendo cada vez mais utilizada, e estudos demonstram seu papel como um fator prognóstico independente na sobrevida livre de progressão e sobrevida global de pacientes com diversos tumores (MARTINS *et al.*, 2021). Para o melanoma, a biópsia líquida tem sido amplamente

discutida e seu valor prognóstico está sendo estudado, porém, sua aplicabilidade ainda é experimental devido à falta de validação dos dados observados (HUANG; HOON, 2016; KAMIŃSKA *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2016).

Recentemente, as CTCs ficaram em segundo plano como biomarcadores devido à evolução e barateamento dos métodos moleculares para a detecção do ctDNA, mas sua importância na oncologia não deve ser menosprezada, visto que fornece informações complementares que apenas a análise molecular não é capaz como, por exemplo, estudos fenotípicos, morfológicos e funcionais que só são possíveis pelo isolamento de células íntegras (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016). Além disso, a circulação de células viáveis é parte fundamental da cascata metastática, portanto os CTCs sendo os únicos biomarcadores de biópsia líquida com potencial preditivo de metástases (JEONG *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2017).

Por serem raras na circulação, a análise das CTCs deve iniciar por um processo de enriquecimento para sua concentração na amostra. Os métodos de enriquecimento de CTCs podem ser imunológicos – baseados no uso de anticorpos contra os antígenos em sua superfície – ou não imunológicos – baseados em características físicas das células que as diferem dos leucócitos (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016). Depois do enriquecimento, as CTCs podem ser caracterizadas de diversas formas, como por imunocitoquímica, cultivo celular ou métodos moleculares para a detecção de RNA mensageiro (mRNA), permitindo a avaliação de seu perfil transcricional (HEIDRICH *et al.*, 2021).

A biópsia líquida tem sido muito estudada em oncologia humana, porém ela é pouco abordada em medicina veterinária (CHIBUK *et al.*, 2021). Muitos dos estudos já realizados focam em detecção de ctDNA (BECK et al., 2013; BEFFAGNA et al., 2017; COLOMBO et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2022; LEE et al., 2019; MOCHIZUKI et al., 2015; PROUTEAU et al., 2021; TAGAWA et al., 2019, 2020). Estudos envolvendo CTCs são escassos e baseiam-se em caracterização molecular (DA COSTA *et al.*, 2011, 2012, 2013), detecção por imunomagnetismo (MARCONATO *et al.*, 2019) ou citometria de fluxo (WRIGHT *et al.*, 2019). Até o momento, não há estudos em veterinária envolvendo o enriquecimento de CTCs íntegras por métodos baseados em suas características físicas, tal como o seu tamanho. Também não foram, até então, realizados estudos de biópsia líquida envolvendo cães com melanoma oral.

Baseando-se no interesse da biópsia líquida para a medicina veterinária, na importância do melanoma oral para a espécie canina, e no potencial para a patologia comparada no uso de modelos caninos em oncologia, este estudo foi desenvolvido com o objetivo principal de aplicar metodologias para a detecção de CTCs em cães com melanoma oral. Para tal, dois métodos foram escolhidos e adaptados: PCR via transcriptase-reversa em real time (RT-qPCR), para a detecção de mRNA tumoral de CTCs enriquecidas por centrifugação por gradiente de densidade; e o isolamento baseado em tamanho de células tumorais (ISET, do inglês, *Isolation by SizE of Tumoral cells),* uma metodologia de enriquecimento por microfiltração do sangue para a detecção de CTCs íntegras, seguido pela sua caracterização por imunocitoquímica.

Nossa hipótese é que, devido ao alto potencial metastático do melanoma oral, será possível detectar e caracterizar CTCs nas amostras dos pacientes testados por ambas as metodologias, da mesma forma que o observado em melanomas humanos. Além disso, acreditamos que os dados obtidos na biópsia líquida estarão correlacionados com fatores prognósticos, indicando o seu potencial em predizer o prognóstico dos pacientes no momento da coleta.

A metodologia de RT-qPCR foi desenvolvida no laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A metodologia de microfiltração foi realizada sob a supervisão e em parceria com a Prof.ª Dr.ª Ludmilla T.D. Chinén e a equipe de pesquisadores do hospital A.C. Camargo Cancer Center. As amostras foram obtidas de pacientes caninos atendidos em diversas clínicas parceiras na cidade de São Paulo.

Nas próximas seções, será apresentada uma revisão sobre melanoma canino e sobre biópsia líquida, seguida por dois artigos científicos escritos com base nos resultados observados.

CAPÍTULO 1

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão se dividirá em dois grandes temas: primeiramente, introduzirá o que se sabe hoje sobre melanoma na espécie canina, com principal enfoque em melanoma oral; em seguida, será realizada uma revisão dos conhecimentos atuais sobre biópsia líquida, seus conceitos, seus biomarcadores e metodologias para detectá-los, suas aplicabilidades e limitações e um panorama da biópsia líquida em medicina veterinária.

2.1 MELANOMA EM CÃES

2.1.1 Conceitos

Os tumores melanocíticos são neoplasias originada dos melanócitos, células dendríticas originadas de melanoblastos da ectoderme durante a embriogênese (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). O nome melanoma é convencionalmente utilizado para neoplasias malignas, em contraste com o melanocitoma, sua contraparte benigna (SPANGLER; KASS, 2006). Estes tumores acometem humanos e diversas espécies de animais de companhia, incluindo o cão, frequentemente com prognóstico maligno (PROUTEAU; ANDRÉ, 2019). Em cães, o melanoma é descrito como uma neoplasia comum, correspondendo a 3% de todas as neoplasias e até 7% de todas as neoplasias malignas (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Em torno de 70% das neoplasias melanocíticas em cães são malignas. Melanomas caninos são geralmente detectados em estágios mais avançados e já com metástases, apresentando progressão rápida e um prognóstico grave. Nesta espécie, o sítio onde a neoplasia se manifesta pode ser utilizado como um fator preditivo inicial de comportamento. Melanomas cutâneos e oculares usualmente apresentam comportamento benigno, enquanto melanomas orais, de junções mucocutâneas e de dígito ou leito ungueal frequentemente apresentam alto grau de malignidade (BERGMAN, 2007; GILLARD *et al.*, 2014).

Em cães, a forma oral do melanoma é a sua apresentação mais comum, assim como é o mais comum dentre os tumores de cavidade oral. Mais comumente se origina na gengiva, mas também pode ocorrer na língua, mucosa jugal, faringe, tonsilas, palato ou na junção mucocutânea dos lábios. Melanomas orais apresentam rápido crescimento, são invasivos e frequentemente apresentam recorrência após excisão cirúrgica, portanto este diagnóstico sempre deve ser considerado como potencialmente maligno (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

2.1.2 Etiopatogenia

A transformação maligna dos melanócitos é bem estudada em humanos. Um fator promotor do câncer gera instabilidade do DNA, levando a mutações que se acumulam nas células. Quando atingem genes que codificam proteínas envolvidas na supressão tumoral e proliferação celular, as células malignas ganham a capacidade de sobreviver às defesas do organismo e de se proliferar descontroladamente. Genes frequentemente envolvidos nesse processo incluem p53, RB-1 e CDKI. Com a progressão tumoral, eventualmente as células ganham a capacidade de metastatizar para novos sítios, podendo levar à morte do paciente (MODIANO; RITT; WOJCIESZYN, 1999; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Os fatores promotores para o surgimento de melanomas cutâneos em humanos são bem conhecidos. De uma forma geral, o desenvolvimento do melanoma é multifatorial e envolve tanto a susceptibilidade genética quanto os fatores ambientais. A exposição à radiação UV se destaca, responsável por cerca de 70% de casos de melanoma cutâneo em humanos, embora histórico familiar, cor de pele, alimentação e imunossupressão são todos fatores correlacionados com a ocorrência desse tumor (DZWIERZYNSKI, 2021).

Em animais de companhia, não há consenso sobre os fatores de risco para o desenvolvimento de melanomas. A exposição à radiação UV, por exemplo, não parece apresentar tamanha relevância para o desenvolvimento dos melanomas orais em cães, e os traumas crônicos e a ação da microbiota parecem ser fatores mais importantes. A maior ocorrência em cães de raça e em membros da mesma família sugere a susceptibilidade genética como um fator de risco, porém consanguinidade, trauma, exposição a agentes químicos e influência hormonal também são

considerados como prováveis fatores promotores tumorais (NISHIYA *et al.*, 2016; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

2.1.3 Apresentação clínico-patológica

Os melanomas primários costumam aparecer mais frequentemente na cavidade oral e nos lábios, correspondendo a mais de 60% dos casos de melanoma, seguido pela pele e dígitos. Outras apresentações menos frequentes, como a ocular, coletivamente correspondem a 1–2% dos casos de melanoma (GILLARD *et al.*, 2014; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Um levantamento de 2350 de tumores melanocíticos em cães apontou que 70% de todos os casos apresentam comportamento maligno, e o sítio anatômico estava frequentemente associado ao prognóstico. Melanomas orais, de dígito e leito ungueal apresentaram comportamento maligno em 97%, 84% e 100% dos casos, respectivamente, enquanto melanomas cutâneos e oculares apresentaram apenas 47% e 29% de casos malignos, respectivamente (GILLARD *et al.*, 2014).

Os tumores melanocíticos são mais frequentes em cães idosos, acima de 10 anos. A média de idade no diagnóstico é de 11 anos para melanomas e 8,8 anos para melanocitomas. Apesar disso, este diagnóstico não deve ser descartado em animais mais jovens, podendo ser diagnosticados em cães com até 01 ano (GILLARD *et al.*, 2014; RAMOS-VARA *et al.*, 2000). Há relatos de maior frequência do melanoma oral em cães machos, da mesma forma que o melanoma bucal humano é mais frequente em homens (GILLARD *et al.*, 2014; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002), mas este achado não é unânime entre estudos (RAMOS-VARA *et al.*, 2000).

Não há uma predileção racial clara, porém algumas raças apresentam maior predisposição do que outras, favorecendo a hipótese de uma influência genética e familiar no desenvolvimento de melanomas. Raças comumente relatadas incluem Chow-chow, Cocker Spaniel, Dobermann, Golden Retriever, Poodle, Rottweiller, Schnauzer, Scottish terriers e Setters. Alguns estudos apontam uma ocorrência maior de melanomas em cães com pelagem escura, sugerindo uma influência menor da radiação solar no desenvolvimento de melanomas na espécie canina (GILLARD *et al.*, 2014; RAMOS-VARA *et al.*, 2000; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

A apresentação macroscópica do melanoma é altamente variável. O tamanho no momento do diagnóstico apresenta grande correlação com o prognóstico, sendo

utilizado no estadiamento. Geralmente, esses tumores são detectados com tamanho variando entre 1,0 e 3,0 cm. Massas maiores tendem a ser ulceradas. Observa-se variação de coloração, com a possibilidade de tumores intensamente pigmentados e melanomas completamente sem pigmentação, chamados de amelanóticos. O formato também é bastante variável, podendo apresentar-se como nódulos, pólipos, placas elevadas ou massas lobuladas (BERGMAN, 2007; RAMOS-VARA *et al.*, 2000; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Como todos os pacientes oncológicos, pacientes com melanoma estão susceptíveis a uma série de sinais sistêmicos, tais como apatia, anorexia, caquexia e febre, e alterações em exames laboratoriais, como anemia, neutrofilia e trombocitopenia (BERGMAN, 2013). Sinais clínicos mais específicos de neoplasias orais no momento de diagnóstico incluem disfagia, halitose, ptialismo e sangramentos gengivais. Tumores mais agressivos podem invadir os ossos da mandíbula e levarem a fraturas. Caso haja metástases, pode haver sinais clínicos correlacionados com os órgãos acometidos (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

2.1.4 Diagnóstico

O melanoma tem apresentações muito heterogêneas, portanto seu diagnóstico não pode ser concluído apenas por sua localização ou suas características macroscópicas. Por ser comum em cavidade oral, dígito e leito ungueal, deve ser considerado nos diagnósticos diferenciais para neoplasias nestas regiões, mas muitos outros tumores agressivos, como carcinomas, mastocitomas e sarcomas pouco diferenciados, também podem ocorrer nesses sítios (PRZEŹDZIECKI; CZOPOWICZ; SAPIERZYŃSKI, 2015). A pigmentação enegrecida, apesar de ser tipicamente associada ao melanoma, pode levar a um diagnóstico presuntivo errôneo. O melanocitoma e outros tumores benignos da pele e seus anexos podem apresentar pigmentação, enquanto os melanomas, principalmente na forma oral, podem ser despigmentados (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Dessa forma, técnicas mais específicas devem ser utilizadas para a confirmação da origem tumoral.

2.1.4.1 Citopatologia e imunocitoquímica

A citopatologia é um método de triagem rápido, barato e fácil de se realizar, sem grandes riscos para o paciente, utilizada como o método primário para a triagem de neoplasias em muitos casos, incluindo melanoma. Esse método também pode ser utilizado para a pesquisa de metástases em pacientes previamente diagnosticados. O diagnóstico rápido pode auxiliar na tomada de decisões terapêuticas e cirúrgicas (HALL *et al.*, 2013; PRZEŹDZIECKI; CZOPOWICZ; SAPIERZYŃSKI, 2015).

Os achados citomorfológicos gerais são altamente variáveis, devido ao alto pleomorfismo. O citoplasma dos melanócitos tumorais pode apresentar variação de tamanho e formato, com aspecto de células epitelioides, fusiformes ou arredondadas e coloração basofílica discreta a intensa. Seus núcleos podem ser centrais ou excêntricos, arredondados a ovais, regulares ou indentados, com cromatina densa ou finamente granular, frequentemente apresentando nucléolos evidentes com variação numérica e de formato. A relação núcleo: citoplasma varia conforme a apresentação citológica do tumor, mas frequentemente é alta. Figuras de mitose típicas e atípicas podem estar presentes (DENICOLA, 2009; JERGENS; HOSTETTER; ANDREASEN, 2016; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

A principal característica distintiva do melanoma na citologia é a presença do pigmento de melanina, que se apresenta como granulação enegrecida, que pode ter discreta variação de cor azulada a esverdeada. Esses grânulos podem ser finos e puntiformes ou grosseiros. Há variação na quantidade de grânulos entre tumores e mesmo entre células em uma mesma lâmina. Por vezes, a maioria das células pode ser despigmentada. Assim, quando se suspeita de melanoma, é necessária uma pesquisa minuciosa pelo pigmento intracelular (DENICOLA, 2009; JERGENS; HOSTETTER; ANDREASEN, 2016; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Os melanomas não tendem a causar um processo inflamatório intenso a menos que haja ulceração, logo células inflamatórias ao fundo não são esperadas em abundância. Quando presente, a inflamação tem caráter crônico e se distingue por apresentar macrófagos fagocitando melanina, também chamados de melanófagos. Estes podem ser de difícil diferenciação de melanócitos pigmentados, mas usualmente apresentam melanina mais escassa em seu citoplasma e características distintivas, como vacúolos citoplasmáticos e o núcleo característico dos macrófagos

(MESSICK, 2009; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002; TYLER; COWELL; MEINKOTH, 2009).

Uma grande utilidade da citopatologia é a detecção de metástases pela coleta de amostra de linfonodos regionais. Nestes sítios, a morfologia celular costuma concordar com o observado nos tumores primários, e a presença de células atípicas espalhadas ou aglomeradas em pequenos focos em meio às células linfoides sugere um diagnóstico de metástase. A presença de melanófagos no linfonodo não deve ser considerada diagnóstica para melanoma, visto que eles podem estar presentes em outras lesões pigmentadas, sendo necessário identificar as células neoplásicas antes de afirmar um diagnóstico. A citologia também pode ser utilizada para a detecção de metástases em outros órgãos e em efusões cavitarias (HALL *et al.*, 2013; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

A maior limitação da citopatologia para melanomas é que estas neoplasias são muito heterogêneas e frequentemente pouco diferenciadas, principalmente os melanomas amelanóticos, e suas células frequentemente mimetizam outras neoplasias. Em tumores orais e de dígito, um alto grau de pleomorfismo celular e nuclear indica o melanoma como um forte diferencial, mas o diagnóstico pode ser mais complicado se a neoplasia surge em sítios anatômicos menos comuns. Em melanomas amelanóticos e muito pleomórficos, a citologia frequentemente não pode concluir um diagnóstico mais específico do que neoplasia indiferenciada, dificultando a tomada de decisões mais precocemente (DENICOLA, 2009; JERGENS; HOSTETTER; ANDREASEN, 2016; PRZEŹDZIECKI; CZOPOWICZ; SAPIERZYŃSKI, 2015; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Uma ferramenta em potencial para auxiliar em casos mais indiferenciados é a imunocitoquímica. A marcação de lâminas citológicas com anticorpos para marcadores específicos de melanoma, como o melan-A, associado a anticorpos para excluir outros tumores, como anti-citoqueratina para tumores epiteliais, pode aumentar consideravelmente a possibilidade de concordância com o diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico, sendo um método menos invasivo que pode ser realizado antes do procedimento cirúrgico. Apesar disso, a imunocitoquímica não é comumente utilizada, sendo mais comum a confirmação de diagnóstico pela histopatologia e imuno-histoquímica (PRZEŹDZIECKI; CZOPOWICZ; SAPIERZYŃSKI, 2015).

2.1.4.2 Histopatologia

A histopatologia para melanomas é a ferramenta mais utilizada tanto para o diagnóstico diferencial dos tumores melanocíticos benignos e malignos, quanto para a determinação de prognóstico (FONSECA-ALVES *et al.*, 2021).

Na avaliação histomorfológica do melanoma, é possível observar alguns tumores restritos à região submucosa e outros que apresentam crescimento a partir da submucosa e invadindo a epiderme (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). As características histológicas clássicas do melanoma que permitem a sua identificação são a presença de melanina intracitoplasmática, morfologia celular altamente variável dentro da mesma massa tumoral, infiltração e crescimento pagetoide, atividade juncional e a presença de núcleo com cromatina finamente granular e nucléolo evidente, central e aumentado, chamado de “olho de coruja”. (SMEDLEY *et al.*, 2022). Devido ao alto grau de pleomorfismo celular, a morfologia pode ser bastante variável, e há numerosas descrições de forma e quantidade de citoplasma, formato e tamanho de núcleo, padrões de cromatina e quantidade de nucléolos (ROLIM *et al.*, 2004). Critérios que também precisam ser avaliados por seu potencial prognóstico são o pleomorfismo nuclear, o índice mitótico, o grau de pigmentação do tumor, a presença de invasão vascular e a presença de ulceração (BERGIN *et al.*, 2011; FONSECA-ALVES *et al.*, 2021).

É possível classificar os melanomas conforme a sua morfologia celular. Melanomas de células epitelioides apresentam células mais arredondadas e bem-definidas, arranjadas em agrupamentos sólidos ou ninhos, com citoplasma abundante, núcleos grandes e nucléolos proeminentes, frequentemente apresentando crescimento pagetoide e atividade juncional. Melanomas de células fusiformes apresentam células em arranjos entrelaçados, com núcleos frequentemente maiores com nucléolos mais proeminentes, e crescimento pagetoide não é comumente observado. Quando são observadas características de ambos os tipos, o tumor é classificado como misto. Não há consenso sobre a forma mais comum, mas os melanomas fusiformes são mais incomuns do que os epitelioides e os mistos (RAMOS-VARA *et al.*, 2000; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002)

Há outras classificações morfológicas dos melanomas, mas estas são raras ou restritas a certos sítios anatômicos. O melanoma de células dendríticas, por exemplo, é restrito a melanomas cutâneos e frequentemente apresenta

comportamento benigno. Melanomas de células claras ou balonosas, de células em anel de sinete ou de morfologia adenoide papilar também já foram descritos em pequenos animais (RAMOS-VARA *et al.*, 2000; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

O diagnóstico dos melanomas indiferenciados tende a ser mais complicado, devido à ausência de melanina e ao pleomorfismo celular intenso, podendo se confundir com outras neoplasias mesenquimais, epiteliais e de células redondas (SMEDLEY *et al.*, 2011). A presença de epitélio íntegro na peça submetida para a histopatologia aumenta as chances de diagnóstico, pois há maior probabilidade de encontrar achados característicos, como células neoplásicas na junção entre a derme e a epiderme e o padrão de crescimento pagetoide. Células infiltrando a epiderme também tendem a apresentar mais marcadores melanocíticos na superfície, auxiliando no diagnóstico imuno-histoquímico (SMEDLEY *et al.*, 2022).

A histopatologia pode ser realizada dos linfonodos regionais ou de outros tecidos para a pesquisa de metástases. Em tecidos linfoides, é importante a diferenciação dos melanócitos neoplásicos e dos melanófagos, vistos com certa frequência em linfonodos submandibulares de cães com mucosas orais pigmentadas (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). A diferenciação entre melanófagos e melanócitos neoplásicos pode ser dificultada pela abundante melanina citoplasmática que impede uma avaliação mais detalhada das características citológicas, mas tanto o clareamento quanto o uso pareado de marcadores imuno-histoquímicos para diferenciar histiócitos e melanócitos podem ser úteis (PHILIPONE *et al.*, 2007).

2.1.4.3 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é uma ferramenta que pode auxiliar no diagnóstico e na avaliação prognóstica de tumores. Em melanomas orais indiferenciados, ela pode ser necessária para confirmação da origem melanocítica do tumor, auxiliando na diferenciação entre melanomas amelanóticos e outros tumores pouco diferenciados na cavidade oral. Ela também pode ser utilizada para avaliar o grau de proliferação e o comportamento agressivo do tumor (BERGIN *et al.*, 2011; FONSECA-ALVES *et al.*, 2021). Existem diversos marcadores que podem ser utilizados para o diagnóstico de melanoma em veterinária, tais como melan-A, tirosinase, S100 e o PNL-2.

O marcador melan-A, também chamado de MART-1, é uma proteína citoplasmática comumente utilizada para o diagnóstico de melanomas. Ele é considerado altamente específico, ausente em até 100% dos tumores não melanocíticos caninos, e um dos mais sensíveis, presente em 82% dos casos de melanoma (SMEDLEY *et al.*, 2011). Em humanos, alguns tumores não melânicos raros, como os tumores adrenais e das gônadas, podem expressar melan-A (WEINSTEIN *et al.*, 2014). Melan-A tende a ser mais sensível na detecção do melanoma primário do que nos metastáticos (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

A tirosinase é uma enzima citoplasmática que participa na diferenciação do melanócito e é crucial para a síntese de melanina. É considerada uma proteína bastante específica, porém de baixa sensibilidade em cães (SMEDLEY *et al.*, 2011). Dessa forma, sua maior utilidade seria para diferenciar tumores melanocíticos de sarcomas de tecidos moles pouco diferenciados (SMEDLEY *et al.*, 2022).

As proteínas da família S100 são proteínas ligadoras de cálcio com funções diversas nas células, como crescimento, regulação do ciclo celular e dos componentes do citoesqueleto, homeostase do cálcio, motilidade e respostas inflamatórias, e não é bem esclarecido se há uma função específica na melanogênese. Em humanos, são altamente sensíveis (97 a 100%), mas em cães sua sensibilidade é menor, estando em torno de 80%. Apesar de seu uso, é bastante inespecífica, pois essas proteínas estão presentes em células normais, como as células de Schwann, os condrócitos, os leucócitos, as células mioepiteliais, os adipócitos e as células de Langerhans, bem como em tumores derivados dessas células (BRESNICK; WEBER; ZIMMER, 2015; GONZALEZ; GARRIE; TURNER, 2020). Para diferenciar tumores melanocíticos de sarcomas de tecidos moles, sua sensibilidade foi de em torno de 20% (SMEDLEY *et al.*, 2011, 2022).

Um marcador cujo uso tem crescido é o PNL-2. Este anticorpo foi desenvolvido para a detecção de um receptor da somatostatina, porém se detectou sua capacidade de ligação em um antígeno melanocítico cuja estrutura ainda não foi elucidada. Em humanos, PNL-2 apresenta uma sensibilidade igual ou maior que a de melan-A, principalmente para a detecção de melanomas metastáticos e dos melanomas bucais que, como já mencionado, têm grande semelhança com os melanomas orais caninos. Em cães sua sensibilidade pode chegar a 90% e sua

especificidade a 100% (RAMOS-VARA *et al.*, 2000; ROCHAIX *et al.*, 2003; SMEDLEY *et al.*, 2011).

Outros marcadores classicamente utilizados para o diagnóstico de melanomas são o TRP-1, o TRP-2, o HMB45 e o MiTF. Os marcadores TRP-1 e TRP-2 são duas glicoproteínas que participam da melanogênese. Estudos demonstram que melanomas melanóticos e amelanóticos podem expressar ambas as proteínas com maior especificidade do que a proteína S100, atingindo até 100% de especificidade em alguns estudos, porém com menor sensibilidade (CHOI; KUSEWITT, 2003; SMEDLEY *et al.*, 2011). HMB-45 é o nome dado ao anticorpo capaz de detectar a glicoproteína gp100 presente em melanossomos, sendo considerado, de uma maneira geral, um marcador mais específico do que sensível para o diagnóstico de melanomas (YU *et al.*, 2005). MiTF é mais uma opção de marcador sensível expresso em células melanocíticas (CAMPAGNE *et al.*, 2013). Estes marcadores já foram detectados em melanomas caninos. TRP-1, TRP-2 e HMB-45 apresentaram alta especificidade, porém alta sensibilidade, enquanto MiTF apresentou alta sensibilidade, porém baixa especificidade (SMEDLEY *et al.*, 2011).

Numerosos marcadores mais novos vêm sendo testados em tumores melanocíticos caninos. O marcador RACK1 apresenta expressão aumentada em lesões melanocíticas quando comparadas a melanócitos normais, e seu padrão de distribuição na célula pode diferenciar lesões malignas e benignas (CAMPAGNE *et al.*, 2013). Um estudo in vitro demonstrou aumento da expressão de COX-2 em melanomas e isso está relacionado com a capacidade de proliferação, migração e invasão das células melanocíticas (SILVEIRA *et al.*, 2021). Recentemente, foi confirmada a expressão dos fatores de crescimento epidermais EGFR, HER2, HER3 e HER4, com indícios do papel de HER4 em vias de proliferação e de HER2 em vias de invasão (VELOSO *et al.*, 2020). Ainda, foi verificado que a frequência de células expressando galectina-3 intranuclear é menor em tumores mais agressivos do que em tumores benignos (GARCIA *et al.*, 2020).

Devido à grande heterogeneidade observada em melanomas e a variabilidade observada entre os resultados de diferentes marcadores, apenas uma marcação imuno-histoquímica pode não ser útil na confirmação do diagnóstico de melanomas. Uma solução é a associação de múltiplos marcadores. Coquetéis para a detecção de melan-A, PNL2 e TRP-1 e 2 estão disponíveis para uso comercial, aumentando a

sensibilidade e especifidade em comparação com o uso de cada marcador individualmente (SMEDLEY *et al.*, 2022).

2.1.4.4 Outros exames de apoio

Não são relatadas anormalidades específicas em exames de sangue, como hemograma e exames bioquímicos, ou em exames de urina. Quando presentes, alterações inespecíficas, como anemia e trombocitopenia, refletem o estado geral do paciente frente ao quadro sistêmico de câncer (CHILDRESS, 2012). Recentemente, a avaliação de índices inflamatórios de pacientes com melanoma demonstrou que a razão proteína-C-reativa: albumina sérica está correlacionada com um menor tempo livre de doença e de sobrevida geral, podendo ser um marcador prognóstico útil (GARCIA *et al.*, 2022).

Exames de imagem apresentam grande utilidade na avaliação de metástases para o estadiamento como também para o planejamento cirúrgico de melanomas. Radiografias podem ser utilizadas para a avaliação de metástases torácicas e a ultrassonografia pode ser utilizada para a detecção de metástases intra-abdominais. A tomografia computadorizada e a ressonância magnética são consideradas mais sensíveis, principalmente para a avaliação de invasão de tecidos adjacentes ao tumor e planejamento cirúrgico (XING *et al.*, 2011).

Após a morte do paciente, a necropsia de pacientes pode ser útil para avaliar a extensão da doença metastática e coletar material de órgãos internos para histopatologia. Da mesma forma que os tumores primários, neoplasias metastáticas podem apresentar grande variação de tamanho e apresentação, com massas bem-delimitadas e circunscritas a formas não encapsuladas e infiltrativas. Os tumores podem ser pigmentados ou não pigmentados, a depender da característica do tumor primário. Os principais sítios de metástase são os linfonodos regionais e pulmões, mas quaisquer órgãos viscerais, superfícies serosas e mesmo tecidos ósseos podem estar acometidos (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Muitos novos métodos de avaliação de melanoma estão sendo estudados em oncologia humana. Idealmente, considera-se que essas técnicas devem apresentar sensibilidade e especificidade alta em comparação com os métodos mais comuns, mas também devem ser mais rápidas e menos invasivas que as biópsias para os pacientes. Um grande interesse existe nas metodologias de diagnóstico não invasivo,

como a microscopia confocal de varredura a laser, porém ainda com muitas barreiras para sua total implementação em oncologia humana (AHLGRIMM-SIESS *et al.*, 2018). Não há previsão de implementação destes métodos em pacientes veterinários.

2.1.5 Tratamento

O tratamento considerado padrão-ouro é a excisão cirúrgica, independentemente da forma de melanoma. Como a dispersão intraepitelial e intraóssea é relatada nos melanomas, o recomendado é a ressecção com margens amplas, associada à linfadenectomia regional para evitar metástases pela via linfática. Na forma oral, pode ser necessária a mandibulectomia (FONSECA-ALVES *et al.*, 2021; RAMOS-VARA, 2011). A taxa de recidiva quando é preconizada a excisão total do tumor é menor que 10%, com uma taxa de sobrevida média de mais de dois anos em pacientes sem recidiva (TUOHY *et al.*, 2014). A associação de alguma modalidade de terapia sistêmica é recomendada para minimizar o risco de metástases (NISHIYA *et al.*, 2016).

A quimioterapia tende a ser ineficaz em aumentar o tempo de sobrevida nos cães (NISHIYA *et al.*, 2016). Uma possível forma de contornar isso é a eletroquimioterapia, uma modalidade terapêutica crescente em medicina veterinária. Ela consiste na aplicação de um campo elétrico no tumor para induzir a permeabilização da membrana celular e aumentar a entrada do quimioterápico nas células tumorais. Em melanomas orais caninos, bons resultados foram observados, especialmente em tumores menores que 4,0 cm e sem invasão óssea (TELLADO *et al.*, 2020).

Apesar de o melanoma ser tradicionalmente considerado um tumor resistente à radiação, a radioterapia tem sido associada ao tratamento para melanomas em cães com utilidade no controle da doença local e de metástases linfonodais (KHAN *et al.*, 2011). A associação da radioterapia com a quimioterapia pode reduzir a progressão tumoral e aumentar a sobrevida de maneira mais eficaz que a quimioterapia sozinha (CANCEDDA *et al.*, 2016) e a associação com a imunoterapia pode ter como alvo moléculas que participam das vias de resistência tumoral, aumentando a eficácia da radiação (KHAN *et al.*, 2011).

A imunoterapia é uma modalidade de tratamento em crescimento, sendo testada para diversos tumores, incluindo o melanoma. Essa modalidade de tratamento

baseia-se em evidências de que o sistema imune poderia modular a progressão e metástase do melanoma, e o uso de vacinas para a indução de imunidade contra os tumores é uma estratégia promissora para o tratamento (FONSECA-ALVES *et al.*, 2021; NISHIYA *et al.*, 2016; TARONE *et al.*, 2022).

Para ativar a imunidade, agentes biológicos e antígenos tumorais autólogos podem ser aplicados no ambiente intratumoral (NISHIYA *et al.*, 2016). Uma vacina antitumoral comercial baseada no uso de DNA humano codificando a tirosinase já foi desenvolvida para uso em melanomas caninos, mas sua eficácia é questionada (OTTNOD *et al.*, 2013; TREGGIARI; GRANT; NORTH, 2016). A vacina de células dendríticas autólogas ou heterólogas está sendo estudada devido à capacidade das células dendríticas em apresentarem antígenos tumorais para os linfócitos T e iniciarem a resposta imune (EREN *et al.*, 2021; TARONE *et al.*, 2022).

Outra estratégia utilizada na imunoterapia é a aplicação de citocinas com potencial anti-tumoral, como a interleucina-2 e os interferons, ou de células capazes de produzir essas citocinas no sítio tumoral. O uso dessas substâncias como adjuvantes na terapia poderia prolongar a vida de pacientes caninos com doença metastática. Entretanto, elas têm potencial de apresentar alta toxicidade (BARUTELLO *et al.*, 2018).

Em melanomas humanos, estudam-se hoje os anticorpos inibidores de checkpoint. As proteínas de checkpoint, com grande enfoque em PD-1, servem como um mecanismo de evasão imune quando expressas nas células tumorais. A aplicação de anticorpos capazes de diminuir a expressão dessas proteínas pode permitir a atuação do sistema imune na eliminação das células tumorais, apresentando sucesso em oncologia humana, inclusive para melanomas (GELLRICH *et al.*, 2020; SAHNI; VALECHA; SAHNI, 2018). Estudos recentes têm focado em compreender o papel das proteínas de checkpoint na tumorigênese em medicina veterinária (CASCIO *et al.*, 2021). Não foram conduzidos estudos *in vivo* para os melanomas orais caninos, mas estudos *in vitro* sugerem que a inibição da proteína B7-H3 possa reduzir a proliferação tumoral (TARONE *et al.*, 2019).

Outro campo a ser explorado é o uso de vacinas baseadas em vírus oncolíticos, com a capacidade de infectar e matar as células tumorais durante a sua replicação. Em veterinária, alguns grupos de estudo têm feito testes em diversos tumores com resultados mostrando potencial eficácia, incluindo em melanomas caninos (HWANG et al., 2013, 2016; IGASE et al., 2015, 2019).

2.1.6 Estadiamento e prognóstico

O sistema de estadiamento de melanomas caninos baseado na Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os tumores baseando-se no sistema TNM, ou seja, em seu tamanho e na presença de metástases nodais e distantes (BERGMAN, 2007). O Quadro 01 abaixo resume os critérios do sistema de estadiamento da OMS.

Quadro 01. Estadiamento de melanomas caninos segundo a Organização Mundial da Saúde.

Estágio	Tamanho (T)	Metástase nodal (N)	Metástases distantes (M)
Estágio 1	< 2,0 cm de diâmetro	Ausente (N0)	Ausente (M0)
Estágio 2	2,0 a 4,0 cm de diâmetro (T2)	Ausente (N0)	Ausente (M0)
Estágio 3	> 4,0 cm de diâmetro (T3)	Ausente (N0)	Ausente (M0)
	2,0 a 4,0 cm de diâmetro (T2)	Presente (N1)	
Estágio 4	Qualquer tamanho	Presente ou ausente	Presente (M1)

Fonte: Bergman (2007).

O sistema de estadiamento da OMS é considerado como uma base para a avaliação de prognóstico e sobrevida dos pacientes caninos, com alguns autores observando diferença significativa entre a sobrevida de cães de diferentes estadios. No entanto, este sistema apresenta as suas limitações como, por exemplo, não considerar o tamanho relativo entre o tumor e a raça do paciente em questão (BERGMAN, 2007). Alguns autores propuseram sistemas alternativos de classificação que utilizam a localização do tumor na cavidade oral e seu índice mitótico no estadiamento com mais valor prognóstico que o estadiamento da OMS. Contudo, este sistema não é utilizado em larga escala (HAHN *et al.*, 1994).

O melanoma de uma forma geral é considerado uma neoplasia com prognóstico desfavorável. O tempo de sobrevida após o diagnóstico é variável, mas tende a ser curto, com uma média relatada de aproximadamente 18 meses para pacientes em estágio I e de 3 a 6 meses para pacientes em estágios mais avançados (BERGMAN, 2007; RAMOS-VARA, 2011).

Muitas características do tumor devem ser avaliadas para uma avaliação prognóstica mais correta do melanoma. Em melanomas humanos, a expressão aumentada de uma série de marcadores imuno-histoquímicos, moleculares e sorológicos pode ser correlacionada com um maior tempo de sobrevida (WEINSTEIN *et al.*, 2014). Em medicina veterinária, um artigo de revisão sistemática concluiu que os fatores com maior correlação com o tempo de sobrevida são a presença de metástases distantes, a detecção de invasão linfática na histopatologia, o índice mitótico e o grau de atipia nuclear, o grau de pigmentação, a presença de ulceração, o nível de infiltração e a expressão de Ki67 (SMEDLEY *et al.*, 2022).

Características macroscópicas do tumor, como o seu tamanho, não foram significativamente avaliados na literatura. Apesar de serem considerados de alto valor prognóstico e serem teoricamente correlacionados com uma menor sobrevida, resultados conflitantes são reportados (SMEDLEY *et al.*, 2022). O tamanho do paciente não é considerado na avaliação do tamanho do tumor, o que pode justificar os resultados destoantes (BERGMAN, 2007).

A localização do melanoma é frequentemente considerada um fator prognóstico, visto que tumores envolvendo a cavidade oral, as junções mucocutâneas e o leito ungueal tendem a ter comportamento maligno e os tumores envolvendo a pele e o olho tendem a ter comportamento benigno (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Este fator não deve ser considerado isoladamente, visto que existem exceções à regra e outras características têm maior importância diagnóstica (SMEDLEY *et al.*, 2022).

Os prognósticos desfavoráveis associados ao melanoma canino ocorrem pela alta incidência de metástases, relatada em até 74% dos melanomas orais. Locais comumente afetados incluem os pulmões e os linfonodos regionais (RAMOS-VARA, 2011). Metástases viscerais tendem a ser associadas com um prognóstico desfavorável independentemente da localização anatômica (SMEDLEY *et al.*, 2022). O achado considerado padrão-ouro para determinar malignidade e risco de metástases é a presença de invasão sanguínea ou linfática na histopatologia (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Em melanomas humanos, a presença de metástases é considerada o fator preditivo mais significante de sobrevida (WEINSTEIN *et al.*, 2014).

As características citomorfológicas da neoplasia observadas na citologia e na histopatologia também são indicadores de malignidade, de um risco aumentado de

metástases e de menor sobrevida. Um alto grau de anaplasia é esperado em neoplasias malignas, incluindo cariomegalia, anisocariose, formatos irregulares de núcleo, hipercromasia, cromatina grosseira, nucléolos evidentes e múltiplos e presença de mitoses atípicas (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002; WEINSTEIN *et al.*, 2014). Dentre esses, o parâmetro mais bem correlacionado com o prognóstico é a atipia nuclear na histopatologia. Prognóstico desfavorável é associado à presença de mais de 30% de núcleos atípicos em melanomas orais e mais de 20% em melanomas cutâneos e de dígito (SMEDLEY *et al.*, 2022).

É importante avaliar a presença de pigmentação no tumor, mas nunca isoladamente. Em melanomas orais, a presença de mais de 50% de células pigmentadas tende a ser associada com um prognóstico mais favorável do que em tumores não pigmentados. Em tumores cutâneos, o alto grau de pigmentação e maior diferenciação celular também tendem a ser correlacionados com uma maior sobrevida (SMEDLEY *et al.*, 2022).

Não se recomenda considerar a presença de inflamação ou necrose como fatores determinantes de prognóstico, visto que não há critérios objetivos para a sua quantificação. Entretanto, a presença de ulceração é associada a um pior prognóstico nos melanomas cutâneos. Em melanomas orais, esse critério não é bem determinado (SMEDLEY *et al.*, 2022).

A classificação histológica e morfológica do melanoma é um prognóstico de difícil avaliação em uma população, devido à falta de padronização nos critérios de avaliação (SMEDLEY *et al.*, 2011). Maior risco de metástases já foi relatado em tumores classificados como mistos e epitelioides. Maior potencial de malignidade também foi observado quando são detectadas células nas camadas mais superficiais da epiderme (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

O índice mitótico avaliado na histologia é um fator bem correlacionado com a taxa de sobrevida nos melanomas, em especial nos cutâneos e oculares. O índice mitótico é considerado como o número de mitoses em 10 campos de 400x. Índices mitóticos superiores a 3 mitoses em tumores cutâneos e oculares e superior a 4 mitoses em tumores de mucosa são correlacionados com tempo de sobrevida mais curto (SMEDLEY *et al.*, 2011; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

O marcador Ki-67 é expresso em todas as fases do ciclo mitótico, mas não em células na fase G0, sendo um preditivo de proliferação tumoral. Sua avaliação é considerada um parâmetro objetivo, sendo recomendada para todas as

apresentações do melanoma, sendo particularmente útil em casos nos quais a histologia é inconclusiva (SMEDLEY *et al.*, 2022). A avaliação da expressão de Ki-67 apresenta alta correlação com a progressão tumoral e sobrevida dos cães com melanoma oral, com a média de células expressando Ki-67 em pacientes sendo em torno de 4 vezes maior em pacientes com sobrevida menor que um ano. A expressão do Ki-67 é considerada alta quando está acima de 15% em 500 células nos melanomas cutâneos e 19,5% em 500 células nos melanomas orais (BERGIN *et al.*, 2011; SMEDLEY *et al.*, 2022). Este marcador deve ser avaliado em conjunto com outros critérios histológicos, como atipias nucleares e índice mitótico, já que uma minoria de casos falsos-negativos e falsos-positivos podem ser observados quando a expressão de Ki-67 é avaliada isoladamente (LAPRIE *et al.*, 2001).

2.1.7 Cães como modelos para melanomas em humanos

O interesse no uso de animais de companhia naturalmente afetados por melanoma em estudos científicos é crescente devido às considerações éticas e às limitações no uso de modelos experimentais de laboratório. Muitas espécies apresentam risco de melanomas espontâneos, como os cães, gatos, equinos e suínos. Os cães são vistos como excelentes objetos de estudo, pois o melanoma é uma neoplasia relativamente comum nessa espécie, com grandes semelhanças com subtipos incomuns de melanomas humanos (NISHIYA *et al.*, 2016; PROUTEAU; ANDRÉ, 2019).

O interesse na oncologia comparativa aumentou depois que o sequenciamento do genoma canino demonstrou grande número de genes similares entre as espécies humana e canina, sugerindo que as informações obtidas para uma pudessem ser aplicadas para a outra (PAOLONI; KHANNA, 2007). Os tumores em cães e em humanos compartilham características como sua biologia, sua aparência histológica, sua genética e sua resposta ao tratamento. Além disso, há um maior interesse dos tutores em terapias avançadas e efetivas em oncologia veterinária, impulsionando novos estudos que eventualmente podem ser extrapolados para o estudo de tumores em humanos (COLOMBE *et al.*, 2022; TARONE *et al.*, 2022).

Os cães são considerados modelos pré-clínicos melhores do que os roedores, pois compartilham com os humanos do mesmo ambiente e da exposição a agentes carcinogênicos. Também apresentam tumores espontaneamente, com características

anatômicas, fisiológicas e mesmo imunológicas semelhantes aos humanos. Uma particularidade da espécie canina é a diversidade racial, que tem como vantagem mimetizar a diversidade genética humana (BARUTELLO *et al.*, 2018; PROUTEAU; ANDRÉ, 2019).

Em oncologia humana, muitos estudos focam nos melanomas cutâneos, por serem mais comuns, e menos estudos são dedicados aos demais subtipos desse tumor. Contudo, em cães, o melanoma cutâneo não é tão comum e apresenta etiopatogenia e comportamento biológico diferentes, tendendo a ser benigno e não dependendo de radiação UV. Por outro lado, melanomas oral e de leito ungueal caninos são relativamente comuns e compartilham similaridades citológicas, histomorfológica, moleculares e genéticas com os melanomas humanos que surgem nos mesmos locais (BARUTELLO *et al.*, 2018; PROUTEAU; ANDRÉ, 2019).

A forma oral é a mais comum dentre os melanomas caninos e diversas similaridades foram observadas entre eles e melanomas bucais humanos (NISHIYA *et al.*, 2016). Por exemplo, a mutação de BRAF, associada à radiação UV, é descrita nos melanomas cutâneos humanos, mas não nos melanomas bucais (EDWARDS *et al.*, 2004). Esta mutação também não é detectada consistentemente em melanomas caninos, que não costumam ser dependentes da exposição à luz (MOCHIZUKI *et al.*, 2015). Algumas diferenças já foram detectadas. As mutações em c-kit, por exemplo, podem ser detectadas em torno de 15% dos melanomas bucais humanos, mas não foram observadas em melanomas orais caninos (MURAKAMI *et al.*, 2011).

As outras neoplasias melanocíticas de cães também apresentam semelhanças com melanomas humanos que surgem nos mesmos sítios. Os melanomas de leito ungueal são a segunda neoplasia mais comum no dígito dos cães e apresentam comportamento agressivo, similarmente ao melanoma acral humano. Os melanomas oculares apresentam certas diferenças morfológicas, sendo mais comum a origem intraocular em cães e a origem na coroide em humanos, porém o comportamento das formas malignas é bastante semelhante entre as espécies. Até mesmo os melanomas cutâneos caninos podem ser considerados bons modelos para as variantes de melanomas cutâneos humanos não induzidos por radiação UV, que possuem um perfil mutacional distinto do observado nos melanomas UV-dependentes (PROUTEAU; ANDRÉ, 2019).

Os cães são considerados modelos valiosos para o estudo das variantes de melanoma não dependentes de UV em humanos, espécie onde são pouco comuns

(NISHIYA *et al.*, 2016). O fato de algumas raças apresentarem a predisposição ao desenvolvimento dessa neoplasia pode demonstrar um fundo genético em sua etiologia, e o perfil de mutações detectado em cães pode direcionar os futuros estudos em melanomas humanos. Além disso, a menor expectativa de vida dos cães permite a avaliação dos resultados em menor prazo do que em estudos populacionais com humanos (PROUTEAU; ANDRÉ, 2019).

Pesquisadores médicos e médicos veterinários concentram esforços nas pesquisas com melanoma devido a sua grande importância em ambas as áreas, e diversas revisões são publicadas reunindo os avanços mais recentes sobre o assunto (FONSECA-ALVES *et al.*, 2021; NAIK, 2021; SMEDLEY *et al.*, 2022; TYRRELL; PAYNE, 2018). O desenvolvimento de melhores métodos diagnósticos e tratamentos mais efetivos é desejável para ambas as espécies, devido à alta resistência aos tratamentos convencionais e a seu prognóstico desfavorável. Estudos realizados na espécie canina podem levar a um grande benefício para pacientes humanos acometidos pelas variantes pouco comuns do melanoma e vice-versa, pois devido a suas semelhanças, técnicas diagnósticas e terapias desenvolvidas e validadas para uma espécie provavelmente poderão ser utilizadas com boas expectativas de sucesso para a outra (BARUTELLO *et al.*, 2018; COLOMBE *et al.*, 2022; TARONE *et al.*, 2022).

2.2 BIÓPSIA LÍQUIDA

2.2.1 Conceitos

Com o profundo impacto social e econômico do câncer, há crescente interesse em desenvolver técnicas para o seu diagnóstico precoce e o monitoramento contínuo de sua evolução visando garantir o melhor prognóstico aos pacientes (“The global challenge of cancer,” 2020). Grande enfoque tem sido dado à medicina de precisão, com a caracterização molecular dos tumores sendo utilizada para determinar tratamentos específicos e adaptados a cada caso (CHIBUK *et al.*, 2021; KRZYSZCZYK *et al.*, 2018). Por tais motivos, observa-se um crescente interesse da comunidade científica na biópsia líquida.

A biópsia líquida é definida como qualquer teste realizado em uma amostra de sangue para detectar CTCs ou ctDNA, e ela pode ser usada para detecção precoce de neoplasias, planejamento e monitoração de tratamento e acompanhamento da

evolução do câncer pela avaliação seriada de múltiplas amostras (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2014). Apesar dessa definição, deve-se considerar que o termo “biópsia líquida” atualmente é mais abrangente. Os analitos circulantes podem englobar, além das CTCs e do ctDNA, as vesículas extracelulares (EVs), o RNA circulante, as plaquetas educadas por tumores (TEPs) e uma série de proteínas e metabólitos (HEITZER *et al.*, 2019; IGNATIADIS; SLEDGE; JEFFREY, 2021). Além disso, a biópsia líquida pode ser realizada de quaisquer outros líquidos corporais além do sangue, como urina, efusões cavitarias, líquor, saliva, suco gástrico, bile e até mesmo nas fezes, e a presença dos biomarcadores tem correlação com o sítio acometido pelo tumor (FLEISCHHACKER; SCHMIDT, 2007; IGNATIADIS; SLEDGE; JEFFREY, 2021).

O interesse da comunidade científica em biópsia líquida pode ser observado pelo crescente número de estudos publicados em bases de dados envolvendo biópsia líquida e termos relacionados (DOMÍNGUEZ-VIGIL *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2021). Muitos destes estudos buscam comprovar as potenciais aplicabilidades diagnósticas e prognósticas da biópsia líquida, tais como: distinguir pacientes oncológicos e saudáveis pela presença de biomarcadores tumorais circulantes; caracterizar o perfil tumoral e sua heterogeneidade pela detecção de alterações ausentes no tumor primário, mas presentes nos biomarcadores circulantes; detectar marcadores moleculares e proteínas tumorais para prever a resposta à imunoterapia; e acompanhar a resposta ao tratamento e da evolução do tratamento pela quantificação dos biomarcadores, entre outros (MARTINS *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2017).

Apesar dos bons resultados, ainda há muitos desafios para a implementação em larga escala de biópsia líquida. Os métodos ainda são pouco disponíveis e precisam de alta sensibilidade e especificidade, devido à baixa quantidade e curta meia-vida dos biomarcadores na circulação. Há uma grande variedade de metodologias e a falta de padronização de técnicas, dificultando a comparação entre os resultados encontrados nos diferentes estudos. Por fim, ainda há carência de estudos de larga escala que confirmem a sua aplicabilidade no ambiente clínico (ALIX-PANABIÈRES, 2020; IGNATIADIS; SLEDGE; JEFFREY, 2021; ROSSI; IGNATIADIS, 2019).

Em medicina veterinária, o cenário é mais escasso. Pesquisas estão sendo realizadas e vêm demonstrando resultados promissores (CHIBUK *et al.*, 2021;

COLOMBE *et al.*, 2022). Entretanto, a necessidade de adaptação de metodologias, sua comprovação em estudos em larga escala, o custo-benefício das técnicas e a necessidade de um processo de extensa educação dos veterinários a respeito das reais aplicações da biópsia líquida são obstáculos a serem superados para a sua aplicação (CHIBUK *et al.*, 2021)

Nas próximas seções, serão abordadas as utilidades em potencial da biópsia líquida, as diferentes metodologias existentes, os desafios observados e um panorama atual da aplicabilidade da biópsia líquida em medicina e medicina veterinária.

2.2.2 Biópsia líquida e biópsia tecidual convencional

O primeiro passo para compreensão da biópsia líquida é a sua comparação com a biópsia tecidual convencional. Atualmente, a biópsia tecidual é o padrão-ouro para diagnóstico de neoplasias. Além disso, a excisão completa do tumor é desejável por servir tanto para diagnóstico quanto para o tratamento inicial (DOMÍNGUEZ-VIGIL *et al.*, 2018; STROMBERG; MEUTEN, 2017). Quando comparada a outros métodos diagnósticos para a detecção de malignidade em tumores de partes moles, sua sensibilidade pode chegar até 100% contra 75,4% e 80,7% para a biópsia incisional e a punção aspirativa por agulha fina, respectivamente. Para o diagnóstico preciso de grau e subtipo, chega a 100% contra 33,3% e 45,6% (KASRAEIAN *et al.*, 2010).

Mesmo sendo o padrão-ouro, a biópsia tecidual convencional apresenta suas limitações. Por se tratar de um procedimento cirúrgico, pode ser invasivo e delicado para pacientes oncológicos, que muitas vezes já estão debilitados. Em casos de tumores metastáticos, múltiplas cirurgias são necessárias para a coleta e a avaliação de todas as massas, aumentando o custo e o risco ao qual o paciente é submetido. Além disso, alguns tumores são de difícil acesso, sendo necessário avaliar o custo-benefício de uma cirurgia nesses casos (CREE, 2015; DOMÍNGUEZ-VIGIL *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2017).

Outra limitação importante é que a amostra obtida em uma biópsia excisional é considerada estática, limitada ao momento de excisão e ao sítio de onde foi obtida. Contudo, o câncer é uma doença sistêmica e em contínua transformação. A heterogeneidade entre os tumores primários e metastáticos já foi estabelecida, e os clones que surgem após a excisão do tumor inicial podem apresentar comportamento

biológico diferente do original (CREE, 2015; DOMÍNGUEZ-VIGIL *et al.*, 2018). Com o crescente reconhecimento que dois tumores da mesma origem podem não ser exatamente iguais e podem responder diferentemente a tratamentos gerais, apenas a classificação histológica obtida na biópsia tecidual não é vista como suficiente para a medicina de precisão (BURNEY; LAKHTAKIA, 2017; KRZYSZCZYK *et al.*, 2018).

A biópsia líquida surge como uma excelente ferramenta complementar para suprir as limitações da biópsia tecidual. Para o paciente, representa uma técnica não invasiva, com coleta de baixo custo, já que é necessária apenas uma amostra de sangue, e com risco mínimo de complicações. Para os oncologistas, representa uma alternativa diagnóstica para se obter informações de tumores inacessíveis, avaliar a heterogeneidade e a progressão tumoral, selecionar o tratamento mais adequado conforme os marcadores encontrados e monitorar em tempo real a resposta dos pacientes (DOMÍNGUEZ-VIGIL *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2017).

A comunidade científica concorda que, atualmente, não há indícios que apontem a substituição da biópsia tecidual pela biópsia líquida. No entanto, a importância da biópsia líquida para os pacientes deve ser reconhecida e esforços devem ser feitos para que a técnica seja aperfeiçoada e difundida, e assim tanto os pacientes quanto os profissionais de saúde possam se beneficiar de suas aplicações (ALIX-PANABIÈRES, 2020; DOMÍNGUEZ-VIGIL *et al.*, 2018).

O quadro 02 a seguir compara a biópsia tecidual com a biópsia líquida e resume as vantagens e desvantagens de cada uma.

Quadro 02. Utilidades e limitações da biópsia tecidual e da biópsia líquida.

Técnica	Utilidades	Limitações
Biópsia tecidual	• Padrão-ouro para diagnóstico de neoplasias; • Útil para classificação morfológica e graduação histológica da lesão; • Quando excisional, também é útil como tratamento; • Avaliação imuno-histoquímica e caracterização do tumor sólido.	• Requer procedimento cirúrgico invasivo, com riscos para o paciente; • Múltiplas biópsias aumentam o custo e risco para o paciente; • Inviável para tumores em locais inacessíveis; • Amostra estática referente ao momento e sítio de coleta.
Biópsia líquida	• Coleta rápida, não invasiva, barata e indolor para o paciente; • Avaliação em tempo real da evolução do tumor; • Permite múltiplas coletas; • Fornece informações de tumores inacessíveis; • Determinação de tratamento personalizado e avaliação da resposta à terapia; • Avaliação de doença residual mínima e tempo de remissão; • Avaliação da heterogeneidade tumoral, por fornecer biomarcadores de múltiplos sítios.	• Necessidade de mais estudos em larga escala; • Grande variabilidade de metodologias e falta de padronização entre métodos; • Biomarcadores raros e de difícil detecção na circulação, precisando de grande volume de sangue e de técnicas avançadas e validadas; • Os resultados não devem ser interpretados da mesma forma entre diferentes tumores; • Tendem a ser mais úteis em estágios mais avançados do que em estágios precoces.

Fonte: O autor

2.2.3 Biomarcadores para biópsia líquida

Diversos analitos podem ser pesquisados para a realização de biópsia líquida. O analito mais comumente estudado é o ctDNA, seguido pelas CTCs. Hoje, no entanto, há numerosos estudos envolvendo outros analitos, como as EVs, o RNA tumoral circulante, as TEPs, proteínas e metabólitos tumorais (HEITZER *et al.*, 2019; IGNATIADIS; SLEDGE; JEFFREY, 2021).

O quadro 03 a seguir resume as principais vantagens e desvantagens de cada biomarcador de biópsia líquida. Os biomarcadores serão abordados em mais detalhes nas seções a seguir.

Quadro 03. Utilidades e limitações dos principais marcadores de biópsia líquida.

Técnica	Utilidades	Limitações
DNA-livre tumoral	• Tecnologias bem validadas e com fácil reprodutibilidade; • Correlação com o perfil mutacional e heterogeneidade tumoral; • Detecção de mutações pode ser utilizada na predição de resistência; • Grande foco de estudos em larga escala para sua validação em ambiente clínico.	• Baixas concentrações no sangue, especialmente em fase precoce; • Algumas mutações detectadas podem não ser relevantes por estarem em regiões intrônicas ou não alterarem as proteínas; • Não permitem estudos funcionais, morfológicos, transcriptômicos e proteômicos.
Células Tumorais Circulantes	• Tecnologias bem validadas e com fácil reprodutibilidade; • Correlação com o perfil mutacional e heterogeneidade tumoral; • Permitem ensaios funcionais, morfológicos, genômicos, transcriptômicos e proteômicos.	• Baixas concentrações no sangue, especialmente em fase precoce; • Alta fragilidade na circulação; • Alta heterogeneidade pode levar a falsos negativos; • Técnicas especializadas e de alto custo; • Falta de protocolos padronizados dificulta a avaliação dos resultados.
Vesículas extracelulares	• Abundantes na circulação; • Fornece grande quantidade de RNA; íntegro e proteínas para análise.	• Tecnologias em estágio muito inicial; • Técnicas especializadas e de alto custo; • Difícil purificação das vesículas.
Plaquetas educadas por tumores	• Abundantes na circulação; • Fornece grande quantidade de RNA íntegro e proteínas para análise; • Fácil isolamento.	• Tecnologias em estágio muito inicial; • Necessário identificar os perfis do câncer e das demais doenças; • Falta de protocolos padronizados dificulta a avaliação dos resultados.
RNAs livres	• Tecnologias bem validadas e com fácil reprodutibilidade • Avaliação do perfil transcriptômico pode fornecer informações mais relevantes do que o ctDNA.	• Baixas concentrações no sangue; • Alta instabilidade na circulação; • Falta de protocolos padronizados dificulta a avaliação dos resultados.
Proteínas	• Tecnologias bem validadas e com fácil reprodutibilidade; • Abundantes na circulação; • Marcadores classicamente utilizados em contexto clínico.	• Mais baixa sensibilidade e especificidade entre os marcadores estudados; • Ensaios em larga escala podem ser difíceis com as tecnologias disponíveis.

Fonte: O autor

2.2.3.1 DNA tumoral circulante

A presença de DNA livre circulante (cfDNA) no plasma é esperada em pacientes saudáveis. O cfDNA no plasma deriva principalmente de células apoptóticas no corpo, predominantemente de leucócitos (PANTEL; ALIX-PANABIÈRES, 2019). Apesar de o cfDNA ser estável em circulação, sua meia-vida é relativamente curta, de aproximadamente 2 horas, tendo excreção renal e hepática (HAN; WANG; SUN, 2017) O aumento da quantidade de cfDNA pode ser observado em uma série de condições patológicas e não patológicas, como exercício, inflamação, traumas, procedimentos cirúrgicos e em diversas neoplasias (FLEISCHHACKER; SCHMIDT, 2007).

Em pacientes oncológicos, o ctDNA corresponde a uma fração do cfDNA. Esta quantidade é variável, dependendo de fatores como carga tumoral, vascularização do tumor, sua taxa apoptótica e extensão de necrose. Usualmente é escassa, correspondendo a aproximadamente 0,01% ou menos dos alelos circulantes, principalmente na fase mais inicial da doença (IGNATIADIS; LEE; JEFFREY, 2015; PANTEL; ALIX-PANABIÈRES, 2019). Por derivarem primariamente de morte celular programada, os fragmentos de ctDNA costumam apresentar um tamanho relativamente estável, em torno de 180 bp (HEIDRICH *et al.*, 2021). Pelo processo de fragmentação, o ctDNA tende a ser menor que o DNA livre não tumoral, mas em alguns casos podem ser detectadas sequências mais longas, com mais de 1 kbp, que seriam derivadas de necrose e liberação direta do DNA na circulação sem a fragmentação (BARDELLI; PANTEL, 2017; HAN; WANG; SUN, 2017; JIANG; LO, 2016; MARTINS *et al.*, 2021).

O ctDNA é o analito mais estudado na biópsia líquida, com numerosos estudos voltados à sua quantificação e caracterização. A quantidade de DNA circulante total tende a se correlacionar com a carga tumoral, porém apenas a quantificação não é um parâmetro sensível, já que apenas uma pequena fração do cfDNA corresponde ao ctDNA (BRAIG *et al.*, 2019; FLEISCHHACKER; SCHMIDT, 2007; MARTINS *et al.*, 2021). Assim, o princípio mais interessante do ctDNA como um analito é a detecção e caracterização das mutações e defeitos genéticos que eles preservam das células tumorais (BARDELLI; PANTEL, 2017).

Duas estratégias principais podem ser utilizadas para o enriquecimento e análise do ctDNA. A primeira se baseia no uso de técnicas para a detecção de

mutações-alvo previamente conhecidas, que podem ser escolhidas a partir de um painel de mutações comuns ao tumor em questão ou pela análise genômica prévia de fragmentos do tumor primário. A segunda se caracteriza pelo sequenciamento em larga escala do ctDNA, sem a necessidade de conhecimento prévio das mutações (HAN; WANG; SUN, 2017; PANTEL; ALIX-PANABIÈRES, 2019; SIRAVEGNA *et al.*, 2017).

Dentre as técnicas voltadas para detecção de mutações-alvo, as primeiras metodologias utilizadas baseiam-se na PCR digital, onde há a compartimentalização da reação de PCR, permitindo a amplificação e detecção de até uma cópia do gene alvo. Outra técnica bastante difundida é o BEAMing, abreviação de *beads, emulsification, amplification and magnetics,* em que a PCR digital é associada à citometria de fluxo por meio do uso de microesferas magnéticas ligadas a sondas fluorescentes para a detecção das cópias amplificadas dos genes (DENIS *et al.*, 2017; O'LEARY *et al.*, 2019). Mais recentemente, foram desenvolvidas diversas técnicas baseadas em sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *new generation sequencing*) utilizando os painéis de mutações-alvo, permitindo que se atinjam sensibilidades altíssimas na detecção de mutações (GALE *et al.*, 2018; PHALLEN *et al.*, 2017).

Quando é feito o sequenciamento sem conhecimento prévio de mutações presentes na amostra, o NGS é aplicado no sequenciamento de todo o genoma ou o exoma. Os resultados então são comparados a um banco de dados de pacientes normais ou ao DNA obtido de células somáticas do próprio paciente para a detecção das sequências mutadas (HAN; WANG; SUN, 2017; SIRAVEGNA *et al.*, 2017). Esta análise é mais ampla e permite a detecção de cópias aberrantes dos cromossomos, assim como a detecção de alterações epigenéticas, como os padrões de metilação tumorais (LI *et al.*, 2017; PENEDER *et al.*, 2021; SONG *et al.*, 2017a).

Cada uma destas metodologias apresenta suas vantagens e desvantagens específicas. A detecção voltada para mutações-alvo conhecidas apresenta alta sensibilidade, podendo detectar o ctDNA em concentrações inferiores a 0,01% do cfDNA, porém para a sua realização é necessário conhecer previamente as mutações presentes ou esperadas para o tumor em questão. Já, o sequenciamento do genoma completo pode ser utilizado para investigar novas mutações, o que consequentemente pode levar à descoberta de novos alvos terapêuticos e genes relacionados à resistência em células que sobrevivem ao tratamento. Todavia, esta metodologia é

mais cara, demorada, trabalhosa e, principalmente, têm uma menor sensibilidade, somente detectando mutações presentes em pelo menos 1% dos alelos. Por sua menor sensibilidade, também necessitam de maior volume de sangue, o que muitas vezes não é viável para pacientes oncológicos. Os métodos são vistos como complementares e podem ser utilizados em conjunto (HAN; WANG; SUN, 2017; PANTEL; ALIX-PANABIÈRES, 2019; SIRAVEGNA *et al.*, 2017).

Numerosos estudos já foram realizados para avaliar a utilidade clínica do ctDNA. A presença de mutações e alterações epigenéticas tende a ser altamente concordante com as observadas no tumor primário em uma grande variedade de tumores humanos (BALAJI *et al.*, 2018; BERNARD *et al.*, 2019; KODAHL *et al.*, 2018). Portanto, a análise do ctDNA poderia ser útil para a avaliação do perfil mutacional em tumores onde a biópsia tecidual não pode ser realizada (BALAJI *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2021). Quando o paciente já tem metástases, o ctDNA reflete amplamente a heterogeneidade tumoral por se originar de múltiplos focos tumorais. Isso permite a avaliação do perfil mutacional sem a necessidade de múltiplas biópsias e a detecção de mutações somáticas que podem não estar presentes no foco primário (HEITZER *et al.*, 2019).

O ctDNA também tem suas limitações. A quantidade de ctDNA circulante pode variar conforme o estágio da doença, sendo menos numeroso na fase inicial, portanto sendo limitado para a detecção precoce de câncer. Também há variação com o tipo tumoral, visto que cada tumor libera o ctDNA em quantidades diferentes na circulação. Além disso, por se encontrar diluído do cfDNA, os métodos precisam de uma sensibilidade muito alta, principalmente para detectar mutações mais raras ou que estejam presentes em uma pequena quantidade de células (BALAJI *et al.*, 2018; SCHWAEDERLE *et al.*, 2016).

Numerosos testes para a análise de ctDNA foram aprovados pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização comercial. O primeiro destes a ser autorizado foi para a detecção da mutação do gene EGFR em carcinomas pulmonares de pequenas células, inicialmente utilizado em amostras tumorais parafinadas, mas adaptado para o uso em amostras de sangue (FDA, 2016). Desde então, diversos outros testes foram aprovados para a detecção de mutações e rearranjos em outros tipos tumorais, com o objetivo principal de personalizar e direcionar o tratamento conforme as alterações encontradas (FDA, 2020).

2.2.3.2 Células tumorais circulantes

No processo de desenvolvimento de metástases, uma série de eventos complexos precisa ocorrer até que o tumor colonize um sítio distante e se desenvolva, e a migração de CTCs é uma etapa fundamental (PANTEL; SPEICHER, 2016). A primeira identificação de CTCs foi feita por Ashworth[1] (1869 apud MOHAN; CHEMI; BRADY, 2017) no século XIX, quando células semelhantes às do câncer foram observadas na circulação sanguínea, e a partir de então esse processo foi proposto como parte do processo de disseminação do câncer.

As CTCs podem ser detectadas em diferentes estágios da doença e em diversas neoplasias (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016; MARTINS *et al.*, 2021). Esses biomarcadores são considerados altamente específicas, não sendo esperados em pacientes sem tumores malignos. Por seu papel na cascata metastática, são os únicos biomarcadores de biópsia líquida até então com possível potencial preditivo para o desenvolvimento de metástases (JEONG *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2017).

O entendimento convencional do que constitui uma CTC é uma célula positiva para algum marcador histoquímico que confirme sua origem tumoral, negativo para CD45 e com a morfologia distinta na circulação (LUSTBERG *et al.*, 2014). As CTCs caracterizam-se por serem bastante raras na circulação, liberadas em quantidades menores que 10 CTCs/mL de sangue, por vezes tão baixas quanto 1 CTC/mL, assim como por sua meia-vida bastante curta, de poucas horas na circulação, impondo desafios técnicos para a sua detecção (CHEN; BODE; DONG, 2017).

Por serem raras na circulação, o isolamento das CTCs depende de uma etapa inicial de enriquecimento para aumentar a sua concentração na amostra. O enriquecimento pode ser positivo, focando em selecionar as CTCs, ou negativo, focando em eliminar as demais células. Os métodos de enriquecimento se dividem em métodos imunológicos, baseados em afinidade a anticorpos seletivos, ou em métodos físicos, baseados em características físicas que diferem as CTCs dos leucócitos, como tamanho, deformabilidade, densidade ou carga elétrica (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016).

Os métodos de seleção imunológica utilizam anticorpos que detectam proteínas-alvo expressas na superfície das células e permitem a sua separação (ALIX-

[1] ASHWORTH, T.R. A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood after Death. **The Medical Journal of Australia.** v. 14, 146-147, 1869.

PANABIÈRES; PANTEL, 2016; ZHOU *et al.*, 2017). Métodos de seleção podem ser positivos, ou seja, as células isoladas são aquelas que possuem o marcador-alvo, ou negativos, ou seja, as células que possuem o marcador-alvo são eliminadas da amostra (LI *et al.*, 2020).

Os métodos de seleção imunológica positivos tendem a ser mais amplamente utilizados, já que o primeiro e até então único método aprovado pela FDA para o isolamento de CTCs, o método CellSearch® (Janssen Diagnostics, Bélgica), baseia-se nessa metodologia. Este método realiza a separação imunomagnética das CTCs, utilizando anticorpos contra o marcador EpCAM, presente em células epiteliais, conjugados a microesferas magnéticas. Quando aplicado um campo eletromagnético, as CTCs ligadas aos anticorpos são separadas da amostra e, em seguida, submetidas à marcação imunocitoquímica para a confirmação da presença das citoqueratinas e da ausência do CD45 leucocitário (CRISTOFANILLI *et al.*, 2004).

O CellSearch® foi aprovado para o uso nos carcinomas mamários, de próstata e colorretais, porém múltiplos estudos já confirmaram sua capacidade de detecção de CTCs em diversos outros carcinomas (SWENNENHUIS *et al.*, 2016). Esse método não é adequado para tumores mesenquimais, pois estes não expressam EpCAM naturalmente. Uma adaptação do método permitiu a detecção do marcador CD146, que está presente em melanomas (KHOJA *et al.*, 2015; RAO *et al.*, 2011).

Muitas limitações para o CellSearch® são relatadas. O principal questionamento é sua sensibilidade para a detecção de todas as subpopulações de CTCs, visto que essas células são sabidamente heterogêneas e, mesmo em carcinomas, podem deixar de expressar EpCAM durante o processo de transição epitélio-mesenquimal na cascata metastática. Ainda, este método não mantém as células viáveis, o que não permite sua aplicação em estudos envolvendo cultura celular (ALLARD *et al.*, 2004; ANDREE; VAN DALUM; TERSTAPPEN, 2016; LI *et al.*, 2020).

Outros métodos baseados em seleção magnética foram desenvolvidos buscando superar as limitações do CellSearch®. A metodologia MagSweeper utiliza um bastão recoberto de anticorpos para misturar a amostra de sangue e capturar as CTCs, apresentando uma sensibilidade maior e mantendo a viabilidade celular (POWELL *et al.*, 2012; TALASAZ *et al.*, 2009). O AdnaTest (QIAGEN, Alemanha), usa múltiplos anticorpos além do anti-EpCAM e associa a PCR digital para a ampla detecção de marcadores tumorais (ANDREOPOULOU *et al.*, 2011). Um método para

a captura *in vivo* de CTCs se baseia na introdução de um fio recoberto de anticorpos nos vasos sanguíneos do paciente, permitindo a análise de um volume maior de sangue rapidamente (SAUCEDO-ZENI *et al.*, 2012; VERMESH *et al.*, 2018).

A seleção positiva também pode ser realizada por métodos não magnéticos. Neste caso, as amostras são submetidas a um fluxo laminar e passam por dispositivos que associam a captura com base no comportamento hidrodinâmico das CTCs e a presença de anticorpos. O método CTC-chip foi o primeiro a se utilizar da estrutura do próprio dispositivo, contendo micropostes recobertos com anticorpos anti-EpCAM (NAGRATH *et al.*, 2007). Já, a metodologia IsoFlux (Fluxion Biosciences, EUA) se utiliza de microesferas recobertas de anticorpos que permitem a detecção de um ou mais antígenos tumorais para uso em ensaios moleculares (HARB *et al.*, 2013). Os dispositivos mais recentemente desenvolvidos utilizam nanotecnologia em sua composição para uma captura mais sensível das células (LOEIAN *et al.*, 2019). Estes métodos vêm apresentando bons resultados em diversas neoplasias (LI *et al.*, 2020).

As limitações dos dispositivos microfluídicos estão relacionadas com os custos de produção, com a velocidade de enriquecimento, com a identificação das CTCs e com a recuperação delas para outros ensaios. Quanto mais rápido o fluxo sobre a amostra, menor a eficiência de captura, logo se estima um tempo para análise de 1 hora para cada mL de amostra, tornando o processo lento. A remoção das células do dispositivo para ensaios genômicos é dificultada pela própria estrutura do dispositivo, e os dispositivos que usam análise por imagens sem remoção das células precisam de equipamento especializado. Por estes motivos, a sua aplicabilidade clínica ainda é limitada (LI *et al.*, 2020; LOEIAN *et al.*, 2019).

As CTCs também podem ser negativamente selecionadas, ou seja, pela captura e eliminação das células sanguíneas típicas. Neste caso, usualmente utiliza-se a seleção imunomagnética com anticorpos contra o marcador CD45 (YANG *et al.*, 2009), a centrifugação por gradiente de densidade (GUO *et al.*, 2018) ou mesmo o CTC-Chip (BURR *et al.*, 2022). As desvantagens desse método incluem a possível seleção de células circulantes não tumorais e que não expressam CD45, como fibroblastos ou células endoteliais descamadas, e a possível perda de CTCs em microêmbolos contendo leucócitos (LI *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2009). A associação da metodologia de hibridação é uma solução, pois permite a exclusão das células não tumorais diploides e a caracterização genômica das CTCs apresentando aneuploidias, aumentando a sua especificidade (LIN, 2015; LIN *et al.*, 2017).

A sensibilidade não só do CellSearch®, mas de todos os métodos imunológicos, é questionada, visto que as CTCs são sabidamente heterogêneas e muitas podem não expressar os anticorpos-alvo, sendo perdidas na análise. Os métodos baseados em propriedades físicas podem ser uma solução. As células tumorais possuem diversas características físicas que as diferenciam dos leucócitos. Elas tendem a ser maiores, possuindo uma média de tamanho de 15,6 µm em comparação com os leucócitos que costumam chegar a um máximo de 15 µm. Também possuem uma relação núcleo: citoplasma mais alta do que os maiores leucócitos e tendem a ter diferentes densidades (DOLFI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2020).

Os métodos que permitem a separação das células circulantes com base nas suas propriedades físicas, como densidade, tamanho e maleabilidade, carga elétrica ou comportamento hidrodinâmico, podem ser utilizados para a biópsia líquida independentemente de anticorpos. Muitos desses métodos mantêm as células intactas e viáveis, permitindo seu uso em estudos funcionais (LI *et al.*, 2020). Estudos comparando metodologias sugerem que as baseadas em características físicas tendem a detectar maiores quantidades de CTCs quando comparados ao CellSearch® (CHINEN *et al.*, 2013, 2014; SONG *et al.*, 2017b; SWENNENHUIS *et al.*, 2016)

Um dos métodos de enriquecimento mais simples e rápido é a centrifugação em um meio gradiente de densidade, que permite a separação dos tipos celulares em camadas isoladas. Neste método, as CTCs são isoladas com as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Há diversos meios disponíveis comercialmente, cada um com suas particularidades, dentre os quais o Ficoll®-Paque (GE Healthcare, EUA) é o mais simples (LI *et al.*, 2020). O meio OncoQuick (Greiner Bio-One, Alemanha) foi criado pensando na biópsia líquida, pois possui uma membrana permeável que permite uma menor retenção dos PBMCs, isolando as CTCs de maneira mais eficaz. Dessa forma, o Ficoll®-paque e o OncoQuick apresentam uma sensibilidade semelhante para a detecção de CTCs, porém o OncoQuick se torna mais específico ao diminuir a quantidade de leucócitos típicos remanescentes na amostra (GERTLER *et al.*, 2003; ROSENBERG *et al.*, 2002).

Outro método físico é a microfiltração do sangue. O método mais tradicional de microfiltração é denominado *Isolation by SizE of Tumor cells* (ISET) (Rarecells Diagnostics, França). Nesta metodologia, o sangue é hemolisado e filtrado por uma membrana de policarbonato calibrada com poros de 8 µM de diâmetro que retêm as CTCs e permitem a passagem dos leucócitos e demais restos celulares. As CTCs

então podem identificadas após coloração da membrana ou imunocitoquímica (VONA *et al.*, 2000). Novas adaptações da metodologia permitiram a melhora no processo de filtração como, por exemplo, pelo emprego de uma membrana tridimensional que minimiza o estresse e aumenta a viabilidade celular (ZHENG *et al.*, 2011). A sensibilidade de recuperação *in vitro* relatada com o uso da microfiltração pode chegar a 90% (DESITTER *et al.*, 2011).

A separação das células não só pelo seu tamanho, mas também por sua deformabilidade, pode permitir um melhor isolamento das CTCs que, em geral, são menos deformáveis do que as células sanguíneas, portanto tendem a passar mais lentamente em dispositivos microfluídicos (BAGNALL *et al.*, 2015). Com base nisso, foi desenvolvido um dispositivo microfluídico denominado Celsee PREP® 400 (Celsee Diagnostics, EUA), que captura CTCs em câmaras individuais e permite a passagem dos leucócitos por poros conforme o seu tamanho e deformabilidade. As CTCs são então analisadas por um sistema automatizado de imagem (RIAHI *et al.*, 2014). Esse sistema apresentou sensibilidade e especificidade de até 94% e 100%, respectivamente, para carcinomas metastáticos de mama, próstata e cólon, como também permitiu a análises celulares por imunocitoquímica, RT-qPCR e hibridação *in-situ* ao nível de uma única célula (GOGOI *et al.*, 2016).

A carga elétrica das CTCs tende a ser mais eletronegativa quando comparadas aos leucócitos, e é possível distingui-las e isolá-las pela aplicação de dieletroforese. Essa técnica poderia apresentar um estresse menor do que a pressão da microfiltração, capturando mais células viáveis (GUPTA *et al.*, 2012). Estudos detectam uma sensibilidade de recuperação de 90 a 95% das células quando aplicadas forças dieletroforéticas (GASCOYNE; SHIM, 2014).

Os dispositivos microfluídicos também podem ser utilizados para separar as CTCs de acordo com seu comportamento hidrodinâmico (CHO *et al.*, 2018). Sua separação pode ser realizada por obstáculos que separam as células conforme o seu tamanho (HUANG *et al.*, 2013), por inércia gerada em um fluxo em espiral (HOU *et al.*, 2013) ou até mesmo pela associação de ondas acústicas (LI *et al.*, 2015). Estudos testando estas metodologias obtiveram uma recuperação de células superior a 80% (LI et al., 2015; LOUTHERBACK et al., 2012).

Diversos estudos demonstram que os métodos de separação físicos apresentam maior sensibilidade para a captura de CTCs do que os métodos imunológicos, especialmente o CellSearch® (CHINEN *et al.*, 2013, 2014; GOGOI *et*

al., 2016; HOSOKAWA *et al.*, 2010). Entretanto, todos esses métodos estão sujeitos a suas limitações específicas. Por exemplo, os métodos baseados em tamanho, deformabilidade e densidade estão sujeitos a resultados falsos-negativos pela perda de CTCs menores ou menos densas que não são capturadas (CREE, 2015; LI *et al.*, 2020), os métodos de dieletroforese e de centrifugação por gradiente de concentração normalmente apresentam uma baixa pureza, e os métodos baseados em hidrodinâmica estão sujeitos à obstrução do dispositivo com facilidade. Independentemente do método escolhido, um desafio inerente aos métodos físico é a diferenciação das CTCs e dos leucócitos maiores, como monócitos ativados, caso não sejam empregados métodos para confirmação da origem celular, como a imunocitoquímica ou a análise molecular (LI *et al.*, 2020).

A combinação de métodos imunológicos e físicos para seleção de CTCs e exclusão de leucócitos é uma possível forma de aumentar a sensibilidade e a pureza do enriquecimento de CTCs. Por exemplo, o dispositivo GEDI-chip associa a exclusão baseada em tamanho com a seleção com anticorpos anti-PSA para carcinoma prostático e obteve resultados até 400 vezes superiores ao CellSearch® (KIRBY *et al.*, 2012), enquanto o dispositivo CTC-iChip associa a seleção imunomagnética com a exclusão baseada em hidrodinâmica, apresentando sensibilidade superior a 95% e utilidade para carcinomas e sarcomas (KARABACAK *et al.*, 2014).

Apesar de a quantificação de CTCs por si só ter utilidade em avaliação de prognóstico e monitoração terapêutica para alguns tumores, o maior potencial de aplicação das CTCs é a sua caracterização para uma melhor compreensão da heterogeneidade tumoral e para buscar alvos-terapêuticos. Para tal, as células devem ser separadas do dispositivo de captura e então utilizadas para estudos funcionais, citológicos e moleculares (CASTRO-GINER; ACETO, 2020; MARTINS *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2018).

O cultivo de CTCs *ex-vivo* para estudos funcionais é desafiador. Um passo crítico é manter as células viáveis durante o isolamento, já que muitas das técnicas mencionadas requerem uma fixação prévia ou exercem um grande estresse sobre elas, diminuindo a sua viabilidade. Modelos de cultura já utilizados incluem culturas em 2D, esferoides, organoides e os xenoenxertos. De uma forma geral, estudos funcionais são difíceis, pois os modelos de cultivo são pouco eficientes e requerem longos períodos para se estabelecerem. Entretanto, esses estudos têm grande utilidade para avaliar a evolução tumoral e a morfologia das subpopulações de CTCs

e, por aumentarem a população de células para testes, são fundamentais para avaliação da resposta a novas terapias (SHARMA *et al.*, 2018).

A análise citológica das CTCs é normalmente realizada por meio da imunocitoquímica. Muitos métodos de enriquecimento já têm uma caracterização imunológica durante a captura das CTCs, mas marcadores adicionais podem ser utilizados, objetivando principalmente identificar marcadores terapêuticos relevantes. Em métodos físicos, a imunocitoquímica é fundamental para a confirmação da origem celular (SHARMA *et al.*, 2018).

Tanto as CTCs capturadas quanto as CTCs cultivadas podem ser submetidas às análises moleculares, sejam elas ao nível de: genômica e epigenômica, pelo uso do NGS para sequenciamento e da hibridação in-situ para análise cromossômica; transcriptômica, pela RT-qPCR; e proteômica, pelo uso da espectrometria de massas. Embora seja possível a avaliação em massa das CTCs capturadas, a análise ao nível de uma célula é considerada mais interessante, pois permite a avaliação da heterogeneidade molecular, de seus diferentes perfis de clonalidade e de assinaturas genéticas que podem se correlacionar com a progressão e o risco de metástases. Entretanto, são possíveis falsos-negativos, pela escassez de amostra, e falsos-positivos, por sua baixa pureza. Além disso, as técnicas ainda estão em estágio rudimentar e são consideradas muito caras para sua aplicabilidade clínica (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016; CASTRO-GINER; ACETO, 2020; SHARMA *et al.*, 2018).

As CTCs apresentam grande potencial para aplicação na clínica oncológica. A quantidade dessas células na circulação parece aumentar com o estágio tumoral e é preditiva para sobrevida de pacientes com diversos tumores. Sabendo-se que elas estão envolvidas com o processo metastático, monitorá-las pode ajudar a predizer o risco de metástases. Sua redução durante o tratamento pode estar relacionada com uma boa resposta e prognóstico melhor para o paciente, enquanto o seu aumento pode indicar o desenvolvimento de resistência e início da recorrência da doença, sendo possível perceber este aumento antes do surgimento de uma nova massa. A heterogeneidade das CTCs pode permitir a detecção de marcadores de resistência ou susceptibilidade que não estão presentes no tumor primário (MARTINS *et al.*, 2021; ROSSI; IGNATIADIS, 2019; VASSEUR *et al.*, 2021).

As CTCs como biomarcadores têm suas limitações, e muito ainda precisa ser esclarecido antes de serem aplicadas consistentemente (ALIX-PANABIÈRES;

PANTEL, 2016; IGNATIADIS; LEE; JEFFREY, 2015; IGNATIADIS; SLEDGE; JEFFREY, 2021; VASSEUR *et al.*, 2021). As CTCs são extremamente raras na circulação e podem não ser detectadas mesmo em pacientes com metástases evidentes. Há uma ampla variedade de métodos e, até que ensaios clínicos em larga escala sejam conduzidos para a validação e padronização, a própria heterogeneidade das CTCs pode se tornar um problema, visto que células detectadas por um método podem não ser encontradas por outro (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016; IGNATIADIS; SLEDGE; JEFFREY, 2021). Com a evolução e o barateamento dos custos das técnicas moleculares, as CTCs acabaram em segundo plano nos estudos de biópsia líquida quando comparadas ao ctDNA e não têm sido amplamente utilizadas na clínica (CHIBUK *et al.*, 2021; HAN; WANG; SUN, 2017).

2.2.3.3 Vesículas extracelulares

Células normais e neoplásicas produzem e liberam vesículas extracelulares (EVs). Essas vesículas caracterizam-se por sua estrutura de membrana bilipídica e podem apresentar diferentes moléculas em seu interior, como proteínas, lipídios e ácidos nucléicos. Por serem aparentemente excretadas pelas células, inicialmente pensava-se que as carreavam substâncias indesejáveis para o meio extracelular, porém ganharam atenção depois que o seu papel de comunicação intercelular ganhou reconhecimento. Na progressão tumoral, há evidências que eles que atuem na angiogênese, na capacidade de invasão, na capacidade de evadir o sistema imune e na formação de metástases (OSAKI; OKADA, 2019).

Existem diferentes classificações de EVs que podem se diferenciar pelo seu tamanho, sua densidade e suas propriedades biológicas. Definições mais clássicas apontam que as duas principais EVs são: os exossomos, menores que 200 nm e produzidos no interior da célula, com liberação por exocitose; e as microvesículas, de tamanho entre 200 nm e 1.000 nm, produzidas e liberadas por brotamento (GURUNG *et al.*, 2021). No entanto, o consenso para mínimas informações necessárias para publicações com EVs preconiza evitar tais termos, porque não há uma forma confiável de confirmar como as EVs são produzidas, sugerindo a sua classificação por critérios mensuráveis e confiáveis, como por seu tamanho e densidade, pela presença de proteínas específicas em sua composição, pelas células de origem ou pelas suas funções (THÉRY *et al.*, 2018).

Muitas EVs tumorais são classificadas como exossomos ou EVs pequenas, sendo mais comumente estudadas. Recentemente, maior atenção tem sido dada aos chamados grandes oncossomos. Estas vesículas apresentam tamanho superior a 1.000 nm, podendo atingir até 10.000 nm, e podem conter uma carga maior de DNA tumoral e um perfil proteico e lipídico único em relação às EVs pequenas, portanto estão sendo apontadas como um novo alvo para estudos com EVs tumorais (CIARDIELLO *et al.*, 2020; PEZZICOLI *et al.*, 2020).

Com a descoberta de seu papel na progressão tumoral, as EVs passaram a ser vistas como potenciais biomarcadores para biópsia líquida (OSAKI; OKADA, 2019). O isolamento de EVs tumorais pode permitir a análise das moléculas em seu interior, particularmente dos ácidos nucléicos, para a detecção de mutações pela análise de mRNAs, esperados em maior quantidade nas EVs do que os fragmentos de ctDNA correspondentes na circulação, podendo facilitar sua detecção e análise (SIRAVEGNA *et al.*, 2017).

O enriquecimento de EVs se baseia em métodos que exploram suas características físicas e estruturais. Desta forma, as metodologias mais usualmente observadas para tal são baseadas em centrifugação, precipitação, filtração e separação por imunoafinidade, cada uma com suas vantagens e desvantagens (BU *et al.*, 2019; KONOSHENKO *et al.*, 2018).

A ultracentrifugação é o método mais comumente utilizado para o isolamento de microvesículas, por ser simples e barato, sem a necessidade de reagentes específicos. O plasma é inicialmente centrifugado em rotações mais baixas para a peletização de estruturas maiores e mais pesadas, como células e debris celulares, seguido pela ultracentrifugação. Quanto menores as estruturas-alvo, maior será a rotação necessária para o seu isolamento, comumente chegando a rotações superiores a 100.000 x *g*. Entretanto, este método é demorado, necessita de equipamento especializado e tende a gerar uma amostra impura, contaminada por proteínas plasmáticas e outros sedimentos. Novas etapas de ultracentrifugação podem aumentar a pureza, mas diminuem o rendimento da técnica. A força mecânica extrema gerada pela ultracentrifugação também pode danificar as EVs e alterar sua morfologia (BU *et al.*, 2019; KONOSHENKO *et al.*, 2018; PEZZICOLI *et al.*, 2020).

Para aumentar a pureza da ultracentrifugação, é possível utilizar um meio de separação de partículas por gradiente de densidade. A aplicação desta metodologia rende amostras com alto grau de pureza, sendo possível inclusive separar as EVs

pequenas de outras partículas minúsculas, como partículas virais, e há melhor preservação da estrutura das EVs. Entretanto, o uso dessa metodologia aumenta a complexidade, o preço e o tempo necessário para o isolamento das EVs, além de diminuir o rendimento quando comparado à ultracentrifugação convencional (BU *et al.*, 2019; KONOSHENKO *et al.*, 2018; MOON *et al.*, 2019).

As técnicas de precipitação também são amplamente utilizadas. Elas se baseiam no uso de substâncias fortemente hidrofílicas, que alteram a solubilidade da amostra, ou substâncias que alteram a carga elétrica da membrana das EVs, permitindo a sua agregação e diminuindo a sua solubilidade. Desta forma, é possível separar as EVs sem a necessidade de ultracentrifugação, de forma mais rápida e simples. Já há dispositivos comerciais disponíveis para esta metodologia e usualmente há um bom rendimento de amostra. A sua maior desvantagem, no entanto, é a contaminação com diferentes sedimentos que podem prejudicar a análise (BU *et al.*, 2019; KONOSHENKO *et al.*, 2018).

Dentre os métodos de filtração, a cromatografia por exclusão – ou filtração em gel – é um método baseado na hidrodinâmica das EVs e na sua capacidade de perfusão em um gel poroso. Diferentes estruturas terão diferentes velocidades de perfusão, permitindo a sua separação. Este método preserva a integridade das EVs e frequentemente rende amostras puras, devido à diferença de hidrodinâmica entre EVs e a maioria das proteínas. Alguns dispositivos comerciais baseados em cromatografia por exclusão estão disponíveis, mas são mais caros quando comparados aos demais métodos. Além disso, a amostra final fica diluída, rendendo uma quantidade pequena para a análise e sendo necessário associar outro método de concentração. Métodos menos utilizados para filtração incluem a ultrafiltração com membranas porosas de tamanhos sequencialmente menores e o uso de diálise hidrostática (BU *et al.*, 2019; KONOSHENKO *et al.*, 2018; PEZZICOLI *et al.*, 2020).

Por fim, a separação por imunoafinidade baseia-se no uso de anticorpos específicos voltados para moléculas presentes na superfície de EVs alvo, principalmente de seus receptores proteicos, podendo depois captá-las com o uso de microesferas magnéticas ou outros dispositivos com afinidade aos anticorpos selecionados. Essa abordagem permite uma grande pureza das vesículas extracelulares, além de ser mais simples e rápido do que os demais. Com esta técnica seria possível separar inclusive subpopulações de EVs entre si, como os grandes oncossomos. A principal desvantagem é o aumento do custo que o uso de anticorpos

gera em comparação aos métodos não imunológicos. Além disso, a impossibilidade de processar volumes maiores e uma menor eficiência de isolamento também são relatados (BU *et al.*, 2019; KONOSHENKO *et al.*, 2018; PEZZICOLI *et al.*, 2020).

Após o enriquecimento, as EVs podem ser analisadas e quantificadas por metodologias baseadas em dispersão de luz e movimento browniano, como a análise de rastreamento de nanopartículas e o espalhamento dinâmico de luz. A citometria de fluxo, além de se utilizar da dispersão de luz, pode ser associada ao uso de anticorpos fluorescentes para a caracterização das moléculas na superfície das EVs. Métodos de microscopia de varredura, como microscopia eletrônica e de força atômica, também podem ser utilizados (SZATANEK *et al.*, 2017; THÉRY *et al.*, 2018). As EVs também podem ser lisadas para a análise de seu conteúdo. As proteínas em seu interior são comumente analisadas por *western blotting*, mas espectrometria de massas e ELISA também podem ser utilizados. Para a análise do DNA, é preferencialmente utilizado o NGS. Já, para a análise de RNAs, utiliza-se a RT-qPCR (BU *et al.*, 2019; THÉRY *et al.*, 2018).

Há um interesse crescente nas aplicações potenciais das EVs. A análise de proteínas e ácidos nucléicos é apontada como um potencial método para o diagnóstico, não só de câncer, mas também de outras enfermidades (LIU *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2020). Foi demonstrado que marcadores tumorais podem apresentar perfis diferentes livres na circulação, em CTCs e no interior de EVs, e a comparação entre eles pode levar a uma análise mais completa do prognóstico (MARTINS *et al.*, 2021). Ainda, podem ser utilizados para predição e avaliação de resposta ao tratamento e a detecção de marcadores relacionados à resistência (GARNICA et al., 2020; ZHOU et al., 2020a).

A principal limitação para o uso de EVs é a falta da padronização de protocolos, principalmente quando são comparados diferentes líquidos biológicos. Isso inclui a validação de painéis de biomarcadores em larga escala para caracterização ampla de diferentes tumores. Metodologias mais específicas para separação de subtipos de EVs com maior pureza também são necessárias, já que diferentes EVs podem estar associadas a diferentes funções na progressão tumoral e na avaliação de prognóstico. Com as atuais metodologias disponíveis, os desafios a serem superados para melhor aplicabilidade das EVs na circulação incluem reduzir o volume de amostra necessário e a contaminação com outras moléculas durante o enriquecimento (ZHOU *et al.*, 2020).

2.2.3.4 Plaquetas educadas por tumores

Numerosas evidências apontam para o papel das plaquetas na progressão tumoral. Historicamente, os primeiros achados que sugeriram essa interação direta entre hemostasia e câncer foram a alta frequência de quadros espontâneos de hipercoagulabilidade em pacientes oncológicos e a presença de microêmbolos contendo elementos tumorais em pacientes com metástases (IN ’T VELD; WURDINGER, 2019). Tanto a quantidade quanto a morfologia plaquetária estão associadas ao prognóstico de neoplasias e até podem estar correlacionadas com a resposta ao tratamento (BEST; WESSELING; WURDINGER, 2018). As evidências da relação entre plaquetas e tumores despertou o interesse em seu estudo para o diagnóstico e monitoramento de neoplasias (POULET; MASSIAS; TALY, 2019)

As TEPs são plaquetas que sofreram alterações induzidas pelos tumores e passaram a apresentar um papel na progressão tumoral. Esse processo de “educação” das plaquetas pelo tumor pode ocorrer pela alteração da expressão de RNAs plaquetários em resposta a um estímulo tumoral ou pela captação de vesículas extracelulares contendo mRNA e proteínas tumorais pelas plaquetas (IN ’T VELD; WURDINGER, 2019; POULET; MASSIAS; TALY, 2019). Supõe-se que as TEPs possam participar de diversas etapas no processo metastático, mais notavelmente na sobrevivência das CTCs, ao se agregarem ao redor das células tumorais e protegerem-nas contra o estresse mecânico na circulação e o sistema imune do hospedeiro (ASGHAR; PARVAIZ; MANZOOR, 2019; VARKEY; NICOLAIDES, 2021).

As TEPs são consideradas importantes fontes de biomarcadores tumorais, principalmente ácidos nucléicos e proteínas, portanto um grande benefício em sua aplicação em biópsia líquida é que as plaquetas são abundantes na circulação quando comparadas com os demais biomarcadores, além de manter o RNA íntegro em seu interior (ANTUNES-FERREIRA; KOPPERS-LALIC; WÜRDINGER, 2021; IN ’T VELD; WURDINGER, 2019). Além disso, seu isolamento dos demais elementos sanguíneos para a análise é relativamente fácil, sendo feito comumente em exames de rotina (ANTUNES-FERREIRA; KOPPERS-LALIC; WÜRDINGER, 2021; NILSSON *et al.*, 2011).

O sangue para isolamento de TEPs deve ser coletado em tubo contendo anticoagulantes para inibir a ativação plaquetária, pois esse processo estimula a liberação de EVs e grânulos plaquetários (ANTUNES-FERREIRA; KOPPERS-LALIC;

WÜRDINGER, 2021). Tubos de EDTA podem ser mantidos por até 48h em temperatura ambiente até o isolamento plaquetário sem perder a qualidade. O procedimento para isolamento de plaquetas é simples, feito em duas etapas de centrifugação. Primeiro, o tubo é centrifugado por 20 minutos a 120 x *g*. O plasma rico em plaquetas é então separado cuidadosamente dos demais elementos para evitar contaminação com a capa leucocitária e centrifugado novamente por 20 minutos a 360 x *g* para a formação de um botão plaquetário. O plasma é removido e ressuspendido em RNAlater para preservação até o seu processamento (BEST; WESSELING; WURDINGER, 2018).

Após o isolamento das plaquetas, metodologias de biologia molecular ou de espectrofotometria de massas devem ser utilizados para avaliação do transcriptoma e do proteoma plaquetário, respectivamente (ANTUNES-FERREIRA; KOPPERS-LALIC; WÜRDINGER, 2021). A RT-qPCR é mais classicamente utilizada, porém o NGS em larga escala tem a vantagem de permitir a análise do perfil de mRNA sem conhecimento prévio dos alvos. O uso de algoritmos inteligentes permitiu a distinção entre pacientes saudáveis e pacientes com câncer com sensibilidade de 96% (BEST; WESSELING; WURDINGER, 2018). Similarmente, o proteoma plaquetário pode ser utilizado para diferenciar pacientes com câncer de pacientes saudáveis do mesmo sexo e idade, podendo inclusive retornar ao perfil esperado após a ressecção tumoral (SABRKHANY *et al.*, 2018), como também para diferenciar lesões benignas de malignas (LOMNYTSKA *et al.*, 2018).

A análise de TEPs tem os seus desafios. O transcriptoma plaquetário em pacientes saudáveis é relativamente estável, mas ele se encontra alterado em diversos estados patológicos além do câncer, portanto um dos focos na aplicabilidade das TEPs em biópsia líquida é identificar os perfis transcriptômicos de quadros neoplásicos e diferenciá-los de outras doenças (ANTUNES-FERREIRA; KOPPERS-LALIC; WÜRDINGER, 2021; BEST; WESSELING; WURDINGER, 2018). Há ainda falta de consenso nos métodos de coleta e processamento, o que pode dificultar a comparação dos resultados entre estudos e até mesmo entre diferentes biomarcadores. Por fim, também serão necessários estudos clínicos em larga escala antes que este biomarcador possa ser mais amplamente utilizado (ANTUNES-FERREIRA; KOPPERS-LALIC; WÜRDINGER, 2021).

2.2.3.5 RNA tumoral circulante

A avaliação do DNA e a presença de mutações por si só não são retratos confiáveis do perfil de expressão gênica do tumor. Neste ponto, a avaliação do RNA se torna muito mais interessante (SIRAVEGNA *et al.*, 2017). De uma forma geral, moléculas livres de RNA tendem a ser mais instáveis que o DNA em circulação, sendo preferível sua detecção e avaliação no interior das EVs e TEPs (BARDELLI; PANTEL, 2017). No entanto, algumas classes de RNA não codificante, mais notavelmente os micro-RNAs (miRNAs), apresentam maior estabilidade na circulação e são vistos como biomarcadores em potencial, podendo estar presentes em maior quantidade do que o ctDNA e as CTCs. Da mesma forma, a detecção de transcritos de mRNA é difícil, porém possível, e seu uso como biomarcador é considerado em alguns casos (DOMÍNGUEZ-VIGIL *et al.*, 2018).

MiRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificante que agem como moléculas reguladoras da expressão genética após a transcrição, capazes de regular a translação de mRNAs, tendo grande papel na transformação maligna e oncogênese (CHEUNG *et al.*, 2019; DOMÍNGUEZ-VIGIL *et al.*, 2018). Os miRNAs são a fração do RNA livre mais abundante no sangue, além de estarem presentes em EVs e TEPs (SIRAVEGNA *et al.*, 2017). Os padrões de expressão de miRNAs estão desregulados no câncer e aparentam ser específicos conforme a doença, podendo ser utilizados para diagnosticar e monitorar tumores (CHEUNG *et al.*, 2019; MITCHELL *et al.*, 2008).

A avaliação do mRNA circulante teria relevância clínica em avaliar o perfil transcriptômico e de expressão gênica dos tumores (SIRAVEGNA *et al.*, 2017). Alguns estudos conseguem correlacionar os níveis de mRNA circulantes com a presença de neoplasias, porém o seu uso como biomarcador é limitado, devido à sua baixa concentração, a sua instabilidade e à potencial contaminação da amostra com o RNA intracelular (CHEUNG *et al.*, 2019).

Diversas metodologias podem ser utilizadas para a detecção de RNA. A RT-qPCR é considerada o método padrão-ouro, mas metodologias de *microarray* e NGS para RNA podem ser utilizadas, esta última tendo a vantagem de não depender do conhecimento prévio das sequências-alvo (CHEUNG *et al.*, 2019).

A expressão diferencial de miRNAs já foi descrita em diversos tumores (DOMÍNGUEZ-VIGIL *et al.*, 2018). A detecção dos perfis alterados de RNA teria capacidade diagnóstica e prognóstica, e o perfil de miRNAs circulantes tende a

concordar com o observado no tumor primário (MARTINS *et al.*, 2021). Os mRNAs apresentam um melhor panorama do estado do genoma e da capacidade de transcrição das células tumorais (CHEUNG *et al.*, 2019).

O principal desafio do uso de RNAs é a qualidade da amostra. Os mRNAs são instáveis, logo o processamento deve ser feito muito rapidamente, e mesmo os miRNAs mais estáveis tendem a ter baixa reprodutibilidade devido a condições pré-analíticas inadequadas (LARSON *et al.*, 2021). A especificidade dos transcritos-alvo para câncer também deve ser esclarecida, visto que outras doenças não tumorais podem levar à apoptose de células normais e liberação de RNA na circulação (VONG *et al.*, 2021). De uma forma geral, as implicações clínicas do RNA livre não são claras e as análises destes biomarcadores ainda têm caráter experimental, com a necessidade de validação em larga escala (SIRAVEGNA *et al.*, 2017).

2.2.3.6 Proteômica

As proteínas plasmáticas são possivelmente os primeiros biomarcadores considerados para a biópsia líquida, tidas como potenciais biomarcadores para a detecção da presença e atividade de doença desde 1950 (LANDEGREN; HAMMOND, 2021; RIFAI; GILLETTE; CARR, 2006). Todavia, devido à alta complexidade do proteoma e de limitações nas tecnologias de análise proteômica quando comparadas às técnicas moleculares mais recentes, a análise de proteínas na biópsia líquida ficou em segundo plano, enquanto os outros biomarcadores ganharam mais visibilidade (DING *et al.*, 2022).

Exemplos de proteínas utilizadas classicamente na avaliação de câncer são o antígeno prostático específico (PSA), para os carcinomas de próstata, o CA-125, para o carcinoma ovariano, e o CA19-9, para o carcinoma pancreático. Estas proteínas são utilizadas para diagnóstico, monitoramento da resposta ao tratamento e do período de remissão (DING *et al.*, 2022). Contudo, existe uma alta taxa de falsos-positivos e falsos-negativos, visto que estas proteínas já estão presentes na circulação e podem estar aumentadas em outras condições (CHIBUK *et al.*, 2021; COLOMBE *et al.*, 2022). Por este motivo, supõe-se que marcadores proteicos de maior utilidade serão aqueles que estão em quantidades pequenas ou ausentes nos animais saudáveis. Sabe-se que as mutações tumorais podem levar à formação de proteínas aberrantes e neoantígenos tumorais que podem servir como alvos da biópsia líquida

(LANDEGREN; HAMMOND, 2021). Outras proteínas que já foram estudadas como potenciais alvos são as histonas, que poderiam estar aumentadas na circulação ao serem liberadas das células tumorais durante a morte celular (CHIBUK *et al.*, 2021).

Os testes mais convencionalmente utilizados na análise proteômica são baseados em afinidade para anticorpos, como o ELISA, a quimioluminescência e a IHC. Entretanto, não se sabe se esses testes possuem sensibilidade suficiente para a detecção de futuros marcadores descobertos que sejam mais raros na circulação do que os usados atualmente. Outro grande problema é a baixa desempenho desses testes para uma avaliação proteômica em larga escala, o que acaba limitando o seu uso (LANDEGREN; HAMMOND, 2021).

Apesar de não serem o maior foco atualmente, as proteínas na biópsia líquida ainda apresentam uma grande esperança no seu uso. A melhora do rendimento dos ensaios em proteômica é um objetivo de pesquisadores para que seu uso seja adotado em larga escala. Biobancos de amostras estão sendo implementados para ajudar a monitorar os valores em pacientes saudáveis e definir valores de referência normais frente a grande variedade genética e ambiental observada para resultados mais consistentes (LANDEGREN; HAMMOND, 2021).

2.2.3.7 Outros biomarcadores

Com o avanço da biópsia líquida, é esperado que novos marcadores sejam descobertos e seu significado clínico seja estudado. Teoricamente, qualquer produto tumoral poderia servir como marcador de biópsia líquida, sejam eles moléculas básicas, células associadas aos tumores ou mesmo subcelulares (DING *et al.*, 2022).

A metabolômica é uma via de estudo que está ganhando algum espaço na medicina oncológica de precisão. A avaliação do perfil metabólico poderia refletir o produto final das alterações transcricionais e translacionais do tumor de forma mais dinâmica que a proteômica ou a genômica. Aminoácidos específicos, proteínas, lipídios, carboidratos ou íons podem ser quantificados por espectrofotometria de massas, e seu aumento ou redução podem ser correlacionados com a progressão tumoral. Por estar ainda em fase inicial, este campo necessita de estudos em larga escala, mas alguns marcadores já foram significativamente correlacionados com carcinomas humanos, principalmente de origem pulmonar (MADAMA *et al.*, 2021).

Quando se falam de células associadas ao câncer e estruturas subcelulares, alguns estudos mostram o potencial desses novos alvos para a biópsia líquida. A identificação dos fibroblastos associados ao câncer circulando nos êmbolos tumorais junto às CTCs, por exemplo, pode indicar uma maior eficiência da metástase do que as CTCs isoladas (HURTADO; MARTÍNEZ-PENA; PIÑEIRO, 2020). A caracterização e quantificação de subpopulações de linfócitos pode estar associada a uma melhor resposta ao tratamento (LI *et al.*, 2021). A recente caracterização de mitocôndrias circulantes no sangue pode indicar um potencial marcador para estudos futuros nas estruturas subcelulares liberadas durante a apoptose tumoral (DING *et al.*, 2022; SONG *et al.*, 2020).

2.2.4 Aplicações da biópsia líquida

O interesse no estudo da biópsia líquida se deve às suas aplicações em potencial na medicina de precisão. Alguns marcadores já são utilizados na prática clínica em medicina humana para diversos tumores, enquanto outros são considerados ferramentas promissoras para um futuro próximo (MARTINS *et al.*, 2021). Exemplos de potenciais utilidades incluem a triagem e o monitoramento de câncer em populações de risco, o diagnóstico não invasivo, a avaliação em tempo real da progressão tumoral, a escolha da terapia com base nos marcadores-alvo de susceptibilidade e de resistência, o monitoramento em tempo real da resposta à terapia e a avaliação do período de remissão e risco de metástases (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016).

A detecção precoce de tumores em populações de risco é uma aplicação desejável da biópsia líquida, porém muito desafiadora. Algumas evidências podem apontar a utilidade da biópsia líquida nessa vertente. Por exemplo, a detecção de CTCs em pacientes com doença obstrutiva crônica foi preditiva para o desenvolvimento de carcinoma pulmonar (ILIE *et al.*, 2014). Apesar disso, sabe-se que a quantidade de marcadores é baixa nos estágios iniciais quando comparados à doença avançada, e eles podem estar ausentes mesmo em pacientes em estágios mais tardios (IGNATIADIS; SLEDGE; JEFFREY, 2021). A sensibilidade dos métodos disponíveis atualmente não é considerada suficientemente adequada para o contexto clínico devido ao risco de falsos-positivos e negativos, portanto sendo inválidos até o

momento para a triagem de câncer em um contexto não experimental (MARQUETTE *et al.*, 2020; VASSEUR *et al.*, 2021).

Em pacientes com tumores já estabelecidos, a biópsia líquida pode ser aplicada na predição de prognóstico pela quantificação dos biomarcadores. Maiores quantidades de ctDNA e de CTCs estão correlacionadas com maior agressividade da doença, maior risco de metástases e menor tempo de remissão após o tratamento. Esses dados devem ser interpretados com cautela, visto que diferentes tumores podem liberar quantidades diferentes de biomarcadores na circulação. Observa-se uma maior utilidade no monitoramento da progressão tumoral pela variação na quantidade de marcadores ao longo da doença do que na contagem basal no momento do diagnóstico (JEONG *et al.*, 2018; VASSEUR *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2017).

A biópsia líquida pode ser aplicada na monitoração da doença residual mínima e do risco de recorrência após a ressecção tumoral. Os níveis de ctDNA e a contagem de CTCs após o tratamento já foram correlacionados ao quadro de remissão, e níveis mais altos dos marcadores sugerem um menor tempo de livre da doença (BAYARRI-LARA *et al.*, 2016; BUTLER; SPELLMAN; GRAY, 2017; KILGOUR *et al.*, 2020; OLSSON *et al.*, 2015). Tanto uma quantidade mais alta dos marcadores quanto a sua persistência após o tratamento foram correlacionadas com uma resposta pior ao tratamento (CARPINETTI *et al.*, 2015; RACK *et al.*, 2014).

Nos pacientes em estágio avançado, a principal utilidade da biópsia líquida é a seleção de tratamento com base em marcadores preditivos de susceptibilidade e resistência. O ctDNA pode ser avaliado em conjunto com o DNA do sítio primário e a presença de mutações pode indicar a sensibilidade ao tratamento com medicações específicas (ROSSI; IGNATIADIS, 2019). A caracterização molecular das CTCs pode permitir a detecção de mutações e outras alterações ausentes no tumor primário, sendo uma alternativa não invasiva para acompanhar a evolução do perfil molecular e a heterogeneidade tumoral ao longo do tratamento. A presença de certas mutações pode auxiliar na predição de sensibilidade ao tratamento, e o surgimento de novas variantes celulares pode indicar desenvolvimento de resistência (VASSEUR *et al.*, 2021).

2.2.5 Limitações e desafios da biópsia líquida

Apesar de todas as suas possíveis aplicações na medicina precisional, a biópsia líquida ainda é uma tecnologia nova e com muitas limitações que precisam ser superadas para a sua aplicação em larga escala (ALIX-PANABIÈRES, 2020; HEIDRICH *et al.*, 2021).

A baixa concentração de biomarcadores nas amostras é uma limitação inerente à biópsia líquida. Uma das características mais desejadas dos métodos de detecção é a alta sensibilidade para minimizar o número de pacientes falsos-negativos (ATTARD; DE BONO, 2011). Mesmo com os recentes avanços técnicos, muitos métodos disponíveis ainda possuem um limite de detecção baixo, e os biomarcadores-alvo podem não ser detectados na amostra, especialmente nas fases mais precoces da doença (BARDELLI; PANTEL, 2017; FERNÁNDEZ-LÁZARO *et al.*, 2020). Normalmente, por conta dessa baixa sensibilidade, muitos testes acabam precisando de um alto volume de amostra (ANDREE; VAN DALUM; TERSTAPPEN, 2016; HEIDRICH *et al.*, 2021).

O ctDNA, por exemplo, corresponde a uma fração muito discreta do cfDNA e sua meia vida é bastante curta na circulação (HAN; WANG; SUN, 2017; IGNATIADIS; LEE; JEFFREY, 2015). O tipo tumoral e a fase da doença influenciam na quantidade de ctDNA disponível na circulação, tornando seu uso limitado em alguns tumores e em pacientes em estágio inicial (BALAJI *et al.*, 2018; SCHWAEDERLE *et al.*, 2016). Quando apenas um gene-alvo é testado, a sensibilidade do teste tende a ser muito baixa, devido à heterogeneidade do tumor e suas mutações (REINERT *et al.*, 2019). Idealmente, considera-se que um ensaio de ctDNA deva detectar consistentemente mutações em até 0,1% dos alelos plasmáticos, logo painéis com múltiplos marcadores genômicos tendem a ser preferíveis para aumentar a sensibilidade do ensaio (CHAKRABARTI *et al.*, 2020).

Da mesma forma, CTCs são escassas, presentes em quantidade estimada de 1 célula /mL de sangue, como também apresentam meia-vida curta de em torno de 2h (CHEN; BODE; DONG, 2017). A escolha do método acaba tendo grande influência na sensibilidade. Por exemplo, pela alta heterogeneidade das CTCs, o uso de marcadores baseados em imunoafinidade pode deixar de detectar populações celulares com diferentes padrões de expressão de epítopos (SONG *et al.*, 2017b). Por outro lado, alguns métodos físicos rendem amostras com baixa pureza, o que pode

dificultar a caracterização das CTCs em meio à população de leucócitos normais (LI *et al.*, 2020). Algumas soluções podem ser adotadas para superar essas limitações. Protocolos de caracterização molecular das CTCs, por exemplo, sugerem uma etapa de pré-amplificação que poderia aumentar a concentração dos transcritos-alvo antes da análise (MORICI; LIN; GRAY, 2021). Outra solução para aumento da sensibilidade de uma forma geral é a avaliação concomitante de múltiplos marcadores (MARTINS *et al.*, 2021; ROSSI; IGNATIADIS, 2019).

Além da sensibilidade, é importante que os testes sejam altamente específicos, ou seja, não levem a resultados falsos-positivos (ATTARD; DE BONO, 2011). Embora a presença de ctDNA e CTCs não seja esperada em pacientes saudáveis, há o risco de outras estruturas circulantes serem detectadas e confundidas com os marcadores-alvo. Por exemplo, células somáticas podem acumular mutações durante o seu envelhecimento sem necessariamente desenvolverem um câncer, e essas mutações quando detectadas podem ser erroneamente diagnosticadas como ctDNA (ABBOSH; SWANTON; BIRKBAK, 2019; HEITZER *et al.*, 2019). No caso das CTCs, a presença de células maiores na circulação, como os monócitos ativados e células endoteliais, pode levar a uma interpretação errada dos resultados quando a separação baseada em tamanho é utilizada sem a posterior confirmação da origem celular (LI *et al.*, 2020).

A falta de padronização e validação ainda é uma das principais limitações da biópsia líquida. Existem diversos biomarcadores a serem pesquisados e, para cada um desses, uma grande variedade de metodologias. Ainda, os tumores podem apresentar comportamentos biológicos distintos e levar a resultados diferentes entre os biomarcadores (MARTINS *et al.*, 2021). Essa grande variabilidade acaba contribuindo para resultados heterogêneos e até mesmo contraditórios a depender das técnicas escolhidas e do tumor avaliado (ALIX-PANABIÈRES, 2020). Resultados diferentes já foram observados até mesmo entre testes comercialmente aprovados e baseados no mesmo ensaio, gerando uma preocupação a respeito de um mesmo paciente poder receber tratamentos distintos a depender do teste realizado (TORGA; PIENTA, 2018).

A falta de padronização na análise de ctDNA pode ser observada desde a fase pré-analítica, com diferentes procedimentos e cuidados relatados no momento da coleta, armazenamento e processamento. A fase pré-analítica é particularmente importante, pois a manipulação inadequada da amostra pode levar a resultados

inadequados devido à baixa concentração e curta meia vida dos analitos. A variabilidade presente em todas as etapas pode gerar resultados discordantes, de difícil interpretação. Buscar a padronização é fundamental para a adoção em larga escala desse biomarcador na prática clínica (CHAKRABARTI *et al.*, 2020; NEUMANN *et al.*, 2018).

Dentre os métodos para a detecção de CTCs, a variação dos métodos de enriquecimento e de caracterização podem acabar levando a diferentes resultados e consequências para o paciente. A aplicação de técnicas distintas de enriquecimento pode levar a diferentes níveis de pureza na amostra das células isoladas (LI *et al.*, 2020; MORICI; LIN; GRAY, 2021). Mesmo o CellSearch®, único método aprovado pela FDA americana para a detecção de CTCs, está sujeito a resultados errôneos, visto que classicamente se baseia em imunoafinidade para o marcador EpCAM. Considerando que algumas CTCs podem deixar de expressar a EpCAM durante a fase de transição epitelial-mesenquimal no processo metastático e que muitos tumores não expressam esse marcador naturalmente, o CellSearch® está sujeito a resultados falsos-negativos (ATTARD; DE BONO, 2011; LI *et al.*, 2020).

Além da falta de padronização, muitos estudos ainda são realizados com uma pequena população de pacientes e, apesar de gerarem numerosas evidências da utilidade da biópsia líquida como ferramenta prognóstica e diagnóstica, ensaios clínicos em larga escala são fundamentais para a comprovação do significado desses achados em um contexto clínico (CHAKRABARTI *et al.*, 2020; ROSSI; IGNATIADIS, 2019).

Para tentar contornar a falta de padronização e validação da biópsia líquida, grupos de estudos formaram consórcios de pesquisa na Europa (CANCER-ID CONSORTIUM, 2015) e nos Estados Unidos (BLOODPAC CONSORTIUM, 2016). Autores buscam reunir informações sobre os resultados para cada método e tumor em revisões sistemáticas, para evidenciar qual método é melhor em cada situação (MARTINS *et al.*, 2021). Pesquisadores acreditam que a melhor estratégia seria desenvolver um algoritmo para combinar todas as técnicas, traçar um perfil mais preciso dos biomarcadores tumorais e identificar a melhor combinação de ensaios e marcadores para cada paciente (ALIX-PANABIÈRES, 2020).

2.2.6. Biópsia líquida aplicada a melanomas humanos

Para os melanomas humanos, a biópsia líquida já foi aplicada com sucesso na detecção de ctDNA, CTCs, EVs e miRNAs em diversas situações. A utilidade diagnóstica e prognóstica desses métodos para o melanoma já foi investigada, mas o maior uso desta metodologia é na avaliação de eficácia terapêutica e na detecção de marcadores-alvo para a escolha do tratamento (HUANG; HOON, 2016; KAMIŃSKA *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2016). A maioria dos estudos em melanomas humanos foca na forma cutânea, por sua maior prevalência, mas esforços já foram direcionados para a aplicação de técnicas nos melanomas uveal e bucal (JIN; BURNIER, 2021; NEWELL *et al.*, 2019).

A detecção de ctDNA é realizada principalmente pela detecção de mutações associadas aos melanomas por PCR digital (FORSCHNER *et al.*, 2019). Os principais genes-alvo são BRAF e NRAS, ambos comumente mutados em melanomas humanos (KAMIŃSKA *et al.*, 2021). Todavia, o melanoma é reconhecidamente uma neoplasia com alta heterogeneidade e alta carga mutacional, e é possível que haja muitas mutações desconhecidas (ALSAIHATI *et al.*, 2021; AYA-BONILLA *et al.*, 2020; GRZYWA; PASKAL; WŁODARSKI, 2017). O NGS poderia ser uma solução para o sequenciamento genômico, porém eles requerem grande quantidade de ctDNA que usualmente só é detectada em pacientes em estágios mais avançados, portanto a aplicabilidade da biópsia líquida para pacientes com melanoma em estágio inicial ainda é limitada (DIEFENBACH *et al.*, 2019; IMPERIAL *et al.*, 2019).

A quantidade de ctDNA está associada à carga tumoral (MCEVOY *et al.*, 2018; WONG *et al.*, 2017). Sugere-se que uma concentração mais alta de ctDNA no momento do diagnóstico possa estar relacionada com um menor tempo de sobrevida em pacientes com melanoma (AYA-BONILLA *et al.*, 2020). A detecção de alta concentração de mutações em BRAF no momento do diagnóstico está correlacionada com uma maior carga tumoral e menor tempo de sobrevida (SANMAMED *et al.*, 2015). A análise específica de mutações no ctDNA pode ser uma alternativa para a biópsia tecidual, principalmente em se tratando de mutações conhecidas e relacionadas com a eficácia ao tratamento (HASELMANN *et al.*, 2018), mas também pode ser útil na detecção de mutações incomuns e de alterações epigenéticas (KAMIŃSKA *et al.*, 2021). Apesar desses resultados, a quantificação do ctDNA e de suas mutações não deve ser considerada isoladamente um fator prognóstico (GRAY *et al.*, 2015).

Para monitorar a resposta ao tratamento, o ctDNA é considerado um biomarcador sensível e com alta correlação com o estado clínico do paciente (KAMIŃSKA *et al.*, 2021). A presença de mutações específicas pode indicar resistência a determinados tratamentos (BETTEGOWDA *et al.*, 2014). A redução da quantidade de ctDNA contendo mutações-alvo acompanha a resposta ao tratamento e aumenta no caso de recidiva, conseguindo indicar a redução da carga tumoral mais rapidamente do que a tomografia (FORSCHNER *et al.*, 2020; LONG *et al.*, 2014; SANMAMED *et al.*, 2015). Estudos mais recentes vêm observando resultados semelhantes com imunoterapia, e níveis indetectáveis de ctDNA após o tratamento estão correlacionados com respostas mais efetivas e melhor prognóstico de uma forma geral (FORSCHNER *et al.*, 2019; HONG *et al.*, 2018; SEREMET *et al.*, 2019). Dessa forma, o ctDNA é considerada uma ferramenta confiável para avaliação de resposta e resistência ao tratamento (KAMIŃSKA *et al.*, 2021).

Para a detecção de CTCs no melanoma, os primeiros estudos com melanoma caracterizaram a presença de transcritos específicos de mRNA dessas células no sangue (BOYER *et al.*, 2020). Como as células de melanoma não expressam EpCAM, uma adaptação do método CellSearch® foi necessária para a sua aplicação, pelo uso de anticorpos anti-CD146 para a seleção imunomagnética e confirmação pela marcação com antígeno HMW-MAA, ambos presentes em melanomas humanos (KHOJA *et al.*, 2015; RAO *et al.*, 2011). Os métodos baseados em características físicas podem ser uma opção mais vantajosa, já que o melanoma metastático apresenta alto grau de heterogeneidade e as CTCs podem apresentar diferentes fenótipos, o que pode levar à perda de CTCs negativas para os marcadores-alvo (AYA-BONILLA *et al.*, 2020; BOYER *et al.*, 2020; GRZYWA; PASKAL; WŁODARSKI, 2017).

Novas metodologias estão sendo desenvolvidas para a detecção de CTCs e testadas em melanoma. Por exemplo, um método para detecção *in vivo* de CTCs baseado em detecção fotoacústica foi testado em pacientes com melanomas com bons resultados, analisando um grande volume de amostra sem a necessidade de coleta e apresentando alta sensibilidade e especificidade. A sensibilidade reportada para este método seria em torno de 1000 vezes maior que métodos mais tradicionais, conseguindo detectar até 1 CTC / litro de sangue analisado (GALANZHA *et al.*, 2019).

A detecção de CTCs aparentemente tem relevância prognóstica para os melanomas. Estudos demonstraram que a contagem de CTCs em pacientes com

melanoma pode estar relacionada com o estágio da doença, a agressividade e o tempo de sobrevida dos pacientes, e há diferença significativa no número de CTCs em pacientes com e sem metástases (FREEMAN *et al.*, 2012; RAO *et al.*, 2011; ULMER *et al.*, 2004). A detecção de transcritos de mRNA específicos para o melanoma nas CTCs também teve correlação com o estágio da doença, e a maior expressão ou a presença de múltiplos marcadores é associada a um prognóstico pior (HOSHIMOTO *et al.*, 2012; KOYANAGI *et al.*, 2005). A expressão do mRNA após a remoção do tumor é útil para prever a recidiva do tumor (MOCELLIN *et al.*, 2004).

A contagem de CTCs antes, durante e depois do tratamento pode fornecer informações a respeito da resposta ao tratamento (KAMIŃSKA *et al.*, 2021). Uma menor quantidade de CTCs no início e o declínio dessa quantidade após o tratamento foram associados a uma melhor resposta e maior tempo de sobrevida (KLINAC *et al.*, 2014). O alto número de CTCs após o fim do tratamento está relacionada à recidiva mais rápida (KHOJA *et al.*, 2015). Por RT-qPCR, a redução da quantidade de mRNA associado às CTCs após o tratamento também se correlaciona com um melhor prognóstico (KOYANAGI *et al.*, 2005). A presença de marcadores específicos pode ser preditiva para uma boa resposta ou resistência a certas abordagens terapêuticas (GRAY *et al.*, 2015).

Apesar destes dados, a contagem de CTCs não foi incorporada à prática clínica de pacientes com melanoma, devido à ausência de resultados consistentes e de metodologias validadas. Apesar de ter sido detectada correlação entre a presença de CTCs e um menor tempo de sobrevida, os ensaios realizados até o momento foram realizados apenas em pacientes com doença avançada, e sua utilidade em estágios iniciais é desconhecida (BOYER *et al.*, 2020). A grande variedade de técnicas disponíveis para detectar CTCs acaba dificultando a comparação dos resultados e padronização dos métodos. Desta forma, a real importância desse biomarcador em um contexto ainda não foi confirmada clínico em larga escala e os resultados devem ser avaliados com cautela (AYA-BONILLA *et al.*, 2020; KAMIŃSKA *et al.*, 2021).

A detecção de EVs de origem tumoral usualmente depende de separação baseada em epítopos esperados no melanoma. Aumento da quantidade de EVs expressando CD63 e caveolina-1, marcadores tumorais gerais, já foi detectado em pacientes com melanoma e estes marcadores já foram utilizados como alvo para o seu isolamento (LOGOZZI *et al.*, 2020). Epítopos mais específicos são desejáveis, e

um estudo mais recente utilizou o epítopo CSPG4, altamente específico para células melanocíticas (FERRONE; WHITESIDE, 2020).

A concentração de EVs não tende a estar correlacionada com o estágio do melanoma, mas a análise do seu conteúdo pode apresentar grande potencial no diagnóstico e na avaliação da carga tumoral (KAMIŃSKA *et al.*, 2021). A concentração de PD-L1 e nos EVs pode estar correlacionada com a supressão de linfócitos T e uma consequente progressão tumoral mais rápida (CHEN; BODE; DONG, 2017). A concentração aumentada de S100B e outras proteínas ligadas ao melanoma foi observada em pacientes com estágios mais avançados, podendo refletir a progressão e presença de metástases (CORDONNIER *et al.*, 2020). A expressão de diferentes níveis de miRNA nas EVs também pode estar correlacionada com a fase da doença (MARGUE *et al.*, 2015; TENGDA *et al.*, 2018).

Para a avaliação de tratamento, a concentração de PD-L1 nas EVs parece ser preditiva de uma melhor resposta à imunoterapia com o inibidor de checkpoint anti-PD-1 (CHEN; BODE; DONG, 2017; CORDONNIER *et al.*, 2020). Foi detectada a mudança no perfil de miRNAs nas EVs ao longo do tratamento, o que pode ser correlacionado com um maior tempo de livre de progressão (SVEDMAN *et al.*, 2018). Supõe-se que as EVs estejam envolvidas com mecanismos reguladores de resistência ao carrear substâncias que vão modificar a expressão genética da célula e diminuir sua sensibilidade ao tratamento (LUNAVAT *et al.*, 2017).

Apesar de todas as evidências sobre sua utilidade, ainda há barreiras para a implementação da biópsia líquida na prática clínica de pacientes com melanoma. A sensibilidade para a detecção dos biomarcadores ainda é desafiadora, especialmente em pacientes na fase inicial e com uma carga tumoral menor que poderiam se beneficiar mais dessas técnicas. É necessária a padronização dos métodos pré-analíticos e analíticos, especialmente para melanoma, onde a heterogeneidade tumoral pode se tornar um problema e levar a resultados falsos-negativos. Estudos em larga escala para avaliar a real utilidade clínica também são obrigatórios para que os testes possam ser utilizados comercialmente, e a maioria destes tende a focar nos carcinomas em detrimento de outros tumores (HUANG; HOON, 2016).

2.2.7 Realidade da biópsia líquida em medicina veterinária

O foco da medicina veterinária em biópsia líquida e medicina de precisão ainda está em estágio inicial. Por exemplo, estudos de genômica em veterinária ainda são poucos e focam mais na detecção de mutações em tipos específicos de tumores do que em biópsia líquida. Apesar disso, observa-se um grande potencial na aplicação de biópsia líquida para os pacientes veterinários da mesma forma como em humanos (CHIBUK *et al.*, 2021; COLOMBE *et al.*, 2022).

O rastreamento de câncer em cães que ainda não têm a doença avançada é uma área de grande interesse em veterinária. Geralmente, os cães são diagnosticados em estágios avançados, levando a uma maior dificuldade no manejo da doença e um pior prognóstico (LAVALLE *et al.*, 2021). Sabendo-se que algumas raças de cães são mais predispostas ao câncer do que outras e que os cães mais idosos são mais susceptíveis, a aplicação de uma técnica para monitorar essas populações pode ajudar a obter um diagnóstico precoce e um prognóstico mais favorável, como observado em humanos (CHIBUK *et al.*, 2021; COLOMBE *et al.*, 2022).

No auxílio ao diagnóstico, a biópsia líquida tem o potencial de ser utilizada em pacientes com sinais clínicos e alterações em exames sugestivas de câncer, porém nos quais o tumor primário não é detectado ou se encontra em um sítio anatômico onde a coleta de biópsia apresenta um alto risco de complicações. Visto que a biópsia líquida não é invasiva e não apresenta riscos para os pacientes, sua aplicação poderia auxiliar no diagnóstico definitivo e aumenta as chances de iniciar um tratamento adequado para esses pacientes (CHIBUK *et al.*, 2021). As coletas de sangue seriadas também permitem o monitoramento em tempo real da progressão tumoral, mesmo que nenhum tratamento esteja sendo realizado (COLOMBE *et al.*, 2022).

Com a evolução da terapia dirigida em medicina humana, há um maior interesse na implementação de drogas mais eficazes e direcionadas para o fenótipo tumoral em medicina veterinária. A caracterização do perfil mutacional e a avaliação da heterogeneidade tumoral pode identificar alvos terapêuticos e auxiliar no tratamento personalizado. A presença de mutações e marcadores circulantes pode predizer a eficácia a determinados tratamentos de forma mais sensível do que a avaliação do tumor sólido (CHIBUK *et al.*, 2021).

Por fim, a biópsia líquida permite o acompanhamento da resposta ao tratamento. Os métodos de biópsia líquida podem ser mais sensíveis e específicos para a avaliação da redução da carga tumoral frente a um tratamento do que os mais tradicionalmente utilizados métodos de imagem para avaliar o tamanho tumoral, pois não estarão aumentados em condições não neoplásicas que causam o aumento do tumor, como a inflamação. O acompanhamento dos biomarcadores pode ajudar a determinar o final do tratamento, evitando que o paciente seja tratado por um tempo maior que o necessário (CHIBUK *et al.*, 2021). Após o fim do tratamento, a monitoração seriada dos biomarcadores tumorais pode prever o fim da remissão tumoral precocemente (COLOMBE *et al.*, 2022).

Da mesma forma que em oncologia humana, muitos desafios devem ser superados para a implementação da biópsia líquida em medicina veterinária. A relevância de cada biomarcador deve ser elucidada para o contexto clínico, visto que diferentes neoplasias têm diferentes comportamentos. A sensibilidade analítica de cada metodologia deve ser suficiente para a detecção dos biomarcadores nas diferentes espécies. Identificar as alterações genômicas de maior relevância para cada câncer pode ajudar no desenvolvimento de ensaios mais sensíveis e específicos, porém o conhecimento das alterações genômicas dos tumores na espécie canina ainda é limitado, muitas vezes sendo necessário recorrer à presença de alterações em regiões semelhantes nos tumores humanos (CHIBUK *et al.*, 2021).

De uma forma geral, os maiores desafios a serem superados serão: a otimização e padronização das práticas de coleta e das metodologias; a alta sensibilidade analítica para maximizar a detecção dos biomarcadores tumorais frente à interferência gerada pelos demais componentes sanguíneos; a alta especificidade confirmada pela ausência de resultados falsos-positivos em pacientes livres de câncer; e a validação dos resultados em grupos amostrais de tamanho significativo e em pacientes com diferentes tumores (CHIBUK *et al.*, 2021).

A falta de uma regulamentação bem-definida para a comercialização de testes diagnósticos em medicina veterinária em contraste com a medicina humana é um desafio à parte, pois testes complexos podem ser comercializados sem estudos de validação em larga escala. Por maior que seja a ambição por aplicar novas tecnologias na realidade veterinária, esses testes precisam passar por validação clínica com grande rigor analítico, para evitar que testes de má qualidade e sem real valor prognóstico levem a consequências graves para o paciente. Para biópsia líquida, onde

são necessárias uma alta sensibilidade e uma amostra de alta qualidade, esse cuidado deve ser ainda maior (CAWLEY; KHANNA, 2020; CHIBUK *et al.*, 2021; MOSES; NIEMI; KARLSSON, 2018).

Outro potencial obstáculo para a medicina veterinária será o preço dos ensaios e o custo-benefício de seu uso. Os testes de biópsia líquida requerem equipamento e mão-de-obra especializada, o que os torna mais custosos. Visto que os pacientes caninos possuem uma menor expectativa de vida, os tutores podem considerar que o gasto com o exame de biópsia líquida, mesmo que para guiar um tratamento, não valham a pena se não houver a garantia de resposta. Para o monitoramento de pacientes saudáveis, esses métodos possivelmente serão mais caros que os demais exames de rotina, e os tutores podem questionar a sua aplicabilidade em um animal que possivelmente nunca desenvolverá um câncer. Com uma maior quantidade de pesquisas e o aumento da eficiência dos ensaios, espera-se uma queda dos preços, mas estudos são necessários para confirmar a garantia de resultados (CHIBUK *et al.*, 2021).

Muitos dos biomarcadores testados até o momento são baseados em proteínas circulantes, como o antígeno carcinoembriogênico, a lactato-desidrogenase, a proteína C reativa e o TK1, entre outros (BABA; SOOD; GUPTA, 2019; CAMPOS *et al.*, 2012; GARCIA *et al.*, 2022; SAELLSTRÖM *et al.*, 2022; SENHORELLO *et al.*, 2020). Esses marcadores protéicos demonstraram evidências em potencial na sua utilização diagnóstica, prognóstica e para monitoramento de tratamento, porém eles apresentam sensibilidades e especificidades variáveis, e nenhum deles foi considerado suficientemente específico para distinguir pacientes oncológicos de pacientes saudáveis ou com diferentes patologias (COLOMBE *et al.*, 2022; GROBMAN *et al.*, 2017).

O biomarcador visto como mais promissor em medicina veterinária é o ctDNA (CHIBUK *et al.*, 2021), porém muitos estudos em veterinária inicialmente focaram no cfDNA em vez do ctDNA (COLOMBE *et al.*, 2022). O aumento do cfDNA livre circulante em cães já foi observado em uma série de condições, neoplásicas e não neoplásicas (LETENDRE; GOGGS, 2017). Níveis aumentados de cfDNA e menor integridade desse foi observada em cães com diversas neoplasias, e uma quantidade maior de cfDNA estava correlacionada com estágios mais avançados da doença (TAGAWA *et al.*, 2019).

A identificação do ctDNA dentro do cfDNA pela detecção de mutações e rearranjos vem sendo estudada mais recentemente. Grande foco é dado ao estudo do ctDNA em pacientes com carcinomas, principalmente os mamários e uroteliais (BECK *et al.*, 2013; BEFFAGNA *et al.*, 2017; COLOMBO *et al.*, 2021; DE OLIVEIRA *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2019; TAGAWA *et al.*, 2020), mas mutações e rearranjos cromossomais específicos para linfoma, sarcoma histiocítico e até mesmo no melanoma oral canino já foram detectadas no plasma de cães, demonstrando potencial para o diagnóstico e na avaliação da doença residual mínima (PROUTEAU; ANDRÉ, 2019). A quantidade de ctDNA poderia diferenciar lesões benignas de lesões malignas, visto que resultados significativamente distintos foram observados entre lesões esplênicas benignas e malignas (FAVARO *et al.*, 2022).

O foco em detecção de CTCs é menor que o de ctDNA, mas foi abordado em alguns estudos. Em um estudo piloto, Marconato *et al.* (2019) aplicaram a metodologia de CellSearch® para buscar CTCs em cães com carcinomas mamários metastáticos com resultados promissores e, apesar de uma baixa amostragem indicar a necessidade de mais estudos, a quantificação de mais de duas CTCs no momento do diagnóstico foi observada como um fator prognóstico independente, associado a um menor tempo de sobrevida. Outro grupo de pesquisadores, ao longo de 3 anos, avaliou a expressão de diversos genes presentes nas CTCs do carcinoma mamário, mas ausentes em leucócitos, e desenhou um painel multimarcador para aplicação em RT-qPCR (DA COSTA *et al.*, 2011, 2012, 2013). A citometria de fluxo também foi aplicada para a detecção de CTCs em pacientes com osteossarcoma (WRIGHT *et al.*, 2019). Estudos para a detecção de CTCs por métodos físicos ainda não foram publicados.

As EVs como biomarcadores tumorais também têm despertado o interesse em medicina veterinária. Aumento da quantidade de EVs e de miRNAs relacionados com as células tumorais foi observado em osteossarcomas (BRADY *et al.*, 2018), carcinomas mamários (FISH *et al.*, 2018) e em linfomas (ASADA *et al.*, 2019; GARNICA *et al.*, 2020). Poucos estudos têm focado em miRNAs circulantes e seus padrões específicos nas neoplasias, mas os achados demonstram que seu uso pode ser interessante para o diagnóstico e o prognóstico de câncer (CRAIG *et al.*, 2019; FISH *et al.*, 2018).

Quanto à metabolômica, marcadores iônicos circulantes podem estar aumentados ou diminuídos em quadros oncológicos. Estudos em veterinária

demonstraram que o aumento dos níveis cobre e a redução dos níveis de zinco na circulação podem estar relacionados com os quadros de câncer, com potencial uso no monitoramento da resposta ao tratamento (CHAMEL *et al.*, 2017; KAZMIERSKI *et al.*, 2001). Contudo, estes estudos ainda estão em estágio muito inicial e requerem confirmação com grupos amostrais mais robustos e maior controle de variáveis externas, como o aporte nutricional destes pacientes (COLOMBE *et al.*, 2022).

Concluindo, apesar de ainda em um estágio inicial, grande potencial é observado na biópsia líquida para a medicina veterinária, e os avanços recentes na genômica e na oncologia humana podem indicar o caminho pelo qual essas metodologias podem ser aplicadas aos animais (CHIBUK *et al.*, 2021). Muitas técnicas ainda não foram exploradas, e testes em cães podem levar a benefícios também para a oncologia humana por estudos comparativos (BARUTELLO *et al.*, 2018). As técnicas já testadas têm demonstrado capacidade em descrever as características tumorais e sua evolução. Baseando-se no conceito de saúde única, estes biomarcadores que tanto têm sido estudados em humanos provavelmente serão eficazes também para o uso em cães, e ambas as espécies poderão se beneficiar de suas aplicabilidades em medicina de precisão (COLOMBE *et al.*, 2022).

REFERÊNCIAS

ABBOSH, C.; SWANTON, C.; BIRKBAK, N. J. Clonal haematopoiesis: a source of biological noise in cell-free DNA analyses. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 3, p. 358–359, mar. 2019.

AHLGRIMM-SIESS, V.; LAIMER, M.; RABINOVITZ, H. S.; OLIVIERO, M.; HOFMANN-WELLENHOF, R.; MARGHOOB, A. A.; SCOPE, A. Confocal Microscopy in Skin Cancer. **Current Dermatology Reports**, v. 7, n. 2, p. 105, jun. 2018..

ALIX-PANABIÈRES, C. The future of liquid biopsy. **Nature**, v. 579, n. 7800, p. S9–S9, mar. 2020.

ALIX-PANABIÈRES, C.; PANTEL, K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. **Cancer Discovery,** v. 6, n. 5, p. 479-91, maio 2016.

ALLARD, W. J.; MATERA, J.; MILLER, M. C.; REPOLLET, M.; CONNELLY, M. C.; RAO, C.; TIBBE, A. G. J.; UHR, J. W.; TERSTAPPEN, L. W. M. M. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 20, p. 6897–6904, out. 2004.

ALSAIHATI, B. A.; HO, K.-L. L.; WATSON, J.; FENG, Y.; WANG, T.; DOBBIN, K. K.; ZHAO, S. Canine tumor mutational burden is correlated with TP53 mutation across tumor types and breeds. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 4670, dez. 2021.

ANDREE, K. C.; VAN DALUM, G.; TERSTAPPEN, L. W. M. M. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. **Molecular oncology**, v. 10, n. 3, p. 395–407, mar. 2016.

ANDREOPOULOU, P.; DUMITRESCU, C. E.; KELLY, M. H.; BRILLANTE, B. A.; CUTLER PECK, C. M.; WODAJO, F. M.; CHANG, R.; COLLINS, M. T. Selective venous catheterization for the localization of phosphaturic mesenchymal tumors. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 6, p. 1295–1302, jun. 2011.

ANTUNES-FERREIRA, M.; KOPPERS-LALIC, D.; WÜRDINGER, T. Circulating platelets as liquid biopsy sources for cancer detection. **Molecular Oncology**, v. 15, n. 6, p. 1727–1743, jun. 2021.

ASADA, H.; TOMIYASU, H.; UCHIKAI, T.; ISHIHARA, G.; GOTO-KOSHINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Comprehensive analysis of miRNA and protein profiles within exosomes derived from canine lymphoid tumour cell lines. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0208567, abr. 2019.

ASGHAR, S.; PARVAIZ, F.; MANZOOR, S. Multifaceted role of cancer educated platelets in survival of cancer cells. **Thrombosis research**, v. 177, p. 42–50, maio 2019.

ATTARD, G.; DE BONO, J. S. Utilizing circulating tumor cells: Challenges and pitfalls **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 21, n. 1, p. 50–8, fev. 2011.

AYA-BONILLA, C. A.; MORICI, M.; HONG, X.; MCEVOY, A. C.; SULLIVAN, R. J.; FREEMAN, J.; CALAPRE, L.; KHATTAK, M. A.; MENIAWY, T.; MILLWARD, M.; ZIMAN, M.; GRAY, E. S. Detection and prognostic role of heterogeneous populations of melanoma circulating tumour cells. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 7, p. 1059–1067, mar. 2020.

BABA, O. K.; SOOD, N. K.; GUPTA, K. Clinical Evaluation of Glycoproteins and Inflammatory Cytokines in the Serum of Dogs Affected with Canine Mammary Cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 89, n. 4, p. 1465–1469, dez. 2019.

BAGNALL, J. S.; BYUN, S.; BEGUM, S.; MIYAMOTO, D. T.; HECHT, V. C.; MAHESWARAN, S.; STOTT, S. L.; TONER, M.; HYNES, R. O.; MANALIS, S. R. Deformability of Tumor Cells versus Blood Cells. **Scientific reports**, v. 5, dez. 2015.

BALAJI, S. A.; SHANMUGAM, A.; CHOUGULE, A.; SRIDHARAN, S.; PRABHASH, K.; ARYA, A.; CHAUBEY, A.; HARIHARAN, A.; KOLEKAR, P.; SEN, M.; RAVICHANDRAN, A.; KATRAGADDA, S.; SANKARAN, S.; BHARGAVA, S.; KULKARNI, P.; RAO, S.; SUNKAVALLI, C.; BANAVALI, S.; JOSHI, A.; NORONHA, V.; DUTT, A.; BAHADUR, U.; HARIHARAN, R.; VEERAMACHANENI, V.; GUPTA, V. Analysis of solid tumor mutation profiles in liquid biopsy. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 11, p. 5439–5447, nov. 2018.

BARDELLI, A.; PANTEL, K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). **Cancer Cell**, v. 31, n. 2, p. 172–9, fev. 2017.

BARUTELLO, G.; ROLIH, V.; ARIGONI, M.; TARONE, L.; CONTI, L.; QUAGLINO, E.; BURACCO, P.; CAVALLO, F.; RICCARDO, F. Strengths and weaknesses of pre-clinical models for human melanoma treatment: Dawn of dogs' revolution for immunotherapy **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 799, mar. 2018.

BAYARRI-LARA, C.; ORTEGA, F. G.; CUETO LADRÓN DE GUEVARA, A.; PUCHE, J. L.; RUIZ ZAFRA, J.; DE MIGUEL-PÉREZ, D.; RAMOS, A. S. P.; GIRALDO-OSPINA, C. F.; NAVAJAS GÓMEZ, J. A.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; LORENTE, J. A.; SERRANO, M. J. Circulating Tumor Cells Identify Early Recurrence in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Undergoing Radical Resection. **PloS one**, v. 11, n. 2, fev. 2016.

BECK, J.; HENNECKE, S.; BORNEMANN-KOLATZKI, K.; URNOVITZ, H. B.; NEUMANN, S.; STRÖBEL, P.; KAUP, F. J.; BRENIG, B.; SCHÜTZ, E. Genome Aberrations in Canine Mammary Carcinomas and Their Detection in Cell-Free Plasma DNA. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 30 set. 2013.

BEFFAGNA, G.; SAMMARCO, A.; BEDIN, C.; ROMUALDI, C.; MAINENTI, M.; MOLLO, A.; CAVICCHIOLI, L.; FERRO, S.; TREZ, D.; MARIA, R. de; NITTI, D.; SACCANI, A.; CAMPANELLA, M.; AGOSTINI, M.; ZAPPULLI, V. Circulating cell-free DNA in dogs with mammary tumors: Short and long fragments and integrity index. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, jan. 2017.

BENTUBO, H. D. L.; TOMAZ, M. A.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1021–1026, ago. 2007.

BERGIN, I. L.; SMEDLEY, R. C.; ESPLIN, D. G.; SPANGLER, W. L.; KIUPEL, M. Prognostic evaluation of ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 41–53, jan. 2011.

BERGMAN, P. J. Canine Oral Melanoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 22, n. 2, p. 55–60, maio 2007.

BERGMAN, P. J. Paraneoplastic Syndromes. *In*: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology.** 5. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2013. p. 83–97.

BERNARD, V.; KIM, D. U.; SAN LUCAS, F. A.; CASTILLO, J.; ALLENSON, K.; MULU, F. C.; STEPHENS, B. M.; HUANG, J.; SEMAAN, A.; GUERRERO, P. A.; KAMYABI, N.; ZHAO, J.; HURD, M. W.; KOAY, E. J.; TANIGUCHI, C. M.; HERMAN, J. M.; JAVLE, M.; WOLFF, R.; KATZ, M.; VARADHACHARY, G.; MAITRA, A.; ALVAREZ, H. A. Circulating Nucleic Acids Are Associated With Outcomes of Patients With Pancreatic Cancer. **Gastroenterology**, v. 156, n. 1, p. 108, jan. 2019.

BEST, M. G.; WESSELING, P.; WURDINGER, T. Tumor-educated platelets as a noninvasive biomarker source for cancer detection and progression monitoring **Cancer Research,** v. 78, n. 13, p. 3407–3412. Inc., jul. 2018.

BETTEGOWDA, C.; SAUSEN, M.; LEARY, R. J. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. **Science translational medicine**, v. 6, n. 224, fev. 2014.

BLOODPAC CONSORTIUM. **The Blood Profiling Atlas in Cancer Consortium: <http://www.bloodpac.org>**. Disponível em: <https://www.bloodpac.org/>. Acesso em: 5 jul. 2022.

BONNETT, B. N.; EGENVALL, A.; HEDHAMMAR, Å.; OLSON, P. Mortality in over 350,000 Insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, Gender-, Age-and Cause-specific Rates **Acta veterinaria scandinavica**, v. 46, n. 3, p. 105–120, 30 sep. 2005.

BOYER, M.; CAYREFOURCQ, L.; DEREURE, O.; MEUNIER, L.; BECQUART, O.; ALIX-PANABIÈRES, C. Clinical Relevance of Liquid Biopsy in Melanoma and Merkel Cell Carcinoma. **Cancers**, v. 12, n. 4, abr. 2020.

BRADY, J. v.; TROYER, R. M.; RAMSEY, S. A.; LEEPER, H.; YANG, L.; MAIER, C. S.; GOODALL, C. P.; RUBY, C. E.; ALBARQI, H. A. M.; TARATULA, O.; BRACHA, S. A Preliminary Proteomic Investigation of Circulating Exosomes and Discovery of Biomarkers Associated with the Progression of Osteosarcoma in a Clinical Model of Spontaneous Disease. **Translational Oncology**, v. 11, n. 5, p. 1137, out. 2018.

BRAIG, D.; BECHERER, C.; BICKERT, C.; BRAIG, M.; CLAUS, R.; EISENHARDT, A. E.; HEINZ, J.; SCHOLBER, J.; HERGET, G. W.; BRONSERT, P.; FRICKE, A.; FOLLO, M.; STARK, G. B.; BANNASCH, H.; EISENHARDT, S. U. Genotyping of circulating cell-free DNA enables noninvasive tumor detection in myxoid liposarcomas. **International Journal of Cancer**, v. 145, n. 4, p. 1148–1161, ago. 2019.

BRESNICK, A. R.; WEBER, D. J.; ZIMMER, D. B. S100 proteins in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 2, p. 96–109, fev. 2015.

BU, H.; HE, D.; HE, X.; WANG, K. Exosomes: Isolation, Analysis, and Applications in Cancer Detection and Therapy ChemBioChem, v. 20, n. 4, p. 451-61, fev. 2019.

BURNEY, I. A.; LAKHTAKIA, R. Precision Medicine: Where have we reached and where are we headed? **Sultan Qaboos University medical journal**, v. 17, n. 3, p. e255–e258, ago. 2017.

BURR, R.; EDD, J. F.; CHIRN, B.; MISHRA, A.; HABER, D. A.; TONER, M.; MAHESWARAN, S. Negative-Selection Enrichment of Circulating Tumor Cells from Peripheral Blood Using the Microfluidic CTC-iChip. v. 2471, p. 309–321, fev 2022.

BUTLER, T. M.; SPELLMAN, P. T.; GRAY, J. Circulating-tumor DNA as an early detection and diagnostic tool. **Current opinion in genetics & development**, v. 42, p. 14–21, fev. 2017.

CAMPAGNE, C.; JULÉ, S.; ALLEAUME, C.; BERNEX, F.; EZAGAL, J.; CHÂTEAU-JOUBERT, S.; ESTRADA, M.; AUBIN-HOUZELSTEIN, G.; PANTHIER, J. J.; EGIDY, G. Canine Melanoma Diagnosis: RACK1 as a Potential Biological Marker. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 6, p. 1083–1090, nov. 2013.

CAMPOS, L. C.; LAVALLE, G. E.; ESTRELA-LIMA, A.; MELGAÇO DE FARIA, J. C.; GUIMARÃES, J. E.; DUTRA, Á. P.; FERREIRA, E.; DE SOUSA, L. P.; RABELO, É. M. L.; VIEIRA DA COSTA, A. F. D.; CASSALI, G. D. CA15.3, CEA and LDH in Dogs with Malignant Mammary Tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 6, p. 1383–1388, nov. 2012.

CANCEDDA, S.; ROHRER BLEY, C.; ARESU, L.; DACASTO, M.; LEONE, V. F.; PIZZONI, S.; GRACIS, M.; MARCONATO, L. Efficacy and side effects of radiation therapy in comparison with radiation therapy and temozolomide in the treatment of measurable canine malignant melanoma. **Veterinary and comparative oncology**, v. 14, n. 4, p. e146–e157, dez. 2016.

CANCER-ID CONSORTIUM. **CANCER-ID – Innovation in Medicine: <https://www.cancer-id.eu/>**. Disponível em: <https://www.cancer-id.eu/>. Acesso em: jul. 2022.

CARPINETTI, P.; DONNARD, E.; BETTONI, F.; ASPRINO, P.; KOYAMA, F.; ROZANSKI, A.; SABBAGA, J.; HABR-GAMA, A.; PARMIGIANI, R. B.; GALANTE, P. A. F.; PEREZ, R. O.; CAMARGO, A. A. The use of personalized biomarkers and liquid biopsies to monitor treatment response and disease recurrence in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation. **Oncotarget**, v. 6, n. 35, p. 38360–38371, nov. 2015.

CASCIO, M. J.; WHITLEY, E. M.; SAHAY, B.; CORTES-HINOJOSA, G.; CHANG, L. J.; COWART, J.; SALUTE, M.; SAYOUR, E.; DARK, M.; SANDOVAL, Z.; MITCHELL, D. A.; MILNER, R. J. Canine osteosarcoma checkpoint expression correlates with metastasis and T-cell infiltrate. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 232, fev. 2021.

CASTRO-GINER, F.; ACETO, N. Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis. **Genome medicine**, v. 12, n. 1, mar. 2020.

CAWLEY, J.; KHANNA, C. The Challenge of Cognitive Dissonance in the Delivery of Precision Medicine in Veterinary Oncology. **Archives of Cancer Biology and Therapy,2020;1(2):37-41**, v. 1, n. 2, p. 37–41, set. 2020.

CHAKRABARTI, S.; XIE, H.; URRUTIA, R.; MAHIPAL, A. The Promise of Circulating Tumor DNA (ctDNA) in the Management of Early-Stage Colon Cancer: A Critical Review. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 1–18, out. 2020.

CHAMEL, G.; GOURLAN, A. T.; TÉLOUK, P.; SAYAG, D.; MILLIARD, V.; LOISEAU, C.; SIMON, M.; BUFF, S.; PONCE, F. Retrospective evaluation of blood copper stable isotopes ratio 65Cu/63Cu as a biomarker of cancer in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, n. 4, p. 1323–1332, dez. 2017.

CHEN, L.; BODE, A. M.; DONG, Z. Circulating Tumor Cells: Moving Biological Insights into Detection. **Theranostics**, v. 7, n. 10, p. 2606–2619, jun. 2017.

CHEUNG, K. W. E.; CHOI, S. yu R.; LEE, L. T. C.; LEE, N. L. E.; TSANG, H. F.; CHENG, Y. T.; CHO, W. C. S.; WONG, E. Y. L.; WONG, S. C. C. The potential of circulating cell free RNA as a biomarker in cancer. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 19, n. 7, p. 579–590, jul. 2019.

CHIBUK, J.; FLORY, A.; KRUGLYAK, K. M.; LEIBMAN, N.; NAHAMA, A.; DHARAJIYA, N.; VAN DEN BOOM, D.; JENSEN, T. J.; FRIEDMAN, J. S.; SHEN, M. R.; CLEMENTE-VICARIO, F.; CHORNY, I.; TYNAN, J. A.; LYTLE, K. M.; HOLTVOIGT, L. E.; MURTAZA, M.; DIAZ, L. A.; TSUI, D. W. Y.; GROSU, D. S. Horizons in Veterinary Precision Oncology: Fundamentals of Cancer Genomics and Applications of Liquid Biopsy for the Detection, Characterization, and Management of Cancer in Dogs **Frontiers in Veterinary Science,** v. 8, 664718., mar. 2021.

CHILDRESS, M. O. Hematologic abnormalities in the small animal cancer patient. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 42, n. 1, p. 123–155, jan. 2012.

CHINEN, L. T. D.; DE CARVALHO, F. M.; ROCHA, B. M. M.; AGUIAR, C. M.; ABDALLAH, E. A.; CAMPANHA, D.; MINGUES, N. B.; DE OLIVEIRA, T. B.; MACIEL, M. S.; CERVANTES, G. M.; DETTINO, A. L. A.; SOARES, F. A.; PATERLINI-BRÉCHOT, P.; FANELLI, M. F. Cytokeratin-based CTC counting unrelated to clinical follow up. **Journal of Thoracic Disease**, v. 5, n. 5, p. 593–599, out. 2013.

CHINEN, L. T. D.; MELLO, C. A. L.; ABDALLAH, E. A.; OCEA, L. M. M.; BUIM, M. E.; BREVE, N. M.; GASPARINI, J. L.; FANELLI, M. F.; PATERLINI-BRÉCHOT, P. Isolation, detection, and immunomorphological characterization of circulating tumor cells (CTCs) from patients with different types of sarcoma using isolation by size of tumor cells: a window on sarcoma-cell invasion. **OncoTargets and therapy**, v. 7, p. 1609–1617, set. 2014.

CHO, H.; KIM, J.; SONG, H.; SOHN, K. Y.; JEON, M.; HAN, K. H. Microfluidic technologies for circulating tumor cell isolation. **The Analyst**, v. 143, n. 13, p. 2936–2970, jul. 2018.

CHOI, C.; KUSEWITT, D. F. Comparison of Tyrosinase-related Protein-2, S-100, and Melan A Immunoreactivity in Canine Amelanotic Melanomas Brief Communications and Case Reports **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 6, p. 713-8, nov. 2003

CIARDIELLO, C.; MIGLIORINO, R.; LEONE, A.; BUDILLON, A. Large extracellular vesicles: Size matters in tumor progression **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 52, p. 69-74, fev. 2020.

COLOMBE, P.; BÉGUIN, J.; BENCHEKROUN, G.; LE ROUX, D. Blood biomarkers for canine cancer, from human to veterinary oncology. **Veterinary and Comparative Oncology**, jul. 2022.

COLOMBO, J.; MOSCHETTA-PINHEIRO, M. G.; NOVAIS, A. A.; STOPPE, B. R.; BONINI, E. D.; GONÇALVES, F. M.; FUKUMASU, H.; COUTINHO, L. L.; CHUFFA, L. G. de A.; ZUCCARI, D. A. P. de C. Liquid biopsy as a diagnostic and prognostic tool for women and female dogs with breast cancer. **Cancers**, v. 13, n. 20, out. 2021.

CORDONNIER, M.; NARDIN, C.; CHANTELOUP, G.; DERANGERE, V.; ALGROS, M. P.; ARNOULD, L.; GARRIDO, C.; AUBIN, F.; GOBBO, J. Tracking the evolution of circulating exosomal-PD-L1 to monitor melanoma patients. **Journal of extracellular vesicles**, v. 9, n. 1, jan. 2020.

CRAIG, K. K. L.; WOOD, G. A.; KELLER, S. M.; MUTSAERS, A. J.; WOOD, R. D. MicroRNA profiling in canine multicentric lymphoma. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, p. e0226357, dez. 2019.

CREE, I. A. Liquid biopsy for cancer patients: Principles and practice **Pathogenesis**, v. 2, n. 1-2, p. 1-4, jul. 2015.

CRISTOFANILLI, M.; BUDD, G. T.; ELLIS, M. J.; STOPECK, A.; MATERA, J.; MILLER, M. C.; REUBEN, J. M.; DOYLE, G. v; ALLARD, W. J.; TERSTAPPEN, L. W. M. M.; HAYES, D. F. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 8, p. 781-91, ago 2004.

DA COSTA, A.; KOHN, B.; GRUBER, A. D.; KLOPFLEISCH, R. Multiple RT-PCR markers for the detection of circulating tumour cells of metastatic canine mammary tumours. **Veterinary Journal**, v. 196, n. 1, p. 34–39, abr. 2013.

DA COSTA, A.; LENZE, D.; HUMMEL, M.; KOHN, B.; GRUBER, A. D.; KLOPFLEISCH, R. Identification of Six Potential Markers for the Detection of Circulating Canine Mammary Tumour Cells in the Peripheral Blood Identified by Microarray Analysis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, n. 2–3, p. 143–151, fev. 2012.

DA COSTA, A.; OLIVEIRA, J. T.; GÄRTNER, F.; KOHN, B.; GRUBER, A. D.; KLOPFLEISCH, R. Potential markers for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 1, p. 165–168, out. 2011.

DE FREITAS, J. L.; DE ANDRADE, T. S.; FILHO, E. F. M.; D'SOARES, C. S.; DA SILVA NETO SOUZA, A. C.; DA SILVA, A. W. O.; LEAL, P. V.; DA CUNHA PEIXOTO, T. Causes of spontaneous death and euthanasia in dogs: A background study in Bahia, Brazil. **Veterinarni Medicina**, v. 66, n. 4, p. 156–166, abr. 2021.

DE OLIVEIRA, J. R.; COLOMBO, J.; GONÇALVES, F. M.; DE CARVALHO, L. A. L.; COSTA, D. S.; HENRIQUE, T.; NOVAIS, A. A.; MOSCHETTA-PINHEIRO, M. G.; CHUFFA, L. G. de A.; COUTINHO, L. L.; SANTANA, Á. E.; ZUCCARI, D. A. P. de C. Liquid biopsy can detect *BRCA2* gene variants in female dogs with mammary neoplasia. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 20, n. 1, p. 164–171, mar. 2022.

DENICOLA, D. B. Round Cells. *In*: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA, D. B. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**. 3. ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2009. p. 68–77.

DENIS, J. A.; GUILLERM, E.; COULET, F.; LARSEN, A. K.; LACORTE, J. M. The Role of BEAMing and Digital PCR for Multiplexed Analysis in Molecular Oncology in the Era of Next-Generation Sequencing. **Molecular Diagnosis and Therapy**, v. 21, n. 6, p. 587–600, dez. 2017.

DESITTER, I.; GUERROUAHEN, B. S.; BENALI-FURET, N.; WECHSLER, J.; JANNE, P. A.; KUANG, Y.; YANAGITA, M.; WANG, L.; BERKOWITZ, J. A.; DISTEL, R. J.; CAYRE, Y. E. A New Device for Rapid Isolation by Size and Characterization of Rare Circulating Tumor Cells. **Anticancer Research**, v. 31, p. 427–442, fev. 2011.

DIEFENBACH, R. J.; LEE, J. H.; STRBENAC, D.; YANG, J. Y. H.; MENZIES, A. M.; CARLINO, M. S.; LONG, G. v.; SPILLANE, A. J.; STRETCH, J. R.; SAW, R. P. M.; THOMPSON, J. F.; CH'NG, S.; SCOLYER, R. A.; KEFFORD, R. F.; RIZOS, H. Analysis of the Whole-Exome Sequencing of Tumor and Circulating Tumor DNA in Metastatic Melanoma. **Cancers**, v. 11, n. 12, dez. 2019.

DING, Z.; WANG, N.; JI, N.; CHEN, Z. S. Proteomics technologies for cancer liquid biopsies. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1–11, dez. 2022.

DOLFI, S. C.; LI, L.; CHAN, -Ying; QIU, J.; TEDESCHI, P. M.; BERTINO, J. R.; HIRSHFIELD, K. M.; OLTVAI, Z. N.; VAZQUEZ, A. The metabolic demands of cancer cells are coupled to their size and protein synthesis rates. **Cancer metabolism**, v. 1, n. 1, p. 20, nov 2013.

DOMÍNGUEZ-VIGIL, I. G.; MORENO-MARTÍNEZ, A. K.; WANG, J. Y.; ROEHRL, M. H. A.; BARRERA-SALDAÑA, H. A. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer **Oncotarget**, v. 9, n. 2, p. 2912-22, dez 2017.

DZWIERZYNSKI, W. W. Melanoma Risk Factors and Prevention **Clinics in Plastic Surgery**, v. 48, n. 4, p. 543-550, out. 2021.

EDWARDS, R. H.; WARD, M. R.; WU, H.; MEDINA, C. A.; BROSE, M. S.; VOLPE, P.; NUSSEN-LEE, S.; HAUPT, H. M.; MARTIN, A. M.; HERLYN, M.; LESSIN, S. R.; WEBER, B. L. Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas. **Journal of medical genetics**, v. 41, n. 4, p. 270–272, abr. 2004.

EREN, M. v; HWANG, J.; FIDEL, J.; SELLON, R.; DE SOUZA, C. Preliminary Evaluation of an Autologous Dendritic Cell Vaccine Using Nanoparticle Technology for the Treatment of Canine Malignant Melanoma. **American Journal of Biomedical and Life Sciences,** v. 9, n. 1, p. 84, jan. 2021.

FAVARO, P. F.; STEWART, S. D.; MCDONALD, B. R.; CAWLEY, J.; CONTENTE-CUOMO, T.; WONG, S.; HENDRICKS, W. P. D.; TRENT, J. M.; KHANNA, C.; MURTAZA, M. Feasibility of circulating tumor DNA analysis in dogs with naturally occurring malignant and benign splenic lesions. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, dez. 2022.

FDA. **cobas EGFR Mutation Test v2 | FDA**. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/cobas-egfr-mutation-test-v2>. Acesso em: 13 jul. 2022.

FDA. **FDA Approves Liquid Biopsy Next-Generation Sequencing Companion Diagnostic Test | FDA**. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-liquid-biopsy-next-generation-sequencing-companion-diagnostic-test>. Acesso em: 13 jul. 2022.

FERNÁNDEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, J. L. G.; GARCÍA, A. C.; MARTÍNEZ, A. C.; MIELGO-AYUSO, J.; CRUZ-HERNÁNDEZ, J. J. Liquid biopsy as novel tool in precision medicine: Origins, properties, identification and clinical perspective of cancer's biomarkers **Diagnostics (baseline)**, v. 10, n. 4, p. 215, abr. 2020.

FERRONE, S.; WHITESIDE, T. L. Targeting CSPG4 for isolation of melanoma cell-derived exosomes from body fluids. **HNO**, v. 68, n. 2, p. 100, fev. 2020.

FISH, E. J.; IRIZARRY, K. J.; DEINNOCENTES, P.; ELLIS, C. J.; PRASAD, N.; MOSS, A. G.; CURT BIRD, R. Malignant canine mammary epithelial cells shed exosomes containing differentially expressed microRNA that regulate oncogenic networks. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, ago. 2018.

FLEISCHHACKER, M.; SCHMIDT, B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer - A survey. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1775, n. 1, p. 181-232, jan. 2007.

FLEMING, J. M.; CREEVY, K. E.; PROMISLOW, D. E. L. Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related Causes of Death. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 2, p. 187–198, mar. 2011.

FONSECA-ALVES, C. E.; FERREIRA, Ê.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; STRAUSS, B. E.; FÁVARO, W. J.; DURÁN, N.; OYAFUSO DA CRUZ, N.; DOS SANTOS CUNHA, S. C.; CASTRO, J. L. C.; RANGEL, M. M. M.; BRUNNER, C. H. M.; TELLADO, M.; DOS ANJOS, D. S.; FERNANDES, S. C.; BARBOSA DE NARDI, A.; BIONDI, L. R.; DAGLI, M. L. Z. Current Status of Canine Melanoma Diagnosis and Therapy: Report From a Colloquium on Canine Melanoma Organized by ABROVET (Brazilian Association of Veterinary Oncology). **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, ago. 2021.

FORSCHNER, A.; BATTKE, F.; HADASCHIK, D.; SCHULZE, M.; WEISSGRAEBER, S.; HAN, C. T.; KOPP, M.; FRICK, M.; KLUMPP, B.; TIETZE, N.; AMARAL, T.; MARTUS, P.; SINNBERG, T.; EIGENTLER, T.; KEIM, U.; GARBE, C.; DÖCKER, D.; BISKUP, S. Tumor mutation burden and circulating tumor DNA in combined CTLA-4 and PD-1 antibody therapy in metastatic melanoma - results of a prospective biomarker study. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 7, n. 1, jul. 2019.

FORSCHNER, A.; WEISSGRAEBER, S.; HADASCHIK, D.; SCHULZE, M.; KOPP, M.; KELKENBERG, S.; SINNBERG, T.; GARBE, C.; BISKUP, S.; BATTKE, F. Circulating Tumor DNA Correlates with Outcome in Metastatic Melanoma Treated by BRAF and MEK Inhibitors – Results of a Prospective Biomarker Study. **OncoTargets and therapy**, v. 13, p. 5017, jun 2020.

FREEMAN, J. B.; GRAY, E. S.; MILLWARD, M.; PEARCE, R.; ZIMAN, M. Evaluation of a multi-marker immunomagnetic enrichment assay for the quantification of circulating melanoma cells. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, 15 set. 2012.

GALANZHA, E. I.; MENYAEV, Y. A.; YADEM, A. C.; SARIMOLLAOGLU, M.; JURATLI, M. A.; NEDOSEKIN, D. A.; FOSTER, S. R.; JAMSHIDI-PARSIAN, A.; SIEGEL, E. R.; MAKHOUL, I.; HUTCHINS, L. F.; SUEN, J. Y.; ZHAROV, V. P. In vivo liquid biopsy using Cytophone platform for photoacoustic detection of circulating tumor cells in patients with melanoma. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 496, jun. 2019.

GALE, D.; LAWSON, A. R. J.; HOWARTH, K.; MADI, M.; DURHAM, B.; SMALLEY, S.; CALAWAY, J.; BLAIS, S.; JONES, G.; CLARK, J.; DIMITROV, P.; PUGH, M.; WOODHOUSE, S.; EPSTEIN, M.; FERNANDEZ-GONZALEZ, A.; WHALE, A. S.; HUGGETT, J. F.; FOY, C. A.; JONES, G. M.; RAVEH-AMIT, H.; SCHMITT, K.; DEVONSHIRE, A.; GREEN, E.; FORSHEW, T.; PLAGNOL, V.; ROSENFELD, N. Development of a highly sensitive liquid biopsy platform to detect clinically-relevant cancer mutations at low allele fractions in cellfree DNA. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, 1 mar. 2018.

GARCIA, J. S.; HAZARBASSANOV, N. G. T. Q.; NAKAMURA, J. C.; NOWOSH, V.; COGLIATI, B.; DE SÁ, L. R. M.; MASSOCO, C. O. Evaluation of galectins 1 and 3 expression in canine melanoma. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 40, n. 12, p. 1010–1017, dez. 2020.

GARCIA, J. S.; NOWOSH, V.; LÓPEZ, R. V. M.; MASSOCO, C. de O. Association of Systemic Inflammatory and Immune Indices With Survival in Canine Patients With Oral Melanoma, Treated With Experimental Immunotherapy Alone or Experimental Immunotherapy Plus Metronomic Chemotherapy. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, jul. 2022.

GARNICA, T. K.; LESBON, J. C. C.; ÁVILA, A. C. F. C. M.; ROCHETTI, A. L.; MATIZ, O. R. S.; RIBEIRO, R. C. S.; ZOPPA, A.; NISHIYA, A. T.; COSTA, M. T.; DE NARDI, A. B.; ARGYLE, D. J.; STREFEZZI, R. F.; SILVEIRA, J. C.; FUKUMASU, H. Liquid biopsy based on small extracellular vesicles predicts chemotherapy response of canine multicentric lymphomas. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, dez. 2020.

GASCOYNE, P. R. C.; SHIM, S. Isolation of Circulating Tumor Cells by Dielectrophoresis. **Cancers 2014, Vol. 6, Pages 545-579**, v. 6, n. 1, p. 545–579, mar. 2014.

GELLRICH, F. F.; SCHMITZ, M.; BEISSERT, S.; MEIER, F. Anti-PD-1 and Novel Combinations in the Treatment of Melanoma-An Update. **Journal of clinical medicine**, v. 9, n. 1, jan. 2020. ecent Results Cancer Res

GERTLER, R.; ROSENBERG, R.; FUEHRER, K.; DAHM, M.; NEKARDA, H.; SIEWERT, J. R. Detection of Circulating Tumor Cells in Blood Using an Optimized Density Gradient Centrifugation. **Recent Results in Cancer Research**, v. 162, p. 149–155, 2003.

GILLARD, M.; CADIEU, E.; DE BRITO, C.; ABADIE, J.; VERGIER, B.; DEVAUCHELLE, P.; DEGORCE, F.; DRÉANO, S.; PRIMOT, A.; DORSO, L.; LAGADIC, M.; GALIBERT, F.; HÉDAN, B.; GALIBERT, M. D.; ANDRÉ, C. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 27, n. 1, p. 90–102, jan. 2014.

GOGOI, P.; SEPEHRI, S.; ZHOU, Y.; GORIN, M. A.; PAOLILLO, C.; CAPOLUONGO, E.; GLEASON, K.; PAYNE, A.; BONIFACE, B.; CRISTOFANILLI, M.; MORGAN, T. M.; FORTINA, P.; PIENTA, K. J.; HANDIQUE, K.; WANG, Y. Development of an Automated and Sensitive Microfluidic Device for Capturing and Characterizing Circulating Tumor Cells (CTCs) from Clinical Blood Samples. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147400, jan. 2016.

GONZALEZ, L. L.; GARRIE, K.; TURNER, M. D. Role of S100 proteins in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 6, p. 118677, jun. 2020.

GRAY, E. S.; RIZOS, H.; REID, A. L.; BOYD, S. C.; PEREIRA, M. R.; LO, J.; TEMBE, V.; FREEMAN, J.; LEE, J. H. J.; SCOLYER, R. A.; SIEW, K.; LOMMA, C.; COOPER, A.; KHATTAK, M. A.; MENIAWY, T. M.; LONG, G. v.; CARLINO, M. S.; MILLWARD, M.; ZIMAN, M. Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 39, p. 42008, dez. 2015.

GROBMAN, M.; OUTI, H.; RINDT, H.; REINERO, C. Serum Thymidine Kinase 1, Canine-C-Reactive Protein, Haptoglobin, and Vitamin D Concentrations in Dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia, Thrombocytopenia, and Polyarthropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 5, p. 1430–1440, set. 2017.

GRZYWA, T. M.; PASKAL, W.; WŁODARSKI, P. K. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. **Translational Oncology**, v. 10, n. 6, p. 956–975, dez. 2017.

GUO, W.; SUN, Y. F.; SHEN, M. N.; MA, X. L.; WU, J.; ZHANG, C. Y.; ZHOU, Y.; XU, Y.; HU, B.; ZHANG, M.; WANG, G.; CHEN, W. Q.; GUO, L.; LU, R. Q.; ZHOU, C. H.; ZHANG, X.; SHI, Y. H.; QIU, S. jian; PAN, B. shen; CAO, Y.; ZHOU, J.; YANG, X. R.; FAN, J. Circulating Tumor Cells with Stem-Like Phenotypes for Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Response Evaluation in Hepatocellular Carcinoma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 24, n. 9, p. 2203–2213, maio 2018.

GUPTA, V.; JAFFERJI, I.; GARZA, M.; MELNIKOVA, V. O.; HASEGAWA, D. K.; PETHIG, R.; DAVIS, D. W. ApoStream(TM), a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood. **Biomicrofluidics**, v. 6, n. 2, abr. 2012.

GURUNG, S.; PEROCHEAU, D.; TOURAMANIDOU, L.; BARUTEAU, J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling**. Cell Communication and Signaling**, v. 19, n. 1, p. 47, dez. 2021.

HAHN, K. A.; DENICOLA, D. B.; RICHARDSON, R. C.; HAHN, E. A. Canine oral malignant melanoma: Prognostic utility of an alternative staging system. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 5, p. 251–256, maio 1994.

HALL, B. J.; SCHMIDT, R. L.; SHARMA, R. R.; LAYFIELD, L. J. Fine-needle aspiration cytology for the diagnosis of metastatic melanoma: Systematic review and meta-analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 140, n. 5, p. 635-42, nov. 2013.

HAN, X.; WANG, J.; SUN, Y. **Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 15, n. 2, p. 59-72, abr. 2017.

HARB, W.; FAN, A.; TRAN, T.; DANILA, D. C.; KEYS, D.; SCHWARTZ, M.; IONESCU-ZANETTI, C. Mutational Analysis of Circulating Tumor Cells Using a Novel Microfluidic Collection Device and qPCR Assay. **Translational oncology**, v. 6, n. 5, p. 528–538, out. 2013.

HASELMANN, V.; GEBHARDT, C.; BRECHTEL, I.; DUDA, A.; CZERWINSKI, C.; SUCKER, A.; HOLLAND-LETZ, T.; UTIKAL, J.; SCHADENDORF, D.; NEUMAIER, M. Liquid Profiling of Circulating Tumor DNA in Plasma of Melanoma Patients for Companion Diagnostics and Monitoring of BRAF Inhibitor Therapy. **Clinical chemistry**, v. 64, n. 5, p. 830–842, maio 2018.

HEIDRICH, I.; AČKAR, L.; MOSSAHEBI MOHAMMADI, P.; PANTEL, K. Liquid biopsies: Potential and challenges. **International Journal of Cancer.** v. 148, n. 3, 528-545, fev. 2021.

HEITZER, E.; HAQUE, I. S.; ROBERTS, C. E. S.; SPEICHER, M. R. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 2, p. 71-88, fev. 2019.

HONG, X.; SULLIVAN, R. J.; KALINICH, M.; KWAN, T. T.; GIOBBIE-HURDER, A.; PAN, S.; LICAUSI, J. A.; MILNER, J. D.; NIEMAN, L. T.; WITTNER, B. S.; HO, U.; CHEN, T.; KAPUR, R.; LAWRENCE, D. P.; FLAHERTY, K. T.; SEQUIST, L. v.; RAMASWAMY, S.; MIYAMOTO, D. T.; LAWRENCE, M.; TONER, M.; ISSELBACHER, K. J.; MAHESWARAN, S.; HABER, D. A. Molecular signatures of circulating melanoma cells for monitoring early response to immune checkpoint therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 10, p. 2467–2472, mar. 2018.

HOSHIMOTO, S.; FARIES, M. B.; MORTON, D. L.; SHINGAI, T.; KUO, C.; WANG, H. J.; ELASHOFF, R.; MOZZILLO, N.; KELLEY, M. C.; THOMPSON, J. F.; LEE, J. E.; HOON, D. S. B. Assessment of prognostic circulating tumor cells in a phase III trial of adjuvant immunotherapy after complete resection of stage IV melanoma. **Annals of surgery**, v. 255, n. 2, p. 357–362, fev. 2012.

HOSOKAWA, M.; HAYATA, T.; FUKUDA, Y.; ARAKAKI, A.; YOSHINO, T.; TANAKA, T.; MATSUNAGA, T. Size-selective microcavity array for rapid and efficient detection of circulating tumor cells. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 15, p. 6629-35, ago 2010.

HOU, H. W.; WARKIANI, M. E.; KHOO, B. L.; LI, Z. R.; SOO, R. A.; TAN, D. S. W.; LIM, W. T.; HAN, J.; BHAGAT, A. A. S.; LIM, C. T. Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. **Scientific Reports 2013 3:1**, v. 3, n. 1, p. 1–8, fev. 2013.

HUANG, S. K.; HOON, D. S. B. Liquid biopsy utility for the surveillance of cutaneous malignant melanoma patients**. Molecular Oncology**, v. 10, n. 3, p. 450-63**,** mar. 2016.

HUANG, T.; JIA, C.-P.; SUN, W.-J.; WANG, W.-T.; ZHANG, H.-L.; CONG, H.; JING, F.-X.; MAO, H.-J.; JIN, Q.-H.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.-J.; LI, G.; MAO, G.-X.; ZHAO, J.-L. Highly sensitive enumeration of circulating tumor cells in lung cancer patients using a size-based filtration microfluidic chip. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 51, p. 213–218, jul 2013.

HURTADO, P.; MARTÍNEZ-PENA, I.; PIÑEIRO, R. Dangerous Liaisons: Circulating Tumor Cells (CTCs) and Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs). **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 1–23, out. 2020.

IGNATIADIS, M.; LEE, M.; JEFFREY, S. S. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA: Challenges and opportunities on the path to clinical utility. **Clinical Cancer Research**, v, 21, n. 21, p. 4786-800, nov. 2015.

IGNATIADIS, M.; SLEDGE, G. W.; JEFFREY, S. S. Liquid biopsy enters the clinic — implementation issues and future challenges. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 18, n. 5, p. 297-312, maio 2021.

ILIE, M.; HOFMAN, V.; LONG-MIRA, E.; SELVA, E.; VIGNAUD, J. M.; PADOVANI, B.; MOUROUX, J.; MARQUETTE, C. H.; HOFMAN, P. “Sentinel” circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **PloS one**, v. 9, n. 10, out. 2014.

IMPERIAL, R.; NAZER, M.; AHMED, Z.; KAM, A. E.; PLUARD, T. J.; BAHAJ, W.; LEVY, M.; KUZEL, T. M.; HAYDEN, D. M.; PAPPAS, S. G.; SUBRAMANIAN, J.; MASOOD, A. Matched Whole-Genome Sequencing (WGS) and Whole-Exome Sequencing (WES) of Tumor Tissue with Circulating Tumor DNA (ctDNA) Analysis: Complementary Modalities in Clinical Practice. **Cancers**, v. 11, n. 9, set. 2019.

IN 'T VELD, S. G. J. G.; WURDINGER, T. Tumor-educated platelets. **Blood**, v. 133, n. 22, p. 2359-64, maio 2019.

INOUE, M.; HASEGAWA, A.; HOSOI, Y.; SUGIURA, K. A current life table and causes of death for insured dogs in Japan. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 120, n. 2, p. 210–218, jun. 2015.

JEONG, K.-Y.; KIM, E.; PARK, M.; KIM, H. Perspective on Cancer Therapeutics Utilizing Analysis of Circulating Tumor Cells. **Diagnostics**, v. 8, n. 2, p. 23, abr. 2018.

JERGENS, A. E.; HOSTETTER, S. J.; ANDREASEN, C. B. Oral Cavity, Gastrointestinal Tract, and Associated Structures. *In*: RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Canine and Feline Cytology: a Color Atlas and Interpretation Guide**. 3. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016. p. 220–246.

JIANG, P.; LO, Y. M. D. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. **Trends in Genetics**, v. 32, n. 6, p. 360-71, jun. 2016.

JIN, E.; BURNIER, J. v. Liquid Biopsy in Uveal Melanoma: Are We There Yet? **Ocular oncology and pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, mar. 2021.

KAMIŃSKA, P.; BUSZKA, K.; ZABEL, M.; NOWICKI, M.; ALIX-PANABIÈRES, C.; BUDNA-TUKAN, J. Liquid biopsy in melanoma: Significance in diagnostics, prediction and treatment monitoring International. **Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9714, set. 2021.

KARABACAK, N. M.; SPUHLER, P. S.; FACHIN, F.; LIM, E. J.; PAI, V.; OZKUMUR, E.; MARTEL, J. M.; KOJIC, N.; SMITH, K.; CHEN, P. I.; YANG, J.; HWANG, H.; MORGAN, B.; TRAUTWEIN, J.; BARBER, T. A.; STOTT, S. L.; MAHESWARAN, S.; KAPUR, R.; HABER, D. A.; TONER, M. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. **Nature protocols**, v. 9, n. 3, p. 694, mar. 2014.

KASRAEIAN, S.; ALLISON, D. C.; AHLMANN, E. R.; FEDENKO, A. N.; MENENDEZ, L. R. A comparison of fine-needle aspiration, core biopsy, and surgical biopsy in the diagnosis of extremity soft tissue masses. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 468, n. 11, p. 2992-3002, nov. 2010.

KAZMIERSKI, K. J.; OGILVIE, G. K.; FETTMAN, M. J.; LANA, S. E.; WALTON, J. A.; HANSEN, R. A.; RICHARDSON, K. L.; HAMAR, D. W.; BEDWELL, C. L.; ANDREWS, G.; CHAVEY, S. Serum Zinc, Chromium, and Iron Concentrations in Dogs with Lymphoma and Osteosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 6, p. 585, jun. 2001.

KHAN, N.; KHAN, M. K.; ALMASAN, A.; SINGH, A. D.; MACKLIS, R. The Evolving Role of Radiation Therapy in the Management of Malignant Melanoma. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 80, n. 3, p. 645, jul. 2011.

KHOJA, L.; LORIGAN, P.; DIVE, C.; KEILHOLZ, U.; FUSI, A. Circulating tumour cells as tumour biomarkers in melanoma: Detection methods and clinical relevance. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 1, p. 33–39, jan. 2015.

KILGOUR, E.; ROTHWELL, D. G.; BRADY, G.; DIVE, C. Liquid Biopsy-Based Biomarkers of Treatment Response and Resistance. **Cancer Cell**, v. 37, n. 4, p. 485–495, abr. 2020.

KIRBY, B. J.; JODARI, M.; LOFTUS, M. S.; GAKHAR, G.; PRATT, E. D.; CHANEL-VOS, C.; GLEGHORN, J. P.; SANTANA, S. M.; LIU, H.; SMITH, J. P.; NAVARRO, V. N.; TAGAWA, S. T.; BANDER, N. H.; NANUS, D. M.; GIANNAKAKOU, P. Functional characterization of circulating tumor cells with a prostate-cancer-specific microfluidic device. **PloS one**, v. 7, n. 4, abr. 2012.

KLINAC, D.; GRAY, E. S.; FREEMAN, J. B.; REID, A.; BOWYER, S.; MILLWARD, M.; ZIMAN, M. Monitoring changes in circulating tumour cells as a prognostic indicator of overall survival and treatment response in patients with metastatic melanoma. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 423, jun. 2014.

KODAHL, A. R.; EHMSEN, S.; PALLISGAARD, N.; JYLLING, A. M. B.; JENSEN, J. D.; LÆNKHOLM, A. V.; KNOOP, A. S.; DITZEL, H. J. Correlation between circulating cell-free PIK3CA tumor DNA levels and treatment response in patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 12, n. 6, p. 925, jun. 2018.

KONOSHENKO, M. Y.; LEKCHNOV, E. A.; VLASSOV, A. v.; LAKTIONOV, P. P. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends**.** **BioMed Research International**, p. 8545347, jan. 2018.

KOYANAGI, K.; KUO, C.; NAKAGAWA, T.; MORI, T.; UENO, H.; LORICO, A. R.; WANG, H. J.; HSEUH, E.; O'DAY, S. J.; HOON, D. S. B. Multimarker quantitative real-time PCR detection of circulating melanoma cells in peripheral blood: Relation to disease stage in melanoma patients. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 981–988, jun. 2005.

KRZYSZCZYK, P.; ACEVEDO, A.; DAVIDOFF, E. J.; TIMMINS, L. M.; MARRERO-BERRIOS, I.; PATEL, M.; WHITE, C.; LOWE, C.; SHERBA, J. J.; HARTMANSHENN, C.; O'NEILL, K. M.; BALTER, M. L.; FRITZ, Z. R.; ANDROULAKIS, I. P.; SCHLOSS, R. S.; YARMUSH, M. L. The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment. **TECHNOLOGY**, v. 06, n. 03-04, p. 79–100, set. 2018.

LANDEGREN, U.; HAMMOND, M. Cancer diagnostics based on plasma protein biomarkers: hard times but great expectations. **Molecular Oncology**, v. 15, n. 6, p. 1715–1726, jun. 2021.

LAPRIE, C.; ABADIE, J.; AMARDEILH, M. -F.; NET, J. -L. L. E.; LAGADIC, M.; DELVERDIER, M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. **Veterinary Dermatology**, v. 12, n. 3, p. 139–147, jun. 2001.

LARSON, M. H.; PAN, W.; KIM, H. J.; MAUNTZ, R. E.; STUART, S. M.; PIMENTEL, M.; ZHOU, Y.; KNUDSGAARD, P.; DEMAS, V.; ARAVANIS, A. M.; JAMSHIDI, A. A comprehensive characterization of the cell-free transcriptome reveals tissue- and subtype-specific biomarkers for cancer detection. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–11, abr. 2021.

LAVALLE, G. E.; CAIRES, C. E. T.; TEIXEIRA, S. V.; CUNHA, R. M. de C.; CARNEIRO, R. A. Treatment of Canine Oral Melanoma with Adjuvant Chemotherapy and Immunotherapy. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, jan. 2021.

LEE, K.-H.; SHIN, T.-J.; KIM, W.-H.; CHO, J.-Y. Methylation of LINE-1 in cell-free DNA serves as a liquid biopsy biomarker for human breast cancers and dog mammary tumors. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 175, dez. 2019.

LETENDRE, J. A.; GOGGS, R. Measurement of plasma cell-free DNA concentrations in dogs with sepsis, trauma, and neoplasia. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 27, n. 3, p. 307–314, maio 2017.

LI, P.; MAO, Z.; PENG, Z.; ZHOU, L.; CHEN, Y.; HUANG, P.-H.; TRUICA, C. I.; DRABICK, J. J.; EL-DEIRY, W. S.; DAO, M.; SURESH, S.; HUANG, T. J. Acoustic separation of circulating tumor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 16, p. 4970–4975, abr. 2015.

LI, P.; QIN, P.; FU, X.; ZHANG, G.; YAN, X.; ZHANG, M.; ZHANG, X.; YANG, J.; WANG, H.; MA, Z. Associations between peripheral blood lymphocyte subsets and clinical outcomes in patients with lung cancer treated with immune checkpoint inhibitor. **Annals of Palliative Medicine**, v. 10, n. 3, p. 3039–3049, mar. 2021.

LI, W.; ZHANG, X.; LU, X.; YOU, L.; SONG, Y.; LUO, Z.; ZHANG, J.; NIE, J.; ZHENG, W.; XU, D.; WANG, Y.; DONG, Y.; YU, S.; HONG, J.; SHI, J.; HAO, H.; LUO, F.; HUA, L.; WANG, P.; QIAN, X.; YUAN, F.; WEI, L.; CUI, M.; ZHANG, T.; LIAO, Q.; DAI, M.; LIU, Z.; CHEN, G.; MECKEL, K.; ADHIKARI, S.; JIA, G.; BISSONNETTE, M. B.; ZHANG, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, W.; HE, C.; LIU, J. 5-Hydroxymethylcytosine signatures in circulating cell-free DNA as diagnostic biomarkers for human cancers. **Cell Research**, v. 27, n. 10, p. 1243–1257, out. 2017.

LI, X.; LI, Y.; SHAO, W.; LI, Z.; ZHAO, R.; YE, Z. Strategies for enrichment of circulating tumor cells**. Translational Cancer Research**, v. 9, n. 3, p. 2012-2025, mar. 2020.

LIN, P. P. Integrated EpCAM-independent subtraction enrichment and iFISH strategies to detect and classify disseminated and circulating tumors cells. **Clinical and Translational Medicine**, v. 4, n. 1, p. 38, dez. 2015.

LIN, P. P.; GIRES, O.; WANG, D. D.; LI, L.; WANG, H. Comprehensive in situ co-detection of aneuploid circulating endothelial and tumor cells. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–10, ago. 2017.

LIU, J.; CHEN, Y.; PEI, F.; ZENG, C.; YAO, Y.; LIAO, W.; ZHAO, Z. Extracellular Vesicles in Liquid Biopsies: Potential for Disease Diagnosis**. BioMed Research International**, p. 6611244, jan. 2021.

LOEIAN, M. S.; MEHDI AGHAEI, S.; FARHADI, F.; RAI, V.; YANG, H. W.; JOHNSON, M. D.; AQIL, F.; MANDADI, M.; RAI, S. N.; PANCHAPAKESAN, B. Liquid biopsy using the nanotube-CTC-chip: capture of invasive CTCs with high purity using preferential adherence in breast cancer patients. **Lab on a Chip**, v. 19, n. 11, p. 1899–1915, maio 2019.

LOGOZZI, M.; DI RAIMO, R.; MIZZONI, D.; FAIS, S. Immunocapture-based ELISA to characterize and quantify exosomes in both cell culture supernatants and body fluids. **Methods in enzymology**, v. 645, p. 155–180, jan. 2020.

LOMNYTSKA, M.; PINTO, R.; BECKER, S.; ENGSTRÖM, U.; GUSTAFSSON, S.; BJÖRKLUND, C.; TEMPLIN, M.; BERGSTRAND, J.; XU, L.; WIDENGREN, J.; EPSTEIN, E.; FRANZÉN, B.; AUER, G. Platelet protein biomarker panel for ovarian cancer diagnosis. **Biomarker Research**, v. 6, n. 1, p. 2, dez. 2018.

LONG, G. v.; STROYAKOVSKIY, D.; GOGAS, H.; LEVCHENKO, E.; DE BRAUD, F.; LARKIN, J.; GARBE, C.; JOUARY, T.; HAUSCHILD, A.; GROB, J. J.; CHIARION SILENI, V.; LEBBE, C.; MANDALÀ, M.; MILLWARD, M.; ARANCE, A.; BONDARENKO, I.; HAANEN, J. B. A. G.; HANSSON, J.; UTIKAL, J.; FERRARESI, V.; KOVALENKO, N.; MOHR, P.; PROBACHAI, V.; SCHADENDORF, D.; NATHAN, P.; ROBERT, C.; RIBAS, A.; DEMARINI, D. J.; IRANI, J. G.; CASEY, M.; OUELLET, D.; MARTIN, A.-M.; LE, N.; PATEL, K.; FLAHERTY, K. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 371, n. 20, p. 1877–1888, nov. 2014.

LOUTHERBACK, K.; D'SILVA, J.; LIU, L.; WU, A.; AUSTIN, R. H.; STURM, J. C. Deterministic separation of cancer cells from blood at 10 mL/min. **AIP Advances**, v. 2, n. 4, p. 042107, out. 2012.

LUNAVAT, T. R.; CHENG, L.; EINARSDOTTIR, B. O.; OLOFSSON BAGGE, R.; VEPPIL MURALIDHARAN, S.; SHARPLES, R. A.; LÄSSER, C.; GHO, Y. S.; HILL, A. F.; NILSSON, J. A.; LÖTVALL, J. BRAF ^{V600} inhibition alters the microRNA cargo in the vesicular secretome of malignant melanoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 29, jul. 2017.

LUSTBERG, M. B.; BALASUBRAMANIAN, P.; MILLER, B.; GARCIA-VILLA, A.; DEIGHAN, C.; WU, Y.; CAROTHERS, S.; BERGER, M.; RAMASWAMY, B.; MACRAE, E. R.; WESOLOWSKI, R.; LAYMAN, R. M.; MROZEK, E.; PAN, X.; SUMMERS, T. A.; SHAPIRO, C. L.; CHALMERS, J. J. Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. 1–15, mar. 2014.

MA, Y.; XIA, R.; MA, X.; JUDSON-TORRES, R. L.; ZENG, H. Mucosal Melanoma: Pathological Evolution, Pathway Dependency and Targeted Therapy. **Frontiers in Oncology.** v. 11, p. 702287, jul. 2021.

MADAMA, D.; MARTINS, R.; PIRES, A. S.; BOTELHO, M. F.; ALVES, M. G.; ABRANTES, A. M.; CORDEIRO, C. R. Metabolomic Profiling in Lung Cancer: A Systematic Review. **Metabolites**, v. 11, n. 9, set. 2021.

MARCONATO, L.; FACCHINETTI, A.; ZANARDELLO, C.; ROSSI, E.; VIDOTTO, R.; CAPELLO, K.; MELCHIOTTI, E.; LAGANGA, P.; ZAMARCHI, R.; VASCELLARI, M. Detection and Prognostic Relevance of Circulating and Disseminated Tumour Cell in Dogs with Metastatic Mammary Carcinoma: A Pilot Study. **Cancers**, v. 11, n. 2, p. 163, fev. 2019.

MARGUE, C.; REINSBACH, S.; PHILIPPIDOU, D.; BEAUME, N.; WALTERS, C.; SCHNEIDER, J. G.; NASHAN, D.; BEHRMANN, I.; KREIS, S. Comparison of a healthy miRNome with melanoma patient miRNomes: are microRNAs suitable serum biomarkers for cancer? **Oncotarget**, v. 6, n. 14, p. 12110–12127, maio 2015.

MARQUETTE, C. H.; BOUTROS, J.; BENZAQUEN, J.; *et al.* Circulating tumour cells as a potential biomarker for lung cancer screening: a prospective cohort study. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 7, p. 709–716, jul. 2020.

MARTINS, I.; RIBEIRO, I. P.; JORGE, J.; GONÇALVES, A. C.; SARMENTO-RIBEIRO, A. B.; MELO, J. B.; CARREIRA, I. M. Liquid biopsies: Applications for cancer diagnosis and monitoring. **Genes**, v. 12, n. 3, p. 349, mar. 2021.

MCEVOY, A. C.; WARBURTON, L.; AL-OGAILI, Z.; CELLIERS, L.; CALAPRE, L.; PEREIRA, M. R.; KHATTAK, M. A.; MENIAWY, T. M.; MILLWARD, M.; ZIMAN, M.; GRAY, E. S. Correlation between circulating tumour DNA and metabolic tumour burden in metastatic melanoma patients. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 726, dez. 2018.

MESSICK, J. B. The Lymph Nodes. *In*: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA, D. B. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**. 3. ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2009. p. 179–192.

MINHAHN, H.; GEUNLEE, K.; CHOI, W.; CHEONG, S. H.; MYUNG, K. B.; HAHN, H. J. An updated review of mucosal melanoma: Survival meta-analysis. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 11, n. 2, p. 116–126, ago. 2019.

MITCHELL, P. S.; PARKIN, R. K.; KROH, E. M.; FRITZ, B. R.; WYMAN, S. K.; POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L.; PETERSON, A.; NOTEBOOM, J.; O'BRIANT, K. C.; ALLEN, A.; LIN, D. W.; URBAN, N.; DRESCHER, C. W.; KNUDSEN, B. S.; STIREWALT, D. L.; GENTLEMAN, R.; VESSELLA, R. L.; NELSON, P. S.; MARTIN, D. B.; TEWARI, M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 30, p. 10513–10518, jul. 2008.

MOCELLIN, S.; DEL FIORE, P.; GUARNIERI, L.; SCALERTA, R.; FOLETTO, M.; CHIARION, V.; PILATI, P.; NITTI, D.; LISE, M.; ROSSI, C. R. Molecular detection of circulating tumor cells is an independent prognostic factor in patients with high-risk cutaneous melanoma. **International journal of cancer**, v. 111, n. 5, p. 741–745, 20 set. 2004.

MOCHIZUKI, H.; KENNEDY, K.; SHAPIRO, S. G.; BREEN, M. B. BRAF mutations in canine cancers. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, jun. 2015.

MODIANO, J. F.; RITT, M. G.; WOJCIESZYN, J. The Molecular Basis of Canine Melanoma: Pathogenesis and Trends in Diagnosis and Therapy **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 163-74, maio-jun. 1999.

MOHAN, S.; CHEMI, F.; BRADY, G. Challenges and unanswered questions for the next decade of circulating tumour cell research in lung cancer. **Translational Lung Cancer Research,** v. 6, n. 4, p. 454-472, ago. 2017.

MOON, S.; SHIN, D. W.; KIM, S.; LEE, Y. S.; MANKHONG, S.; YANG, S. W.; LEE, P. H.; PARK, D. H.; KWAK, H. B.; LEE, J. S.; KANG, J. H. Enrichment of exosome-like extracellular vesicles from plasma suitable for clinical vesicular mirna biomarker research. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 11, nov. 2019.

MORICI, M.; LIN, W.; GRAY, E. S. Transcript-Based Detection of Circulating Melanoma Cells. *In*: **Methods in Molecular Biology**, v. 2265, p. 235-45, 2021.

MOSES, L.; NIEMI, S.; KARLSSON, E. Pet genomics medicine runs wild. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 470–472, jul. 2018.

MURAKAMI, A.; MORI, T.; SAKAI, H.; MURAKAMI, M.; YANAI, T.; HOSHINO, Y.; MARUO, K. Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral malignant melanomas. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 9, n. 3, p. 219–224, set. 2011.

NAGRATH, S.; SEQUIST, L. v.; MAHESWARAN, S.; BELL, D. W.; IRIMIA, D.; ULKUS, L.; SMITH, M. R.; KWAK, E. L.; DIGUMARTHY, S.; MUZIKANSKY, A.; RYAN, P.; BALIS, U. J.; TOMPKINS, R. G.; HABER, D. A.; TONER, M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. **Nature**, v. 450, n. 7173, p. 1235–1239, dez. 2007.

NAIK, P. P. Cutaneous Malignant Melanoma: A Review of Early Diagnosis and Management. **World Journal of Oncology**, v. 12, n. 1, p. 7–19, fev. 2021.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **NCI Dictionary of Cancer Terms: http://www.cancer.gov/dictionary**. Disponível em: <https://www.nlm.nih.gov/research/umls/sourcereleasedocs/current/NCI_NCI-GLOSS/index.html>. Acesso em: 6 jul. 2022.

NEUMANN, M. H. D.; BENDER, S.; KRAHN, T.; SCHLANGE, T. ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy - Current Status and Where We Need to Progress. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 16, p. 190–195, jan. 2018.

NEWELL, F.; KONG, Y.; WILMOTT, J. S.; JOHANSSON, P. A.; FERGUSON, P. M.; CUI, C.; LI, Z.; KAZAKOFF, S. H.; BURKE, H.; DODDS, T. J.; PATCH, A. M.; NONES, K.; TEMBE, V.; SHANG, P.; VAN DER WEYDEN, L.; WONG, K.; HOLMES, O.; LO, S.; LEONARD, C.; WOOD, S.; XU, Q.; RAWSON, R. v.; MUKHOPADHYAY, P.; DUMMER, R.; LEVESQUE, M. P.; JÖNSSON, G.; WANG, X.; YEH, I.; WU, H.; JOSEPH, N.; BASTIAN, B. C.; LONG, G. v.; SPILLANE, A. J.; SHANNON, K. F.; THOMPSON, J. F.; SAW, R. P. M.; ADAMS, D. J.; SI, L.; PEARSON, J. v.; HAYWARD, N. K.; WADDELL, N.; MANN, G. J.; GUO, J.; SCOLYER, R. A. Whole-genome landscape of mucosal melanoma reveals diverse drivers and therapeutic targets. **Nature Communications 2019 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–15, jul. 2019.

NILSSON, R. J. A.; BALAJ, L.; HULLEMAN, E.; VAN RIJN, S.; PEGTEL, D. M.; WALRAVEN, M.; WIDMARK, A.; GERRITSEN, W. R.; VERHEUL, H. M.; VANDERTOP, W. P.; NOSKE, D. P.; SKOG, J.; WÜRDINGER, T. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. **Blood**, v. 118, n. 13, p. 3680–3683, set. 2011.

NISHIYA, A. T.; MASSOCO, C. O.; FELIZZOLA, C. R.; PERLMANN, E.; BATSCHINSKI, K.; TEDARDI, M. V.; GARCIA, J. S.; MENDONÇA, P. P.; TEIXEIRA, T. F.; DAGLI, M. L. Z. Comparative aspects of canine melanoma**. Veterinary Sciences**, v. 3, n. 1, p. 7, mar. 2016.

O'LEARY, B.; HREBIEN, S.; BEANEY, M.; FRIBBENS, C.; GARCIA-MURILLAS, I.; JIANG, J.; LI, Y.; BARTLETT, C. H.; ANDRÉ, F.; LOIBL, S.; LOI, S.; CRISTOFANILLI, M.; TURNER, N. C. Comparison of beaming and droplet digital PCR for circulating tumor DNA analysis. **Clinical Chemistry**, v. 65, n. 11, p. 1405–1413, nov. 2019.

OLSSON, E.; WINTER, C.; GEORGE, A.; CHEN, Y.; HOWLIN, J.; TANG, M. E.; DAHLGREN, M.; SCHULZ, R.; GRABAU, D.; WESTEN, D.; FERNÖ, M.; INGVAR, C.; ROSE, C.; BENDAHL, P.; RYDÉN, L.; BORG, Å.; GRUVBERGER-SAAL, S. K.; JERNSTRÖM, H.; SAAL, L. H. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 8, p. 1034–1047, ago. 2015.

OSAKI, M.; OKADA, F. Exosomes and their role in cancer progression. **Yonago Acta Medica**, v. 62, n. 2, p. 182-190, jun. 2019.

OTTNOD, J. M.; SMEDLEY, R. C.; WALSHAW, R.; HAUPTMAN, J. G.; KIUPEL, M.; OBRADOVICH, J. E. A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. **Veterinary and comparative oncology**, v. 11, n. 3, p. 219–229, set. 2013.

PANTEL, K.; ALIX-PANABIÈRES, C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 7, p. 409-424, jul. 2019.

PANTEL, K.; SPEICHER, M. R. The biology of circulating tumor cells**. Oncogene**, v. 35, n. 10, p. 1216-24, mar. 2016.

PAOLONI, M. C.; KHANNA, C. Comparative Oncology Today. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 37, n. 6, p. 1023–1032, nov. 2007.

PENEDER, P.; STÜTZ, A. M.; SURDEZ, D.; KRUMBHOLZ, M.; SEMPER, S.; CHICARD, M.; SHEFFIELD, N. C.; PIERRON, G.; LAPOUBLE, E.; TÖTZL, M.; ERGÜNER, B.; BARRECA, D.; RENDEIRO, A. F.; AGAIMY, A.; BOZTUG, H.; ENGSTLER, G.; DWORZAK, M.; BERNKOPF, M.; TASCHNER-MANDL, S.; AMBROS, I. M.; MYKLEBOST, O.; MAREC-BÉRARD, P.; BURCHILL, S. A.; BRENNAN, B.; STRAUSS, S. J.; WHELAN, J.; SCHLEIERMACHER, G.; SCHAEFER, C.; DIRKSEN, U.; HUTTER, C.; BOYE, K.; AMBROS, P. F.; DELATTRE, O.; METZLER, M.; BOCK, C.; TOMAZOU, E. M. Multimodal analysis of cell-free DNA whole-genome sequencing for pediatric cancers with low mutational burden. **Nature Communications 2021 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–16, maio 2021.

PEZZICOLI, G.; TUCCI, M.; LOVERO, D.; SILVESTRIS, F.; PORTA, C.; MANNAVOLA, F. Large extracellular vesicles—a new frontier of liquid biopsy in oncology**. International Journal of Molecular Sciences.** v. 21, n. 18, p. 6543, set. 2020.

PHALLEN, J.; SAUSEN, M.; ADLEFF, V.; LEAL, A.; HRUBAN, C.; WHITE, J.; ANAGNOSTOU, V.; FIKSEL, J.; CRISTIANO, S.; PAPP, E.; SPEIR, S.; REINERT, T.; ORNTOFT, M.-B. W.; WOODWARD, B. D.; MURPHY, D.; PARPART-LI, S.; RILEY, D.; NESSELBUSH, M.; SENGAMALAY, N.; GEORGIADIS, A.; LI, Q. K.; MADSEN, M. R.; MORTENSEN, F. V.; HUISKENS, J.; PUNT, C.; VAN GRIEKEN, N.; FIJNEMAN, R.; MEIJER, G.; HUSAIN, H.; SCHARPF, R. B.; DIAZ, L. A.; JONES, S.; ANGIUOLI, S.; ØRNTOFT, T.; NIELSEN, H. J.; ANDERSEN, C. L.; VELCULESCU, V. E. C A N C E R Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 403, p. eaan2415, ago. 2017.

PHILIPONE, E.; KELSCH, R.; WU, J.; FANTASIA, J. Lymph Node Melanophages Mimicking Metastatic Melanoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 103, n. 4, p. e28, abr. 2007.

POULET, G.; MASSIAS, J.; TALY, V. Liquid Biopsy: General Concepts. Acta **Cytologica**, v. 63, n. 6, p. 449-55, out. 2019.

POWELL, A. A.; TALASAZ, A. H.; ZHANG, H.; CORAM, M. A.; REDDY, A.; DENG, G.; TELLI, M. L.; ADVANI, R. H.; CARLSON, R. W.; MOLLICK, J. A.; SHETH, S.; KURIAN, A. W.; FORD, J. M.; STOCKDALE, F. E.; QUAKE, S. R.; PEASE, R. F.; MINDRINOS, M. N.; BHANOT, G.; DAIRKEE, S. H.; DAVIS, R. W.; JEFFREY, S. S. Single Cell Profiling of Circulating Tumor Cells: Transcriptional Heterogeneity and Diversity from Breast Cancer Cell Lines. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e33788, maio 2012.

PROUTEAU, A.; ANDRÉ, C. Canine melanomas as models for human melanomas: Clinical, histological, and genetic comparison. **Genes**, v. 10, n. 7, p. 501. jul. 2019.

PROUTEAU, A.; DENIS, J. A.; DE FORNEL, P.; CADIEU, E.; DERRIEN, T.; KERGAL, C.; BOTHEREL, N.; ULVÉ, R.; RAULT, M.; BOUZIDI, A.; FRANÇOIS, R.; DORSO, L.; LESPAGNOL, A.; DEVAUCHELLE, P.; ABADIE, J.; ANDRÉ, C.; HÉDAN, B. Circulating tumor DNA is detectable in canine histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma, and multicentric lymphoma. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 877, dez. 2021.

PRZEŹDZIECKI, R.; CZOPOWICZ, M.; SAPIERZYŃSKI, R. Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic melanomas in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 44, n. 4, p. 597–604, dez. 2015.

RACK, B.; SCHINDLBECK, C.; JÜCKSTOCK, J.; ANDERGASSEN, U.; HEPP, P.; ZWINGERS, T.; FRIEDL, T. W. P.; LORENZ, R.; TESCH, H.; FASCHING, P. A.; FEHM, T.; SCHNEEWEISS, A.; LICHTENEGGER, W.; BECKMANN, M. W.; FRIESE, K.; PANTEL, K.; JANNI, W. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 5, maio 2014.

RAMOS-VARA, J. A. Principles and methods of immunohistochemistry. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 691, p. 83–96, set. 2011.

RAMOS-VARA, J. A.; BEISSENHERZ, M. E.; MILLER, M. A.; JOHNSON, G. C.; PACE, L. W.; FARD, A.; KOTTLER, S. J. Retrospective Study of 338 Canine Oral Melanomas with Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Review of 129 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597-608, nov. 2000.

RAO, C.; BUI, T.; CONNELLY, M.; DOYLE, G.; KARYDIS, I.; MIDDLETON, M. R.; CLACK, G.; MALONE, M.; COUMANS, F. A. W.; TERSTAPPEN, L. W. M. M. Circulating melanoma cells and survival in metastatic melanoma. **International Journal of Oncology**, v. 38, n. 3, p. 755–760, mar. 2011.

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

RIAHI, R.; GOGOI, P.; SEPEHRI, S.; ZHOU, Y.; HANDIQUE, K.; GODSEY, J.; WANG, Y. A novel microchannel-based device to capture and analyze circulating tumor cells (CTCs) of breast cancer. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 6, p. 1870, jun. 2014.

RIFAI, N.; GILLETTE, M. A.; CARR, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 971–983, ago. 2006.

ROCHAIX, P.; LACROIX-TRIKI, M.; LAMANT, L.; PICHEREAUX, C.; VALMARY, S.; PUENTE, E.; AL SAATI, T.; MONSARRAT, B.; SUSINI, C.; BUSCAIL, L.; DELSOL, G.; VOIGT, J. J. PNL2, a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant melanocyte antigen. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 16, n. 5, p. 481–490, maio 2003.

ROLIM, V. M.; CASAGRANDE, R. A.; WATANABE, T. T.; WOUTERS, A. T.; WOUTERS, F.; SONNE, L.; DRIEMEIER, D. Melanoma amelanótico em cães: estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 340–346, abr. 2004.

ROSENBERG, R.; GERTLER, R.; FRIEDERICHS, J.; FUEHRER, K.; DAHM, M.; PHELPS, R.; THORBAN, S.; NEKARDA, H.; SIEWERT, J. R. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. **Cytometry**, v. 49, n. 4, p. 150–158, dez. 2002.

ROSSI, G.; IGNATIADIS, M. Promises and pitfalls of using liquid biopsy for precision medicine **Cancer Research**, v. 79, n. 11, p. 2798-804, jun. 2019.

SABRKHANY, S.; KUIJPERS, M. J. E.; KNOL, J. C.; OLDE DAMINK, S. W. M.; DINGEMANS, A. M. C.; VERHEUL, H. M.; PIERSMA, S. R.; PHAM, T. v.; GRIFFIOEN, A. W.; OUDE EGBRINK, M. G. A.; JIMENEZ, C. R. Exploration of the platelet proteome in patients with early-stage cancer. **Journal of proteomics**, v. 177, p. 65–74, abr. 2018.

SAELLSTRÖM, S.; SHARIF, H.; JAGARLAMUDI, K. K.; RÖNNBERG, H.; WANG, L.; ERIKSSON, S. Serum TK1 protein and C-reactive protein correlate to treatment response and predict survival in dogs with hematologic malignancies. **Research in veterinary science**, v. 145, p. 213–221, jul. 2022.

SAHNI, S.; VALECHA, G.; SAHNI, A. Role of Anti-PD-1 Antibodies in Advanced Melanoma: The Era of Immunotherapy. **Cureus**, v. 10, n. 12, dez. 2018.

SANMAMED, M. F.; FERNÁNDEZ-LANDÁZURI, S.; RODRÍGUEZ, C.; ZÁRATE, R.; LOZANO, M. D.; ZUBIRI, L.; PEREZ-GRACIA, J. L.; MARTÍN-ALGARRA, S.; GONZÁLEZ, A. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. **Clinical chemistry**, v. 61, n. 1, p. 297–304, jan. 2015.

SAUCEDO-ZENI, N.; MEWES, S.; NIESTROJ, R.; GASIOROWSKI, L.; MURAWA, D.; NOWACZYK, P.; TOMASI, T.; WEBER, E.; DWORACKI, G.; MORGENTHALER, N. G.; JANSEN, H.; PROPPING, C.; STERZYNSKA, K.; DYSZKIEWICZ, W.; ZABEL, M.; KIECHLE, M.; REUNING, U.; SCHMITT, M.; LÜCKE, K. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. **International journal of oncology**, v. 41, n. 4, p. 1241–1250, out. 2012.

SCHWAEDERLE, M.; HUSAIN, H.; FANTA, P. T.; PICCIONI, D. E.; KESARI, S.; SCHWAB, R. B.; PATEL, S. P.; HARISMENDY, O.; IKEDA, M.; PARKER, B. A.; KURZROCK, R. Use of Liquid Biopsies in Clinical Oncology: Pilot Experience in 168 Patients. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 22, p. 5497–5505, nov. 2016.

SENHORELLO, I. L. S.; TERRA, E. M.; SUEIRO, F. A. R.; FIRMO, B. F.; ANAI, L. A.; GOLONI, C.; CANAVARI, I. C.; AMPUERO, R. A. N.; PEREIRA, R. S.; TINUCCI-COSTA, M. Clinical value of carcinoembryonic antigen in mammary neoplasms of bitches. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 3, p. 315–323, set. 2020.

SEREMET, T.; JANSEN, Y.; PLANKEN, S.; NJIMI, H.; DELAUNOY, M.; EL HOUSNI, H.; AWADA, G.; SCHWARZE, J. K.; KEYAERTS, M.; EVERAERT, H.; LIENARD, D.; DEL MARMOL, V.; HEIMANN, P.; NEYNS, B. Undetectable circulating tumor DNA (ctDNA) levels correlate with favorable outcome in metastatic melanoma patients treated with anti-PD1 therapy. **Journal of translational medicine**, v. 17, n. 1, set. 2019.

SHARMA, S.; ZHUANG, R.; LONG, M.; PAVLOVIC, M.; KANG, Y.; ILYAS, A.; ASGHAR, W. Circulating Tumor Cell Isolation, Culture, and Downstream Molecular Analysis. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 4, p. 1063, jul. 2018.

SILVEIRA, T. L.; PANG, L. Y.; DI DOMENICO, A.; VELOSO, E. S.; SILVA, I. L. D.; PUERTO, H. L. D.; FERRERIA, E.; ARGYLE, D. J. COX-2 Silencing in Canine Malignant Melanoma Inhibits Malignant Behaviour. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, ago. 2021.

SIRAVEGNA, G.; MARSONI, S.; SIENA, S.; BARDELLI, A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer**. Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n p. 531-48, set. 2017.

SMEDLEY, R. C.; BONGIOVANNI, L.; BACMEISTER, C.; CLIFFORD, C. A.; CHRISTENSEN, N.; DREYFUS, J. M.; GARY, J. M.; PAVUK, A.; ROWLAND, P. H.; SWANSON, C.; TRIPP, C.; WOODS, J. P.; BERGMAN, P. J. Diagnosis and histopathologic prognostication of canine melanocytic neoplasms: A consensus of the Oncology-Pathology Working Group. **Veterinary and Comparative Oncology**, *epub ahead of print*, mai. 2022.

SMEDLEY, R. C.; LAMOUREUX, J.; SLEDGE, D. G.; KIUPEL, M. Immunohistochemical diagnosis of canine oral amelanotic melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 32–40, jan. 2011.

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M. A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms. **Veterinary Pathology**. v. 39, n. 6, p. 651-78, nov 2002.

SONG, C. X.; YIN, S.; MA, L.; WHEELER, A.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.; LIU, B.; XIONG, J.; ZHANG, W.; HU, J.; ZHOU, Z.; DONG, B.; TIAN, Z.; JEFFREY, S. S.; CHUA, M. S.; SO, S.; LI, W.; WEI, Y.; DIAO, J.; XIE, D.; QUAKE, S. R. 5-Hydroxymethylcytosine signatures in cell-free DNA provide information about tumor types and stages. **Cell Research**, v. 27, n. 10, p. 1231–1242, out. 2017a.

SONG, X.; HU, W.; YU, H.; WANG, H.; ZHAO, Y.; KORNGOLD, R.; ZHAO, Y. Existence of Circulating Mitochondria in Human and Animal Peripheral Blood. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, mar. 2020.

SONG, Y.; TIAN, T.; SHI, Y.; LIU, W.; ZOU, Y.; KHAJVAND, T.; WANG, S.; ZHU, Z.; YANG, C. Enrichment and single-cell analysis of circulating tumor cells **Chemical Science**, v. 8, n. 3, p. 1736-51, mar. 2017b.

SPANGLER, W. L.; KASS, P. H. The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 2, p. 136–149, mar. 2006.

STROMBERG, P. C.; MEUTEN, D. J. Trimming Tumors for Diagnosis and Prognosis. *In*: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, 2017. p. 27–43.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

SVEDMAN, F. C.; LOHCHAROENKAL, W.; BOTTAI, M.; BRAGE, S. E.; SONKOLY, E.; HANSSON, J.; PIVARCSI, A.; ERIKSSON, H. Extracellular microvesicle microRNAs as predictive biomarkers for targeted therapy in metastastic cutaneous malignant melanoma. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0206942, nov. 2018.

SWENNENHUIS, J. F.; VAN DALUM, G.; ZEUNE, L. L.; TERSTAPPEN, L. W. M. M. Improving the CellSearch® system. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 6, n. 12, p. 1291-305, dez. 2016.

SZATANEK, R.; BAJ-KRZYWORZEKA, M.; ZIMOCH, J.; LEKKA, M.; SIEDLAR, M.; BARAN, J. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1153, maio 2017.

TAGAWA, M.; SHIMBO, G.; INOKUMA, H.; MIYAHARA, K. Quantification of plasma cell-free DNA levels in dogs with various tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 31, n. 6, p. 836–843, nov. 2019.

TAGAWA, M.; TAMBO, N.; MAEZAWA, M.; TOMIHARI, M.; WATANABE, K. I.; INOKUMA, H.; MIYAHARA, K. Quantitative analysis of the BRAF V595E mutation in plasma cell-free DNA from dogs with urothelial carcinoma. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, abr. 2020.

TALASAZ, A. H.; POWELL, A. A.; HUBER, D. E.; BERBEE, J. G.; ROH, K.-H.; YU, W.; XIAO, W.; DAVIS, M. M.; PEASE, R. F.; MINDRINOS, M. N.; JEFFREY, S. S.; DAVIS, R. W. Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 10, p. 3970–3975, mar. 2009.

TANAKA, M.; YAMAGUCHI, S.; IWASA, Y. Enhanced risk of cancer in companion animals as a response to the longevity. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, dez. 2020.

TARONE, L.; BARUTELLO, G.; IUSSICH, S.; GIACOBINO, D.; QUAGLINO, E.; BURACCO, P.; CAVALLO, F.; RICCARDO, F. Naturally occurring cancers in pet dogs as pre-clinical models for cancer immunotherapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 68, n. 11, p. 1839–1853, nov. 2019.

TARONE, L.; GIACOBINO, D.; CAMERINO, M.; FERRONE, S.; BURACCO, P.; CAVALLO, F.; RICCARDO, F. Canine Melanoma Immunology and Immunotherapy: Relevance of Translational Research. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 50, fev. 2022.

TELLADO, M. N.; MAGLIETTI, F. H.; MICHINSKI, S. D.; MARSHALL, G. R.; SIGNORI, E. Electrochemotherapy in treatment of canine oral malignant melanoma and factors influencing treatment outcome. **Radiology and Oncology**, v. 54, n. 1, p. 68-78, mar. 2020.

TENGDA, L.; SHUPING, L.; MINGLI, G.; JIE, G.; YUN, L.; WEIWEI, Z.; ANMEI, D. Serum exosomal microRNAs as potent circulating biomarkers for melanoma. **Melanoma Research**, v. 28, n. 4, p. 295–303, ago. 2018.

The global challenge of cancer. **Nature Cancer**, v. 1, n. 1, p. 1–2, jan. 2020.

THÉRY, C.; WITWER, K. W.; AIKAWA, E. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, dez. 2018.

TORGA, G.; PIENTA, K. J. Patient-Paired Sample Congruence Between 2 Commercial Liquid Biopsy Tests. **JAMA Oncology**, v. 4, n. 6, p. 868, jun. 2018.

TREGGIARI, E.; GRANT, J. P.; NORTH, S. M. A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. **The Journal of veterinary medical science**, v. 78, n. 5, p. 845–850, maio 2016.

TUOHY, J. L.; SELMIC, L. E.; WORLEY, D. R.; EHRHART, N. P.; WITHROW, S. J. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998-2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 245, n. 11, p. 1266–1273, dez. 2014.

TYLER, R. D.; COWELL, R. L.; MEINKOTH, J. H. Cutaneous and Subcutaneous Lesions. *In*: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA, D. B. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**. 3. ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2009. p. 78–111.

TYRRELL, H.; PAYNE, M. Combatting mucosal melanoma: recent advances and future perspectives. **Melanoma Management**, v. 5, n. 3, p. MMT11, set. 2018.

ULMER, A.; SCHMIDT-KITTLER, O.; FISCHER, J. J.; ELLWANGER, U.; RASSNER, G.; RIETHMÜLLER, G.; FIERLBECK, G.; KLEIN, C. A.; RIETHMÜLLER, G.; FIERLBECK, G.; KLEIN, C. A. Immunomagnetic Enrichment, Genomic Characterization, and Prognostic Impact of Circulating Melanoma Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 2, p. 531–537, jan. 2004.

VARKEY, J.; NICOLAIDES, T. Tumor-Educated Platelets: A Review of Current and Potential Applications in Solid Tumors. **Cureus**, v. 13, n. 11, nov. 2021.

VASSEUR, A.; KIAVUE, N.; BIDARD, F. C.; PIERGA, J. Y.; CABEL, L. Clinical utility of circulating tumor cells: an update. **Molecular Oncology**, v. 15, n. 6, p. 1647-66, jun. 2021.

VELOSO, E. S.; GONÇALVES, I. N. N.; SILVEIRA, T. L.; OLIVEIRA, F. S.; VIEIRA, D. S.; CASSALI, G. D.; DEL PUERTO, H. L.; FERREIRA, E. Diverse roles of epidermal growth factors receptors in oral and cutaneous canine melanomas. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, jan. 2020.

VERMESH, O.; AALIPOUR, A.; GE, T. J.; SAENZ, Y.; GUO, Y.; ALAM, I. S.; PARK, S. min; ADELSON, C. N.; MITSUTAKE, Y.; VILCHES-MOURE, J.; GODOY, E.; BACHMANN, M. H.; OOI, C. C.; LYONS, J. K.; MUELLER, K.; ARAMI, H.; GREEN, A.; SOLOMON, E. I.; WANG, S. X.; GAMBHIR, S. S. An intravascular magnetic wire for the high-throughput retrieval of circulating tumour cells in vivo. **Nature biomedical engineering**, v. 2, n. 9, p. 696–705, set. 2018.

VONA, G.; SABILE, A.; LOUHA, M.; SITRUK, V.; ROMANA, S.; SCHÜ, K.; FRÉDÉ RIQUE CAPRON, ¶; FRANCO, D.; PAZZAGLI, M.; VEKEMANS, M.; LACOUR, B.; BRÉ, C.; PATERLINI-BRÉ, P. Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells A New Method for the Immunomorphological and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 1, p. 57-63, jul. 2000.

VONG, J. S. L.; JI, L.; HEUNG, M. M. S.; CHENG, S. H.; WONG, J.; LAI, P. B. S.; WONG, V. W. S.; CHAN, S. L.; CHAN, H. L. Y.; JIANG, P.; CHAN, K. C. A.; CHIU, R. W. K.; LO, Y. M. D. Single Cell and Plasma RNA Sequencing for RNA Liquid Biopsy for Hepatocellular Carcinoma. **Clinical chemistry**, v. 67, n. 11, p. 1492–1502, nov. 2021.

WANG, J.; CHANG, S.; LI, G.; SUN, Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. **Frontiers of Medicine**, v. 11, n. 4, p. 522-27, dez. 2017.

WEINSTEIN, D.; LEININGER, J.; HAMBY, C.; SAFAI, B. Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Melanoma. **Journal of Clinical and Aesthetetical Dermatology**, v. 7, n. 6, p. 13-24, jun. 2014.

WONG, S. Q.; RALEIGH, J. M.; CALLAHAN, J.; VERGARA, I. A.; FTOUNI, S.; HATZIMIHALIS, A.; COLEBATCH, A. J.; LI, J.; SEMPLE, T.; DOIG, K.; MINTOFF, C.; SINHA, D.; YEH, P.; SILVA, M. J.; ALSOP, K.; THORNE, H.; BOWTELL, D. D.; GYORKI, D. E.; ARNAU, G. M.; CULLINANE, C.; KEE, D.; BRADY, B.; KELLEHER, F.; DAWSON, M. A.; PAPENFUSS, A. T.; SHACKLETON, M.; HICKS, R. J.; MCARTHUR, G. A.; SANDHU, S.; DAWSON, S. J. Circulating tumor DNA analysis and functional imaging provide complementary approaches for comprehensive disease monitoring in metastatic melanoma. **JCO Precision Oncology**, v. 2017, n. 1, p. 1–14, nov. 2017.

WRIGHT, T.; BRISSON, B. A.; WOOD, G. A.; OBLAK, M.; MUTSAERS, A. J.; SABINE, V.; SKOWRONSKI, K.; BELANGER, C.; TIESSEN, A.; BIENZLE, D. Flow Cytometric Detection of Circulating Osteosarcoma Cells in Dogs. **Cytometry Part A**, v. 95, n. 9, p. 997–1007, set. 2019.

XING, Y.; BRONSTEIN, Y.; ROSS, M. I.; ASKEW, R. L.; LEE, J. E.; GERSHENWALD, J. E.; ROYAL, R.; CORMIER, J. N. Contemporary Diagnostic Imaging Modalities for the Staging and Surveillance of Melanoma Patients: a Meta-analysis. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 2, p. 129, jan. 2011.

XU, M. J.; DORSEY, J. F.; AMARAVADI, R.; KARAKOUSIS, G.; SIMONE, C. B.; XU, X.; XU, W.; CARPENTER, E. L.; SCHUCHTER, L.; KAO, G. D. Circulating Tumor Cells, DNA, and mRNA: Potential for Clinical Utility in Patients With Melanoma. **The Oncologist**, v. 21, n. 1, p. 84–94, jan. 2016.

YANG, L.; LANG, J. C.; BALASUBRAMANIAN, P.; JATANA, K. R.; SCHULLER, D.; AGRAWAL, A.; ZBOROWSKI, M.; CHALMERS, J. J. 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**, v. 102, n. 2, p. 521–534, 1 fev. 2009.

YU, C.-H.; CHEN, H.-H.; LIU, C.-M.; JENG, Y.-M.; WANG, J.-T.; WANG, Y.-P.; LIU, B.-Y.; SUN, A.; CHIANG, C.-P. HMB-45 may be a more sensitive maker than S-100 or Melan-A for immunohistochemical diagnosis of primary oral and nasal mucosal melanomas. **Journal Oral Pathology and Medicine**, v. 34, n. 9, p. 540-5, out. 2005.

ZHENG, S.; LIN, H. K.; LU, B.; WILLIAMS, A.; DATAR, R.; COTE, R. J.; TAI, Y. C. 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood. **Biomedical Microdevices**, v. 13, n. 1, p. 203–213, fev. 2011.

ZHOU, B.; XU, K.; ZHENG, X.; CHEN, T.; WANG, J.; SONG, Y.; SHAO, Y.; ZHENG, S. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. **Signal Transduction and Targeted**, v. 5, n. 1, p. 144, ago. 2020.

ZHOU, L. L.; DICKER, D. T.; MATTHEW, E.; EL-DEIRY, W. S.; ALPAUGH, R. K. Circulating tumor cells: Silent predictors of metastasis. **F1000Research**, v. 6, p. F1000, 1445, ago. 2017.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO 01

Artigo será submetido à revista Veterinary Pathology

3 LIMITATIONS OF REAL-TIME REVERSE-TRANSCRIPTASE PCR AS A METHOD FOR CHARACTERIZE CIRCULATING TUMOR CELL GENE EXPRESSION IN DOGS WITH ORAL MELANOMA

Victor Nowosh; Cristina O. Massoco
Universidade de São Paulo (VN; CM)

Corresponding Author (VN)
E-mail: vnowosh@gmail.com

3.1 ABSTRACT

Liquid biopsy is a novel tool to detect tumor biomarkers in blood, including circulating tumor cells, and it may improve personalized medicine in oncology. These cells are extensively studied for their prognostic, diagnostic, and treatment selection, and many methods are available for their enrichment and characterization. However, studies in veterinary medicine are lacking. We tested density-gradient-based isolation of circulating tumor cells and tumoral mRNA characterization by real-time reverse-transcriptase PCR in dogs with oral melanoma. In vitro pilot testing showed promising results. Density-gradient centrifugation isolation was able to isolate cells in samples diluted to one cell per mL of blood. At the same time, RT-qPCR could detect cells in samples diluted to 10 cells per mL of blood. However, many hindrances were found when patient samples were tested, and a high false-positive rate of 13/30 (43%) was found. Based on our experience, we review the limitations and obstacles veterinarians may encounter when working with liquid biopsy. These may be inherent to liquid biopsy itself, such as lack of standardization and need for high sensitivity, or challenges inherent to veterinary research, such as low cooperation of pet owners.

KEYWORDS: Density-gradient centrifugation; Liquid biopsy; RT-qPCR.

3.2 INTRODUCTION

Cancer is a leading cause of death worldwide in humans and many companion animals. It is considered the most common cause of death in dogs.[11,45] Among many cancer types, melanoma is a common diagnosis with a poor prognosis, mainly due to its high metastatic potential. It is estimated that patients diagnosed with melanoma have a median survival time of about three months.[52,53]

Due to the extensive impact of cancer on our society, there is an increasing interest in improving diagnostic and monitoring tools in human and veterinary oncology. One tool emerging and getting significant attention among researchers is a liquid biopsy.[1,39] Liquid biopsy is a term that comprises any analysis performed on a blood sample for screening of tumor-derived biomarkers.[59] It has many potential applications in diagnosis, prognosis evaluation, treatment selection, and follow-up of cancer, being studied in many types of tumors in human oncology,[39] including melanoma.[29,30,32]

Tumor-derived biomarkers that may be analyzed include circulating tumoral DNA (ctDNA), extracellular vesicles, microRNAs, and circulating tumor cells (CTCs).[40,60] CTCs are considered one of the most well-developed biomarkers in liquid biopsy, along with ctDNA. Studies show its usefulness in tumor profiling, prognosis, and monitoring residual disease across many tumor types.[1,2,39]

Since CTCs are present in low quantities in the blood, their detection starts with an enrichment step to increase their concentration in the sample. Enrichment methods may be immunological-based selection, relying on CTC surface antigens, or physical-based selection, relying on characteristics such as size, deformability, density, and electromagnetism.[2] Then, the tumoral origin must then be confirmed in isolated CTCs by a characterization step, which may provide further prognostic information. Adequate choice of characterization method can depend on the enrichment method selected, but most notably includes protein level analysis by immunostaining and genomics characterization, which may include detection of mRNA markers by real-time reverse-transcriptase PCR (RT-qPCR).[27]

CTC isolation has its specific advantages when compared with other markers. Intact CTCs may allow studies focusing on cell morphology, immunophenotyping, functional, and cell-culture studies that would not be possible only by ctDNA detection.[46,59] Nevertheless, it has several well-known limitations. CTCs are less

abundant and more fragile than ctDNA, making their detection more challenging. Also, CTC-detection methods lack standardization, and there are multiple approaches one can use to enrich and isolate CTCs, with variable results among them.[59]

It is known that dogs, among many other animals, serve as models for studying human diseases, most notably cancer, due to their similarities in systemic responses and exposure to environmental factors with humans.[13,19,35,43] Despite that, studies involving liquid biopsy in veterinary oncology are still lacking, especially those consisting of CTC detection methods, so much research is still needed in this area.[11,13,24] Based on this, our study group sought to apply CTC enrichment and characterization methods, more specifically density-gradient-based enrichment and mRNA detection by RT-qPCR, respectively, to study CTC behavior in dogs with oral melanoma. However, we found many struggles in adapting these new techniques to our veterinary medicine reality, some of these involving liquid biopsy method and sample handling difficulties, and some involving challenges inherent to veterinary research.

The objective of this study was to report our experience with the application of a CTC detection method in dogs with oral melanoma and, based on our results and difficulties in doing so, discuss limitations and obstacles that can hinder the further implementation of liquid biopsy in veterinary medicine.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Ethics committee

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Research from the University of São Paulo under Id number 8500210717.

3.3.2 Patient selection

Dogs of any age, breed, and gender diagnosed with primary or recurring oral melanoma were selected for this study. Melanocytic neoplasia must have been confirmed by cytology or histopathology before inclusion in this study. In patients with primary melanoma, samples were collected before tumor excision or any kind of treatment, such as chemotherapy or immunotherapy. Patients with recurring

melanoma were included when remission was previously achieved, and they were not under treatment when the tumor recurred. Samples were collected before a new surgical intervention or treatment was initiated. Due to a lack of interest from owners to go to our lab, most blood samples were collected by other oncologist veterinarians throughout São Paulo state and sent to our laboratory. These veterinarians were instructed to sample at least 2 mL of whole blood into an EDTA tube and send it to our lab under refrigeration. Samples were processed as soon as they got to the lab for RNA extraction.

3.3.3 Control samples

RT-qPCR negative control samples were obtained from a partner laboratory, and 30 whole blood samples were selected from adult and puppy dogs of any sex or breed with no confirmed history of melanocytic neoplasia and presented no abnormal hematological parameters.

Positive controls were obtained by spiking a whole blood sample from a healthy adult male dog with malignant melanoma cells from a primary cell culture isolated from canine metastatic oral melanoma in a lymph node sample. Blood was divided into 1 mL samples, and each part was spiked with a sequentially smaller number of cells (10^4, 10^3, 10^2, 10^1, and 1) to measure the sensitivity of the RT-qPCR technique.

3.3.4 Density-gradient centrifugation

Samples were initially prepared by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and tumoral cell isolation using Ficoll®-paque PLUS density gradient media (Sigma-Aldrich). Blood was diluted 1:1:1 in phosphate-buffered saline and Ficoll®-paque PLUS gradient density media, followed by centrifugation at 400 *x* g for 25 minutes without acceleration or brakes. PBMCs were isolated from their specific gradient range and separated in the tube, in which remaining red blood cells were lysed in ACK lysis buffer, so there were only PBMCs and tumoral cells were saved for RNA extraction.

Confirmation of tumoral cell isolation along PBMCs was performed by flow cytometry. One primary cell culture was stained with CFSE, a fluorescent cell staining dye, before blood spiking, followed by gradient-density centrifugation, PBMC isolation, and flow cytometry in FACScalibur Flow Cytometer (BD Life Sciences, USA). Stained

cells were considered tumoral cells among non-stained PBMCs. Flow-cytometry results were analyzed on FlowJo® v10.8 Software (BD Life Sciences).

3.3.5 Real-time reverse transcriptase PCR

RT-qPCR protocols were performed following MIQE guidelines.[7] RNA was extracted from PBMCs using the RNEasy® kit (QIAGEN, Germany), following the manufacturer's instructions, and quantified by fluorescence spectroscopy using Qubit® RNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, USA). RNA samples were kept frozen at -80°C until processing.

Initially, random hexamer cDNA conversion was used, but a gene-specific reverse transcription protocol was established to maximize specific mRNA selection and reduce background noise. As such, reverse primers for both Melan-A (NCBI gene sequence: NM_001194968.1) and Tyrosinase (NCBI gene sequence: NM_001002941.1) genes were designed for application in this protocol (Melan-A: 5'-TGGTGCATTGGGAACCACAAGT-3'; Tyrosinase: AGGAGTGGCTGCTTTTCTTCA). A multiplex reaction with both primers was performed, using 1 µM of each primer per reaction. Gene-specific reverse transcription was performed with SSIV® Reverse Transcriptase (Life Technologies) protocol, following the manufacturer's instructions.

A targeted pre-amplification step with SsoAdvanced® PreAmp supermix (Bio-Rad, USA) was performed to enhance specific cDNA yield before RT-qPCR. TaqMan® probes (Thermo Fisher Scientific, USA) for Melan-A (Id: Cf02626139_m1) and Tyrosinase (Id: Cf02626296_m1) were used, and the protocol was performed following the manufacturer's guidelines. Final DNA in solution was quantified by fluorescence spectroscopy using Qubit® DNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific).

RT-qPCR reactions were performed using TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA) in a 10 µL singleplex reaction containing 0.1 ng of cDNA and 1x TaqMan® probes. Each reaction was performed in duplicate. One positive control of cDNA extracted from pure melanocytic cells from cell culture and one negative control of DEPC water was also used.

Reactions were performed by using StepOne Plus® Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) thermocycler. The cycling protocol consisted of 2 min at 50.0ºC, 10 min at 95ºC, 40 cycles of 15s at 95ºC, and 1 min at 60ºC. Results were analyzed in StepOne® Software (Applied Biosystems, USA). 1,0% agarose gel

electrophoresis was performed in positive samples to confirm if the amplicon size matches the expected size to rule out nonspecific PCR product formation.

3.4 RESULTS

3.4.1 Testing of control samples

A pilot study was conducted with our positive and negative controls to assess methodology sensitivity and specificity. CTC concentrations are rare, frequently being less than ten cells per mL of blood, sometimes reaching concentrations as low as one cell per mL of blood.[5,10] We aimed to evaluate if we could potentially detect samples with such low concentrations of cells in these samples. Each positive spiked sample with different and serially lower quantities of cells was processed according to described methods. A negative control sample consisted of blood without tumoral cells, while a pure sample of tumoral cells was used as a positive control.

Enrichment by density-gradient centrifugation and separation was deemed adequate for tumoral cell detection in spiked samples since flow cytometry could detect stained cells in dilutions as low as one cell per mL of blood (Figure 1).

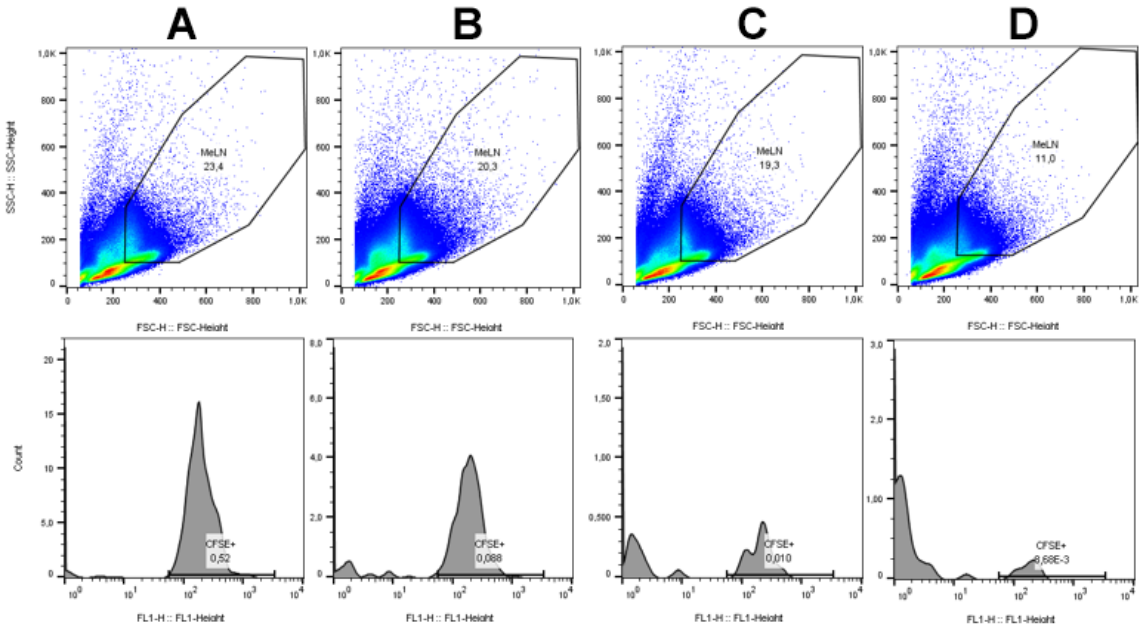

Figure 1. Dot-plot and histogram representative of flow-cytometry analysis of peripheral blood mononuclear cells isolated from a healthy dog spiked with serially lower quantities of CFSE stained tumoral cells from a primary metastatic melanoma cell line. **Upper row:** Dot-plot graphs. **Lower row:** Histogram graphs. **a)** Sample spiked with 10^3 cells/mL of blood. **b)** Sample spiked with 10^2 cells/mL of blood. **c)** Sample spiked with 10 cells/mL of blood. **d)** Sample spiked with 1 cell/mL of blood. Analysis performed on FlowJo® v.10.8 Software (BD Life Sciences). 2022.

Enriched samples were then submitted to mRNA extraction and RT-qPCR. Initially, cDNA conversion was performed with random hexamer cDNA conversion, and no pre-amplification step was used in any samples.

Both pure tumoral cells sample and negative samples results were as expected for target genes (positive and negative, respectively). However, when no specific method to enhance mRNA selection was applied to our samples, the sensitivity of mRNA detection on spiked samples was lower than expected, with only samples spiked with 10^4 and 10^3 cells/mL of blood having positive results. SDHA endogenous control gene was tested to discard failed extraction and was detected in all samples.

Our first hypothesis for these results was that there was background noise generated by random hexamer cDNA conversion. Hexamers anneal to random sites throughout the RNA submitted for conversion, and RNA from PBMCs in these samples must be much more abundant than tumoral cells. We confirmed this by performing RT-qPCR of similar quantities of cells as our samples diluted in 1 mL of PBS, and we detected positive results of RNA amplification for target genes when no background noise from PBMCs was present.

Based on these results, we sought to enhance RNA conversion specificity to minimize background from PBMCs. RNA samples were submitted to gene-specific reverse transcription since, with this method, only specific mRNA should be targeted by primers to start the reaction.

After the implementation of gene-specific reverse transcription, samples were retested, and an increased specificity was found, with the detection of up to 10^2 cells/mL of blood. However, negative results were seen for 10 cells and < 10 cells/mL of blood.

These results were deemed insufficient for testing in our patient samples since our capacity to detect cells was still much higher than the CTC quantities described in patient samples. So, the detection method still needed an improvement in sensitivity. A pre-amplification step was then implemented before RT-qPCR to enhance the concentration of target genes in samples before amplification, thus improving their detection.

We tested samples of pure tumoral cells with and without pre-amplification to assess improvement upon detection. We found a considerable reduction of cycle threshold (Ct) in the one which had undergone pre-amplification (mean Ct for melan-A gene: 17,34; mean Ct for tyrosinase gene: 14,43) when compared with the one which had not undergone pre-amplification (mean Ct for melan-A gene: 25,17; mean Ct for tyrosinase gene: 24,19), what can be correlated with a boost in target gene quantity in the sample and which might help detection of such rare genes.

After the introduction of pre-amplification, samples spiked with 10^2, 10, and 1 cell per mL of blood were retested. Once more, an increased specificity was shown, with the detection of up to 10 cells per mL of blood. Negative results were found for samples diluted to 1 cell per mL of blood and negative samples.

Our results showed excellent improvement compared to the first results before gene-specific reverse transcription and pre-amplification. This sensitivity was considered the most we could get with available tools since we had achieved a capacity of detection of around ten cells per mL of blood, which some previous studies were able to find in cancer patients. So, even though we would miss patients with fewer cells in circulations, we could potentially have positive results in patients with a higher burden of CTCs.

3.4.2 Testing of patient samples

Samples obtained from 31 dogs meeting our inclusion criteria were obtained for testing. Most patient owners had several restraints with taking their pets to another clinic for blood collection. Consequently, samples were sent to our lab from many clinics, maintained under refrigeration, and processed quickly after arrival. Density-gradient separation of PBMCs and RNA extraction was performed immediately, followed by freezing at -80°C for further analysis.

All 31 samples from patients and 30 negative controls were processed following methods standardized during the pilot study. RT-qPCR reactions were performed in triplicate, and cDNA quantity was set at 0.1 ng per reaction. SDHA endogenous gene could not be included in gene-specific reverse-transcription, as it would generate background noise from PBMCs expressing it. So relative quantification would not be assessed, and any result that presented an amplification curve of Ct < 35 was considered “positive,” while a Ct > 35 or the absence of such curve was considered “negative.”

The results for 31 melanoma patients were initially perceived as promising. There were 29/31 (94%) positive samples for at least one target gene, with 27/31 (87%) being positive for melan-A, 16/31 (51%) being positive for tyrosinase, and 14/31 (45%) being positive for both. Only 2/31 (6%) samples were negative for both markers. There was not a significant disparity between replicates in the samples. The mean Ct of detection for melan-A was 34.55 and for tyrosinase was 34,18. One patient had a significantly lower Ct for both target genes (Ct for melan-A = 26.72; Ct for tyrosinase = 28.5), suggesting a more prominent expression of target genes in these CTCs.

When evaluating results from negative samples, however, results were quite disappointing. There was a high number of samples returning positive results (Melan-A = 13/30; 43%; Tyrosinase = 12/30; 40%). All samples positive for tyrosinase were also positive for melan-A. The mean Ct of detection for melan-A was 32.34 and for tyrosinase was 32,55, both being lower than the mean of samples from patients with melanoma. Lowest Ct for melan-A was 28.25 and for tyrosinase was 30.18, so none of the negative controls had a Ct as low as our lowest sample.

Amplicons were submitted to a 1,0% agarose gel electrophoresis to confirm whether positive results found in both positive and negative samples corresponded to correct target genes. Samples were run alongside a 100-bp ladder, one positive and

one negative control. Gels were stained with GelRed® nucleic acid stain (Biotium, USA).

Both positive and negative samples showed smeared bands across the gel. Thus, we could not confirm target-amplicon amplification. Since electrophoresis conditions were deemed proper and positive and negative controls and DNA ladder results were as expected, we suppose positive results in RT-qPCR corresponded to nonspecific amplification or degraded cDNA (Figure 2).

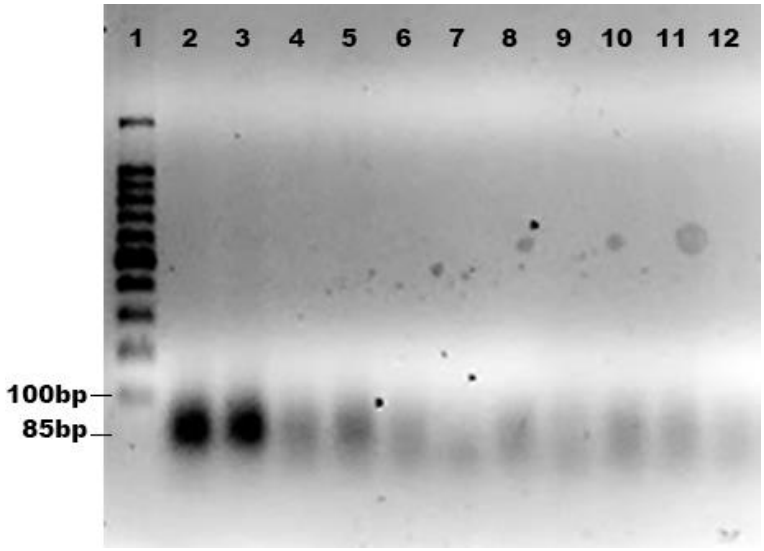

Figure 2. Gel picture of RT-qPCR performed for patients with canine oral melanoma. **Lane 1.** 100bp-ladder. **Lanes 2-3.** Positive controls. **Lanes 4-12.** Samples. Faint smears on samples suggest fluorescence detected corresponds to unspecific amplification. 2022.

3.5 DISCUSSION

3.5.1 Results illustrate the challenges of liquid biopsies

Liquid biopsy has recently gathered massive interest from the scientific community, mainly due to its potential applications in precision medicine. However, it is still a novelty technology. Thus, it still has several limitations to overcome. Our results illustrate some challenges of liquid biopsies, among which the most notable are: a wide variety of arrays but lack of standardization; the need for high sensitivity due to low

concentration of biomarkers; and complex pre-analytical management of samples to maintain their stability.[1,28]

3.5.2 Lack of standardization makes it unfeasible to predict which method will lead to better results

Liquid biopsy currently needs more standardization, and lack of standardization makes it unfeasible to predict which method will lead to better results. There are many liquid biopsy biomarkers besides CTCs and many types of assays for each of these. Also, there is a variation in outcomes according to the kind of tumors and their specific biology. Review studies seek to collect and reunite findings for each method and tumor to provide more evidence of which will be better in each situation.[40,57] Still, all these factors contribute to heterogeneity in results and may be misleading in deciding which assay and biomarker are better for a specific clinical setting, leading to dubious results.[1]

Even among commercially approved tests, lack of standardization makes it challenging to select the best liquid biopsy strategy. Low congruency was found among different certified commercial liquid biopsy tests based on the same assay, even when applied to the same sample, which could potentially lead to distinct management of patients depending on the chosen platform.[55] Among CTC isolation methods, the only US FDA-approved test to this day is CellSearch®, an immunoaffinity-based test for detecting EpCAM-positive cells.[17] However, tumors from mesenchymal origin do not express EpCAM markers. Also, CTCs from epithelial tumors may lose their EpCAM expression during the epithelial-mesenchymal transition, leading to false-negative results.[5,38]

When analyzing CTCs specifically, some thought must be given both to enrichment and CTC characterization method selection, as different methods in each step may lead to different outcomes and consequences.[38] There are several methods one may choose, each with specific advantages and disadvantages. Distinct techniques may yield inconsistent levels of purity and bias in the pool of isolated cells,[42] so a good choice of methodology should be crucial for good results.

For enrichment of our samples, we opted for density-based centrifugation isolation, one of the first described methods for CTC isolation. Commercially available media are numerous, including Ficoll-Paque and Percoll (GE Healthcare). When using

this method, CTCs are isolated amongst the PBMCs and can be quickly recovered. Meanwhile, erythrocytes, platelets, and granulocytes are separated from the sample. It is a widely available and relatively cheap method of isolation of CTCs. Even though some tumoral cells may be lost due to variation of density, it has reasonable recovery rates. However, the purity of the sample remains a known issue since even after removing granulocytes, there still is a high number of mononuclear cells in the sample compared to CTCs.[38] Specific separation media such as the OncoQuick® tubes were developed for enhancing the selection of CTCs among mononuclear cells with equally good recovery rates and better purity.[25] However, they are more expensive and less available in our region.

To characterize CTCs, we opted for a qPCR method involving genes commonly expressed by melanotic tumors but absent in the blood. RT-qPCR is an indirect method because it does not detect the intact cell but a tumor-specific gene.[54] It is a widely used, relatively simple test with high sensitivity, particularly when a panel of target genes is used to enhance the probability of detection of the highly heterogeneous CTCs.[33,47] RT-qPCR has its technical limitations when RNA is targeted due to RNA's low stability and need for careful handling. However, when applied to CTC detection, there are some specific drawbacks: the need for several steps to validate molecular analysis frequently leads to considerable variability and low reproducibility among studies; small sample sizes may hamper further testing and statistical analysis; also, CTC number estimation may be off since it does not detect them directly and gene expression is variable.[4]

In our study, the choice of density-based gradient isolation and RT-qPCR reflect the availability and relatively low costs of specific equipment and reagents in our region. RT-qPCR was already used for CTC detection in human cutaneous melanomas, sometimes even when no enrichment methods were applied to the buffy coat. However, a larger sample volume was used.[26,37] In veterinary medicine, studies with RT-qPCR for CTC expressed genes were performed with good results in mammary gland carcinomas, [14–16] but no such studies were seen in melanoma, and liquid biopsy interest in veterinary research has since focused more on ctDNA.[12]

In our study, standardization was highly time-consuming. Our results were initially unsatisfactory even when accounting for all specificities mentioned for both chosen methods. Since no other studies were performed in canine melanoma, we do not know yet if this may represent that these techniques are not adequate for this

particular tumor in dogs, even if we find it quite unlikely. However, this cannot be readily discarded. Even though tumor biology and progression are quite similar in dogs and humans, canine oral melanoma is more like mucosal melanomas in humans. Even though CTC detection in this tumor was proven,[34] no further studies were performed to evaluate RT-qPCR performance. Oral melanomas have one of the highest mutational burdens of canine tumors,[3] which could lead to melanomas losing expression of common genes such as melan-A and tyrosinase.

There are some efforts to solve this standardization issue in liquid biopsy. There are currently groups of researchers forming research consortiums in Europe[9] and the USA[6] focusing on liquid biopsy studies, including standardization. Some authors suggest that the best way is to develop an algorithm that combines circulating biomarkers not to select a supposedly correct single approach but to identify the best combination of assays and markers that lead to a better understanding of cancer's progression in each patient.[1]

3.5.3 Necessity of high sensitivity may have introduced bias to the technique

Among other characteristics, an ideal platform for CTC detection must have a high sensitivity, which means a capacity for detecting rare CTCs in the sample, and a high specificity, which means no false-positive results.[5] Although RT-qPCR is a highly sensitive method, the low concentration of CTCs in patients' blood is a challenge to overcome. Most available molecular analysis techniques have a detection limit of 1%, and CTC purity in a sample often falls under this limit.[23] Some steps may be performed to minimize false negatives due to insufficient quantities of target genes in the sample. Two of the methods used in this study are target gene-specific cDNA synthesis and pre-amplification.

Gene-specific cDNA synthesis is a method of cDNA priming based on using primers that bind to the target mRNA among the entire mRNA pool, in contrast with widely used random hexamers and oligo-dTs. When this method is used, primers should anneal only to target genes and, consequently, synthesize a highly specific cDNA, being the most sensitive option for quantification.[8] It does, however, has its pitfalls. The risk of formation of primer-dimers when multiplex reactions are performed is an inherent danger, so a limited number of genes should be preferred.[18]

Pre-amplification is a method of increasing the concentration of target DNA before PCR analysis to overcome a low number of copies of the target gene, which should be helpful when sample quantity is limited, especially when multiple genes are being tested. It is based on a pre-cycling step of the target genes in the sample. Poor planning and misusing pre-amplification are thought to lead to poor preservation of relationships between genes and consequently biased results, so it should be used carefully.[36]

Both techniques were implemented to enhance the target cDNA concentration in the sample before analysis. However, we hypothesize it may have introduced bias in our study. One example was that the conversion of housekeeping genes was impossible during gene-specific cDNA synthesis to minimize background noise. Housekeeping genes are expressed stably in all cell types, and as such, they are used for normalizing gene-expression results.[21] Inclusion of a housekeeping gene as a target in a gene-specific primer pool for reverse transcription would lead to an overt amplification of its abundant transcripts compared to rarer melan-A and tyrosinase, present in CTC only. As such, the gene-expression analysis would not be possible in our study, and the only information obtained would be the presence-absence of target genes in the sample.

Before our study, some research groups could detect melanoma mRNA transcripts of CTCs in blood using conventional PCR methods and without the aid of pre-treatment.[44,51,58] We question if the absence of this step would not lead to a high number of false-negative results in such studies, but at least what they show us is that some patients may have positive results without it, and we suppose these patients must have a higher number of CTCs.

Newer studies and protocols tend to recommend a pre-treatment step before PCR. A standard protocol for melanoma transcripts amplification of CTCs in blood was recently published, and it adopts pre-amplification of samples but not target-specific cDNA synthesis.[42] This shows us that, among both methods mentioned, gene-specific cDNA synthesis may not be necessary to correct the evaluation of samples, which should decrease both the bias introduced and the cost of analysis. We question if some of our positive signals in both positive and negative samples may not represent primer-dimer formation since it was a reported risk of target-specific cDNA. This step may be cut from future adaptations of this study.

3.5.4 Sample handling and quality are critical due to the low viability of CTCs

One of the most critical steps in liquid biopsy is sample handling and quality in the pre-analytical phase due to the low viability of CTCs in the samples. Most biomarkers have both a low concentration and a very short half-life. CTCs half-life is reported as very few hours after blood collection.[10] Methods for trying and preserving CTC integrity and viability are currently being developed. CellSave® Preservative Tubes (CellSearch, USA) may be able to maintain CTC integrity for up to 96h, though focusing on CellSearch® enrichment and DNA-based downstream applications. Thus, it may not be helpful for some techniques, especially RNA-based transcriptional analysis, since the preservative used could not help avoid RNA degradation in the sample.[31] Maintaining viability in the sample is critical when mRNA is targeted for CTC analysis. RNA handling is known to be quite complicated due to its instability and the presence of RNases that degrade it from the sample.[4] Many recommendations on workstation cleaning and sample handling are established in protocols to minimize RNA degradation and contamination.[42]

In our study, we believe most of our unsatisfactory results were due to loss of sample viability. Due to blood collection being performed in partner clinics, most of our samples took hours to get to our laboratory. We will discuss more difficulties getting patients to our lab in a later section. It is worth noting that, for some methods of melanoma CTC detection, some protocols may establish blood processing within 24h of specimen collection.[20] However, these techniques usually detect surface proteins on CTCs, not mRNA, which we suppose could have degraded by the time the sample got to the laboratory.

The use of RNA stabilization solutions, such as RNAlater® (Thermo Fisher, USA), is a way of protecting RNA in fresh specimens. Even though its mainly used in tissue preservation, it may as well be used with blood. Pre-treatment with such solutions allows sample storage for more extended periods at low temperatures for later analysis.[61] However, preserving RNA from whole blood samples before treatment will also prevent the use of density-gradient-based enrichment since it does not maintain cell integrity. The lack of a CTC enrichment step would lead to higher background RNA, and the separation of rare RNA transcripts of CTC would be even more challenging. So, RNA-later pre-treatment is not viable, and preserving CTCs would be a better option.

We highlight the need for a method for preserving RNA samples inside CTCs for these situations, where sample processing is not immediately possible, and CTCs and RNA within it needs to be maintained viable until an enrichment step is performed. Until such a method exists, RNA-based liquid biopsies still need fast processing to avoid RNA degradation, which may have contributed to the results seen in our study.

3.5.5 Veterinary medicine still has challenges of its own to overcome to implement liquid biopsy techniques

Veterinary medicine lags behind human medical research, not only in applications and validation of new technology but also when comparing research methodologies and concepts, due to its intrinsic particularities and pharmaceutical market interests more focused on human medicine.[22,56] Although the overall figure may be changing for the best in recent years with the rising concepts of “One Medicine” and “One Health,” [41] there are many challenges to overcome in veterinary research. In this section, we take a moment to discuss some issues we found in developing our research.

Recruiting patients is emphasized as being hard in veterinary research.[56] Most dog owners did not want to take their pets for blood collection at our laboratory, opting for blood collection and sampling in a partner clinic for convenience. To our understanding, this was probably the most critical issue that led to unsatisfactory results due to the already mentioned careful handling of samples being fundamental to liquid biopsy success.

Regarding sampling, vacuum blood sampling should be the ideal method of collecting blood in veterinary medicine. However, it has several drawbacks, including the stressful and uncomfortable holding of the patient in a fixed position and the risk of sudden movement leading to repositioning the needle being generally unsafe. Thus, many veterinarians prefer collection with a needle and syringe.[48] However, vacuum collection would allow discarding the first milliliters of blood without removing the needle from the collection site. It is considered ideal for avoiding the collection of skin cells that may skew liquid biopsy tests, and it is performed in some studies involving melanotic cells.[37,44,51] We had no control over collection methods since owners did not come to our laboratory.

Blood sampling volume also may be an issue for future liquid biopsy testing and implementation in clinical practice. Since liquid biopsy biomarkers are rare in circulation, most tests require large volumes of blood to ensure sensitivity.[49] Most veterinary patients are diagnosed in later stages of cancer and have precarious clinical conditions, and drawing large volumes may be risky in smaller patients. Many tutors and even veterinarians were reluctant to enroll in our study when we asked for a larger quantity than 2 mL of blood.

Another challenge to overcome is testing costs. PCR reagents and plastics are quite expensive. High demand for these materials, as seen in the COVID-19 pandemic, may contribute to even higher pricing. RT-qPCR is cheaper than most other liquid biopsy methods, and newer methods and technologies may allow prices to drop even more. However, PCR is still way pricier than most conventional laboratory methods. So many specific reagents and steps are necessary to ensure correct mRNA detection that RT-qPCR becomes costlier than most conventional PCRs. If prices are still this high when liquid biopsies applications are commercially available, many owners will probably be repelled and opt not to test their pets.

At last, it is worth pointing out that liquid biopsy benefits to pets are still not fully clear. Some veterinarians and tutors willingly wanted to enroll in this study, but some refused since there was no tangible benefit for their patients and pets. Pet owners are becoming increasingly educated and involved, and outcome prediction is a growing concern among them.[50] Without more research, it is impossible to tell if liquid biopsy benefits will outweigh the risks and costs discussed. So, more research regarding liquid biopsy is desired, so the more reluctant pet owners start to understand how much of a breakthrough it may be for veterinary oncology as it already is showing to be in human oncology.

3.6 CONCLUSION

Liquid biopsy is a novelty technique with several critical steps that must be carefully considered for quality results. Many challenges should be overcome until we can fully adopt it in veterinary medicine and research scenario. Some of these challenges regard the technique itself, such as lack of standardization and the need for high sensitivity and sample handling, but many challenges regarding veterinary

medicine’s reality, such as the willingness of pet owners to cooperate with researchers to better control biases.

Even though the results were not as satisfactory as we would like, we believe a few adjustments in technique should suffice to get a better outcome. Eliminating gene-specific cDNA synthesis and its replacement with random hexamers are enough to match all conditions with recently published protocols. However, sampling may remain challenging, and there will be a great effort in recruiting patients and pet owners to our lab to control sampling bias better, as we believe this was the main reason for the observed results.

3.7 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank MSc Cassia C. Yasumaru and Dr. Jessica S. Garcia for helping with patient recruiting.

The authors would like to thank the Prof. Dr. Terezinha Knöbl and MSc Fernanda Borges Barbosa, from Laboratório de Medicina Aviária / FMVZ-USP for helping with PCR equipment, reagents and agarose gel electrophoresis.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article

FUNDING

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

1. Alix-Panabières C. The future of liquid biopsy. *Nature*. 2020;579(7800):S9-S9. doi:10.1038/d41586-020-00844-5

2. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discovery*. 2016;6(5):479-491. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1483

3. Alsaihati BA, Ho KL, Watson J, et al. Canine tumor mutational burden is correlated with TP53 mutation across tumor types and breeds. *Nature Communications*. 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-24836-9

4. Andergassen U, Kölbl AC, Mahner S, Jeschke U. Real-time RT-PCR systems for CTC detection from blood samples of breast cancer and gynaecological tumour patients (Review). *Oncology Reports*. 2016;35(4):1905-1915. doi:10.3892/or.2016.4608

5. Attard G, de Bono JS. Utilizing circulating tumor cells: Challenges and pitfalls. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2011;21(1):50-58. doi:10.1016/j.gde.2010.10.010

6. BLOODPAC Consortium. The Blood Profiling Atlas in Cancer Consortium: <http://www.bloodpac.org>. Published 2016. Accessed July 5, 2022. https://www.bloodpac.org/

7. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 2009;55(4):611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797

8. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*. 2004;15(3):155-166. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331581

9. CANCER-ID Consortium. CANCER-ID – Innovation in Medicine: <https://www.cancer-id.eu/>. Published 2015. Accessed July 5, 2022. https://www.cancer-id.eu/

10. Chen L, Bode AM, Dong Z. Circulating Tumor Cells: Moving Biological Insights into Detection. *Theranostics*. 2017;7(10):2606-2619. doi:10.7150/thno.18588

11. Chibuk J, Flory A, Kruglyak KM, et al. Horizons in Veterinary Precision Oncology: Fundamentals of Cancer Genomics and Applications of Liquid Biopsy for the Detection, Characterization, and Management of Cancer in Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021;8. doi:10.3389/fvets.2021.664718

12. Chibuk J, Flory A, Kruglyak KM, et al. Horizons in Veterinary Precision Oncology: Fundamentals of Cancer Genomics and Applications of Liquid Biopsy for the Detection, Characterization, and Management of Cancer in Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021;8. doi:10.3389/fvets.2021.664718

13. Colombo J, Moschetta-Pinheiro MG, Novais AA, et al. Liquid biopsy as a diagnostic and prognostic tool for women and female dogs with breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(20). doi:10.3390/cancers13205233

14. da Costa A, Kohn B, Gruber AD, Klopfleisch R. Multiple RT-PCR markers for the detection of circulating tumour cells of metastatic canine mammary tumours. *Veterinary Journal*. 2013;196(1):34-39. doi:10.1016/j.tvjl.2012.08.021

15. da Costa A, Lenze D, Hummel M, Kohn B, Gruber AD, Klopfleisch R. Identification of Six Potential Markers for the Detection of Circulating Canine Mammary Tumour Cells in the Peripheral Blood Identified by Microarray Analysis. *Journal of Comparative Pathology*. 2012;146(2-3):143-151. doi:10.1016/j.jcpa.2011.06.004

16. da Costa A, Oliveira JT, Gärtner F, Kohn B, Gruber AD, Klopfleisch R. Potential markers for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. *The Veterinary Journal*. 2011;190(1):165-168. doi:10.1016/j.tvjl.2010.09.027

17. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. *Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer*. Vol 8.; 2004. www.nejm.org

18. Dennis P, Edwards EA, Liss SN, Fulthorpe R. Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(2):769-778. doi:10.1128/AEM.69.2.769-778.2003

19. Dow S. A Role for Dogs in Advancing Cancer Immunotherapy Research. *Frontiers in Immunology*. 2020;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02935

20. Edgar RH, Cook J, Douglas M, Samson AP, Viator JA. Capture and Isolation of Circulating Melanoma Cells Using Photoacoustic Flowmetry. In: ; 2021:203-212. doi:10.1007/978-1-0716-1205-7_15

21. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*. 2013;29(10):569-574. doi:10.1016/j.tig.2013.05.010

22. Fenger CK. Limitations to veterinary applications of new technologies in treatment and diagnostics. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2001;17(2):389-394. doi:10.1016/S0749-0739(17)30069-X

23. Fernández-Lázaro D, Hernández JLG, García AC, Martínez AC, Mielgo-Ayuso J, Cruz-Hernández JJ. Liquid biopsy as novel tool in precision medicine: Origins, properties, identification and clinical perspective of cancer's biomarkers. *Diagnostics*. 2020;10(4). doi:10.3390/diagnostics10040215

24. Garnica TK, Lesbon JCC, Ávila ACFCM, et al. Liquid biopsy based on small extracellular vesicles predicts chemotherapy response of canine multicentric lymphomas. *Scientific Reports*. 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-77366-7

25. Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, Dahm M, Nekarda H, Siewert JR. Detection of Circulating Tumor Cells in Blood Using an Optimized Density Gradient Centrifugation. In: ; 2003:149-155. doi:10.1007/978-3-642-59349-9_13

26. Hasselmann DO, Rappl G, Rössler M, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. *Detection of Tumor-Associated Circulating MRNA in Serum, Plasma and Blood Cells from Patients with Disseminated Malignant Melanoma*. Vol 8.; 2001.

27. Heidrich I, Ačkar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K. Liquid biopsies: Potential and challenges. *International Journal of Cancer*. 2021;148(3):528-545. doi:10.1002/ijc.33217

28. Heidrich I, Ačkar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K. Liquid biopsies: Potential and challenges. *International Journal of Cancer*. 2021;148(3):528-545. doi:10.1002/ijc.33217

29. Hong X, Sullivan RJ, Kalinich M, et al. Molecular signatures of circulating melanoma cells for monitoring early response to immune checkpoint therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(10):2467-2472. doi:10.1073/pnas.1719264115

30. Huang SK, Hoon DSB. Liquid biopsy utility for the surveillance of cutaneous malignant melanoma patients. *Molecular Oncology*. 2016;10(3):450-463. doi:10.1016/j.molonc.2015.12.008

31. Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic — implementation issues and future challenges. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2021;18(5):297-312. doi:10.1038/s41571-020-00457-x

32. Jensen TJ, Goodman AM, Kato S, et al. Genome-wide sequencing of cell-free DNA identifies copy-number alterations that can be used for monitoring response to immunotherapy in cancer patients. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2019;18(2):448-458. doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-0535

33. Kamińska P, Buszka K, Zabel M, Nowicki M, Alix-Panabières C, Budna-Tukan J. Liquid biopsy in melanoma: Significance in diagnostics, prediction and treatment monitoring. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(18). doi:10.3390/ijms22189714

34. Khoja L, Lorigan P, Dive C, Keilholz U, Fusi A. Circulating tumour cells as tumour biomarkers in melanoma: Detection methods and clinical relevance. *Annals of Oncology*. 2015;26(1):33-39. doi:10.1093/annonc/mdu207

35. Knoblaugh SE, Hohl TM, la Perle KMD. Pathology Principles and Practices for Analysis of Animal Models. *ILAR Journal*. 2018;59(1):40-50. doi:10.1093/ilar/ilz001

36. Korenková V, Scott J, Novosadová V, et al. Pre-amplification in the context of high-throughput qPCR gene expression experiment. *BMC Molecular Biology*. 2015;16(1). doi:10.1186/s12867-015-0033-9

37. Koyanagi K, Kuo C, Nakagawa T, et al. Multimarker quantitative real-time PCR detection of circulating melanoma cells in peripheral blood: Relation to disease stage in melanoma patients. *Clinical Chemistry*. 2005;51(6):981-988. doi:10.1373/CLINCHEM.2004.045096

38. Li X, Li Y, Shao W, Li Z, Zhao R, Ye Z. Strategies for enrichment of circulating tumor cells. *Translational Cancer Research*. 2020;9(3):2012-2025. doi:10.21037/tcr.2020.01.17

39. Martins I, Ribeiro IP, Jorge J, et al. Liquid biopsies: Applications for cancer diagnosis and monitoring. *Genes (Basel)*. 2021;12(3):1-20. doi:10.3390/genes12030349

40. Martins I, Ribeiro IP, Jorge J, et al. Liquid biopsies: Applications for cancer diagnosis and monitoring. *Genes (Basel)*. 2021;12(3):1-20. doi:10.3390/genes12030349

41. Mobasheri A. Comparative medicine in the twenty-first century: Where are we now and where do we go from here? *Frontiers in Veterinary Science*. 2015;2(MAY). doi:10.3389/fvets.2015.00002

42. Morici M, Lin W, Gray ES. Transcript-Based Detection of Circulating Melanoma Cells. In: ; 2021:235-245. doi:10.1007/978-1-0716-1205-7_18

43. Nishiya AT, Massoco CO, Felizzola CR, et al. Comparative aspects of canine melanoma. *Veterinary Sciences*. 2016;3(1). doi:10.3390/vetsci3010007

44. Osella-Abate S, Savoia P, Quaglino P, et al. Tyrosinase expression in the peripheral blood of stage III melanoma patients is associated with a poor prognosis: A clinical follow-up study of 110 patients. *British Journal of Cancer*. 2003;89(8):1457-1462. doi:10.1038/sj.bjc.6601197

45. Pang LY, Argyle DJ. Veterinary oncology: Biology, big data and precision medicine. *Veterinary Journal*. 2016;213:38-45. doi:10.1016/j.tvjl.2016.03.009

46. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(7):409-424. doi:10.1038/s41571-019-0187-3

47. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(7):409-424. doi:10.1038/s41571-019-0187-3

48. Reynolds BS, Boudet KG, Faucher MR, Geffre A, Germain C, Lefebvre HP. *Comparison of a New Blood Sampling Device With the Vacuum Tube System for Plasma and Hematological Analyses in Healthy Dogs*. Vol 44.; 2008.

49. Rossi G, Ignatiadis M. Promises and pitfalls of using liquid biopsy for precision medicine. *Cancer Research*. 2019;79(11):2798-2804. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3402

50. Schulz KS. The outcomes measures program: What's in it for you?: Evidence-based surgical practice. *Veterinary Surgery*. 2007;36(8):715-716. doi:10.1111/j.1532-950X.2007.00330.x

51. Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, et al. Prospective multi-institutional study of reverse transcriptase polymerase chain reaction for molecular staging of melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(18):2849-2857. doi:10.1200/JCO.2005.03.2342

52. Smith SH, Goldschmidt MH, Mcmanus PM. *A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms*. Vol 39.; 2002.

53. Spangler WL, Kass PH. *The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia*.; 2006.

54. Tanaka F, Yoneda K, Hasegawa S. *Circulating Tumor Cells (CTCs) in Lung Cancer: Current Status and Future Perspectives*.; 2010. www.dovepress.com

55. Torga G, Pienta KJ. Patient-Paired Sample Congruence Between 2 Commercial Liquid Biopsy Tests. *JAMA Oncology*. 2018;4(6):868. doi:10.1001/jamaoncol.2017.4027

56. Vandeweerd JM, Kirschvink N, Clegg P, Vandenput S, Gustin P, Saegerman C. Is evidence-based medicine so evident in veterinary research and practice? History, obstacles and perspectives. *Veterinary Journal*. 2012;191(1):28-34. doi:10.1016/j.tvjl.2011.04.013

57. Vasseur A, Kiavue N, Bidard FC, Pierga JY, Cabel L. Clinical utility of circulating tumor cells: an update. *Molecular Oncology*. 2021;15(6):1647-1666. doi:10.1002/1878-0261.12869

58. Voit C, Kron M, Rademaker J, et al. Molecular staging in stage II and III melanoma patients and its effect on long-term survival. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(6):1218-1227. doi:10.1200/JCO.2005.04.098

59. Wang J, Chang S, Li G, Sun Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Frontiers of Medicine*. 2017;11(4):522-527. doi:10.1007/s11684-017-0526-7

60. Wang J, Chang S, Li G, Sun Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Frontiers of Medicine*. 2017;11(4):522-527. doi:10.1007/s11684-017-0526-7

61. Zhang JY, Xu QN, Liu XL, Li CT. Effects of Peripheral Blood Different Pretreatment Methods and Preservation Time on RNA Quality. *Fa Yi Xue Za Zhi*. 2021;37(6):825-831. doi:10.12116/j.issn.1004-5619.2020.500701

CAPÍTULO 3 – ARTIGO 02

Este artigo será submetido à revista Veterinary Comparative Oncology

4 THE POTENTIALITY OF LIQUID BIOPSY: ISOLATION BY SIZE OF CIRCULATING TUMOR CELLS IN CANINE ORAL MELANOMA AND ITS RELATION TO LYMPH NODE METASTASIS

SHORT RUNNING TITLE: Circulating tumor cells in canine melanoma

Victor Nowosh[1], Alexcia Camila Braun[2], Anna Paula Carreta Ruano[2], Ludmilla Thomé Domingos Chinén[2], Cristina de Oliveira Massoco[1]*

[1] Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil,
[2] International Research Center, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil
*Corresponding author: cmassoco@gmail.com

4.1 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Cassia C. Yasumaru and Jessica S. Garcia for helping with patient recruiting.

FUNDING

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

WORD COUNT: 4.093
NUMBER OF FIGURES AND TABLES: 4

CONFLICT OF INTERESTS STATEMENT

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article

4.2 ABSTRACT

Liquid biopsy for circulating tumor cell detection is generally unexplored in veterinary medicine. Dogs with highly aggressive and heterogeneous tumors, such as oral melanoma, could benefit from studies involving size-based isolation since they do not depend on antibodies, and these cells may lose expression of their markers. We sought to detect melanoma circulating tumoral cells using Isolation by Size of Tumor Cells, a microfiltration methodology, followed by immunocytochemistry (ICC) with melan-A, PNL2, and S100. Ten canine patients were enrolled, prognostic data from these patients were assessed, and blood samples were collected for microfiltration analysis. Results have shown the detection of intact cells in 9/10 patients. ICC has shown 3/10 melan-A-positive, 3/10 PNL2-positive, and 8/10 S100-positive patients, confirming the importance of opting for a multimarker assay. However, S100 was not considered a specific marker. We found a significant number of negative-stained cells, suggesting their high heterogeneity in circulation. Stained microemboli were found in a patient with an already high isolated cell count and advanced clinical stage. We found a significant difference in circulating tumor cell count between patients with and without lymph node metastasis, which may correlate with clinical staging and prognosis assessment. We recommend future studies focus on a more considerable number of samples to assess clinical utility better and validate findings of this method in canine patients.

KEYWORDS: Circulating tumor cells, Dogs, Immunocytochemistry, Liquid biopsy, Melanoma

4.3 INTRODUCTION

Neoplasia is the most common cause of death among most species, including household pets.[1] Due to cancer’s considerable prevalence and vast impact on society,

there is an ever-growing interest in improving its diagnostic and monitoring tools. With the current emerging focus on precision medicine, techniques such as liquid biopsy that may provide a better understanding of cancer and improve upon existing methods have experienced considerable attention from researchers.[2–11]

Liquid biopsy is any analysis performed on blood samples to screen tumor-derived biomarkers. These include intact circulating tumor cells (CTCs) or cell-free nucleic acids released from primary or metastatic tumors in the peripheral blood of patients.[12] Researchers see in liquid biopsy many potential applications, such as early screening in patients with a family history; assessment of minimal residual disease; identifying therapeutic targets or resistance mechanisms; monitoring real-time treatment response and tumor progression; among others.[2–11]

It is known that dogs are invaluable models for studying disease progression, novel diagnostic tools efficiency, and treatment options for many diseases shared with humans. One notable example of disease is cancer, due to similarities in immune system responses and exposure to environmental factors.[13–17] Despite that, studies involving liquid biopsy in veterinary oncology are still lacking. Reviews on the subject focusing on veterinary research have been published[18,19], and some studies have shown promising results, usually using DNA-based techniques.[20–22] However, considering the vast array of techniques and numerous original studies already conducted in human oncology, there is still much research to be done in veterinary oncology.

Few studies have focused on CTC detection in dogs. CTCs are considered, along with circulating tumoral DNA, one of the most well-developed biomarkers in liquid biopsy, with reported usefulness in tumor profiling, prognosis, and monitoring of residual disease. [2,3,9,23] They may be enriched in a sample by immune-affinity methods, such as the FDA-approved CellSearch®, or by physical-based methods, such as their size and deformability.[18,24] The CellSearch® method was previously tested in dog samples[25] Still, once it depends on monoclonal antibodies that may differ among species, physical-based methods may represent a preferable way to detect most intact CTCs in dogs. Intact CTCs may allow studies focusing on cell morphology, immunophenotyping, functional, and cell-culture studies that would not be possible only by cell-free DNA detection.[8,10] Thus, CTC detection should not be underestimated, and veterinary oncology may also benefit from studies focusing on this biomarker.

CTCs, as well as other biomarkers, are rare in circulation. They tend to be increased in more aggressive cancers in their later stages, and higher counts are usually correlated to a bad prognosis.[8,23,26] Thus, liquid biopsy applications are beneficial for cancers with a high rate of aggressiveness and metastatic disease. In veterinary oncology, most studies on liquid biopsy focus on mammary carcinomas. [20,21,25,27–29]. However, dogs have many other highly aggressive cancers, including melanoma. It is a common diagnosis that frequently has a poor prognosis, accounting for around 7% of all malignant tumors in this species. It is mainly found in the oral cavity or the lip, with high metastatic potential and a median survival time of about three months.[30–32] The veterinary scientific community greatly endeavors to assess better prognostic, diagnostic, and treatment options for canine melanomas.[15,33,34]

To this day, only one liquid biopsy study focused on melanoma, using circulating tumoral DNA as a biomarker.[22] As such, no CTC detection methods have been tested yet for this tumor. Given the relevance of melanoma to canine patients and its high aggressiveness, we believe the testing of new techniques could potentially lead to new insights on this disease, and veterinary patients may benefit from these. Therefore, this study aims to detect melanoma CTCs using a size-based enrichment method, specifically Isolation by Size of Tumor Cells (ISET), a microfiltration technique, followed by ICC to confirm the melanocytic origin of retained cells.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 Ethics disclaimer

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Research from the University of São Paulo under Id number 8500210717.

4.4.2 Cell line validation statement

Melanoma cells from a primary cell culture isolated from canine metastatic oral melanoma in a lymph node (MeLN-cells) are used as positive controls for immunocytochemistry. Previous genome sequencing and immunohistochemistry for PNL2 in a paraffin-embedded cell-block sample confirmed the melanocytic origin of these cells.

4.4.3 Control samples

A negative control sample was obtained from a healthy adult male dog, and a whole blood sample was collected into an EDTA tube. Positive controls were obtained by spiking whole blood from the same healthy dog with MeLN-cells. Spiking was performed with 100 cells per 1 mL of whole blood.

4.4.4 Patient Selection and Sample Collection

Dogs of any age, breed, and gender diagnosed with primary or recurring oral melanoma were selected for this study. Melanocytic neoplasia must be confirmed by cytology or histopathology. Two patients initially diagnosed with amelanotic melanoma were confirmed to have fibrosarcoma and osteosarcoma by histopathology and were used for ICC evaluation. Information on primary or recurring disease and pigmentation of tumors were collected. Also, a prognostic assessment of each patient was performed according to the World Health Organization clinical staging[32] the TNM staging system, and overall survival analysis (Table 1).

Table 1. Characterization of 10 patients with oral melanoma. 2022.

Patient ID	Breed	Age (years)	Sex	Primary or recurring	Tumor pigmentation	WHO Clinical Stage	TNM	Survival after diagnosis (days)
1	Shih-Tzu	11	M	Primary	Melanotic	III	T3N1M0	90*
2	Mixed	9	F	Recurring	Melanotic	III	T3N0M0	594
3	Chow-chow	13	M	Primary	Amelanotic	III	T3N0M0	36*
4	Yorkshire terrier	10	M	Recurring	Amelanotic	III	T3N0M0	330
5	Shih-Tzu	14	F	Primary	Melanotic	III	T3N0M0	138
6	Golden retriever	12	F	Recurring	Melanotic	III	T3N1M0	120*
7	Mixed	16	F	Recurring	Amelanotic	III	T3N1M0	242*
8	Pug	8	M	Recurring	Amelanotic	IV	T3N0M1	33
9	Daschund	17	M	Recurring	Amelanotic	IV	T3N1M1	38*
10	Golden retriever	8	M	Primary	Melanotic	II	T2N0M0	333

*Euthanized patients

In patients with primary melanoma, samples were collected before tumor excision or any treatment, such as chemotherapy or immunotherapy. In patients with recurring melanoma, patients were included when they were in remission and were not undergoing any treatment when the tumor recurred, and their samples were collected before a new surgical intervention or treatment was initiated.

Microfiltration samples were usually collected right before the surgical excision of the tumor. Between 8 and 10 mL of whole blood were collected into EDTA tubes. Venipuncture was performed in a single draw, and blood samples were homogenized until processing to minimize platelet clump formation. Then, they were submitted to microfiltration with ISET, as described in the next section.

4.4.5 Processing for Microfiltration

The microfiltration method chosen was the ISET system (Rarecells® Diagnostics, France).

Whole blood samples were prepared for microfiltration by dilution in a hemolysis buffer containing 0,2% paraformaldehyde for cell fixation. Samples were diluted at a 1:10 ratio and kept under constant mixing for 10 minutes at room temperature.

After lysis, samples were loaded on the ISET® module, which contains six wells that allow filtration of up to 10 mL of blood (five wells for 1 mL of blood each and a larger well for 5 mL of blood divided into five minor spots). At the bottom of these wells is a porous polycarbonate membrane with numerous calibrated 8 µm pores that allow filtration of smaller structures and cells (leukocytes, red blood cells, and platelets), retaining bigger neoplastic cells.

After loading, a vacuum of 10 bar was created by a vacuum pump, and samples were filtrated through the membranes. The membrane was washed by adding 1x PBS still under vacuum pressure. After complete filtration, the membranes were detached from the module and left to air-dry. Each membrane contains ten filtration spots to be stained and analyzed. Membranes would be frozen at -20°C until analysis.

4.4.6 Staining and Immunocytochemistry

ICC staining was performed for confirmation of the expression of tumor-specific protein markers. As such, antibodies against Melan-A (Dako/Agilent Technologies, USA), S100 (Dako/Agilent Technologies, USA), and PNL-2 (Abcam, UK) were chosen for staining melanocytic tumor cells. Dilutions used were 1:200, 1:200, and 1:100, respectively.

ICC staining protocol was performed as follows: two spots per patient were stained for each marker, corresponding to a total of 6 mL of blood analyzed per patient, along with one spot for positive and negative controls. Each spot was first subjected to antigen retrieval by a 2-minute heating and cooling sequence while submerged in an antigen-retrieval solution. Then, each spot was hydrated in 1x TBS buffer for 20 min, followed by permeabilization in 1x TBS buffer + 0,2 Triton® x-100 (Sigma-Aldrich, USA) for 5 minutes. Antibodies were added at 1:100 dilution, and samples were incubated for two hours at room temperature and protected from light exposure. Afterward, samples were treated with EnVision®+ Dual System HRP (Dako/Agilent Technologies, USA) secondary antibodies conjugated with HRP for 30 min at room temperature.

At last, spots were stained with DAB chromogen solution for 10 minutes, then washed and air-dried. Each spot is subjected to a 2-minute hematoxylin stain for nuclei staining, then mounted in an aqueous media for microscopic analysis with a light microscope (Axioskop 40-Carl Zeiss, Germany). Pictures were taken with a coupled digital camera (Sony Cyber-shot DSC-S75) at 100× magnification.

4.4.7 Statistical analysis

The unpaired Student's *t*-test was used to compare the mean number of stained CTCs found according to these parameters: Primary tumor vs. Recidive; Pigmented tumor vs. Not pigmented; and Lymph node metastasis vs. No lymph node metastasis. Pearson's correlation test was used to verify if survival time and CTC count were significantly correlated. Tumor size, distant metastasis, and clinical staging were not considered because some sample groups had less than two patients in these analyses.

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism v 6.0 software (GraphPad Software, USA), and significance was set at 5%.

4.5 RESULTS

A total of 10 confirmed melanoma patients were enrolled in this study. Two patients with oral tumors initially diagnosed as melanoma were then confirmed as fibrosarcoma and osteosarcoma. They were kept in this study to evaluate the specificity of ICC.

ISET performed on positive control has shown many retained MeLN-cells. Melan-A, S100, and PNL2 staining confirmed the melanocytic origin of these cells. Platelet clumps and cells with leukocyte morphology not stained with any markers were also seen (Figure 1A, 1B, 1C).

No cells with morphology compatible with tumoral cells nor cells stained for melan-A, PNL2, and S100 were found in the negative control. Many platelet clumps retained cells with leukocyte morphology were found. CD45 staining confirmed these cells as leukocytes (Figure 1D).

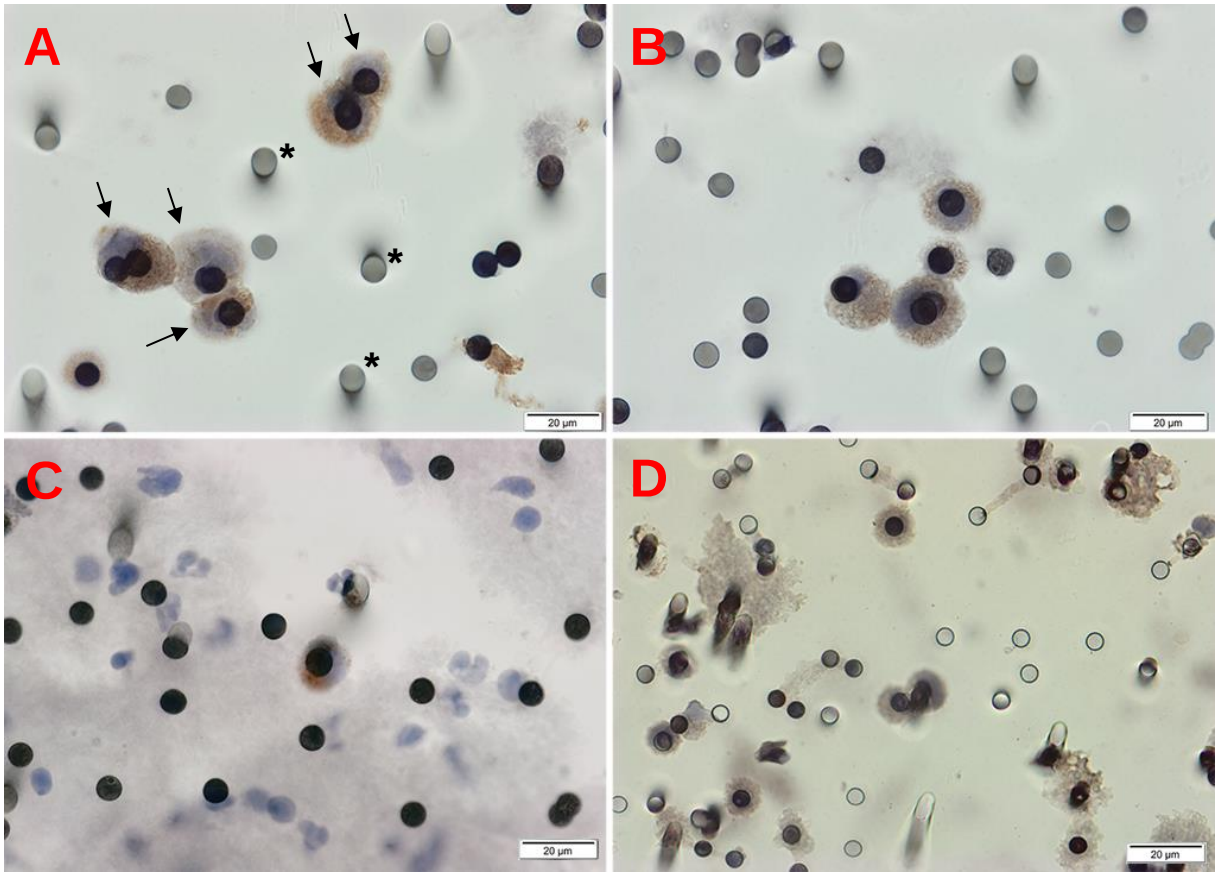

Figure 1. Results of positive and negative control samples submitted to isolation by Size of Tumoral Cells (ISET) method and stained by Immunocytochemistry. **A.** Positive control. Arrows point to five melan-A-stained melanoma cells from a primary cell culture (MeLN-cells). Asterisks represent micropores on ISET module membrane **B.** Positive control. Three S100-stained MeLN-cells are seen. **C.** Positive control. One PNL2-stained MeLN-cell is seen. Numerous leukocytes were retained due to platelet clumping and were not stained. **D.** Negative control. Numerous leukocytes are retained. CD45 stained positive in these cells. DAB-chromogen. 2022.

We summarized ISET's results for each of our patients in Table 2.

Table 2. Circulating tumor cell counting and immunostaining by Isolation by Size of Tumor Cells methods in 10 dogs with oral melanoma, a dog with fibrosarcoma, and a dog with osteosarcoma. 2022.

Patient ID	Stained CTCs per 6 mL of blood	Melan-A positive	PNL-2 positive	S100 positive	Negative cells per 6 mL of blood	Microemboli (number of cells per embolus)
		Per 2 mL of blood				
Patient 1	7	5	-	2	12	1 (3)[a]
Patient 2	1	-	-	1	3	-
Patient 3	-	-	-	-	-	-
Patient 4	8	6	-	2	3	-
Patient 5	5	-	-	5	-	-
Patient 6	8	-	5	3	2	-
Patient 7	12	-	-	12	3	-
Patient 8	3	-	-	3	0	-
Patient 9	18	3	13	2	1	2 (4)[b] 1(13)[c]
Patient 10	3	-	3	-	-	-
Fibrosarcoma	3	-	-	3	1	-
Osteosarcoma	3	-	-	3	1	-

(a) Negative for any marker. (b) S100 positive. (c) PNL2 positive.

We found stained CTCs in 9/10 patients with melanoma. The mean isolated cell count was around 6,6 cells per patient in 6 mL of blood analyzed (mean: 1,1 cells/mL). When considering the total blood volume (6 mL), cell counting ranged from 0 to 18 per patient.

ICC showed that 3/10 patients had melan-A-positive cells, 3/10 had PNL2-positive cells, and 8/10 had S100-positive cells. 8/10 patients also had negative cells for all markers tested (Figure 2A, 2B, 2C).

We found circulating tumor microemboli (CTM) in 2/11 patients. Cells composing CTM found in one patient were negative for any marker, while all CTM found in another patient stained positive for either S100 or PNL2 (Figure 2D).

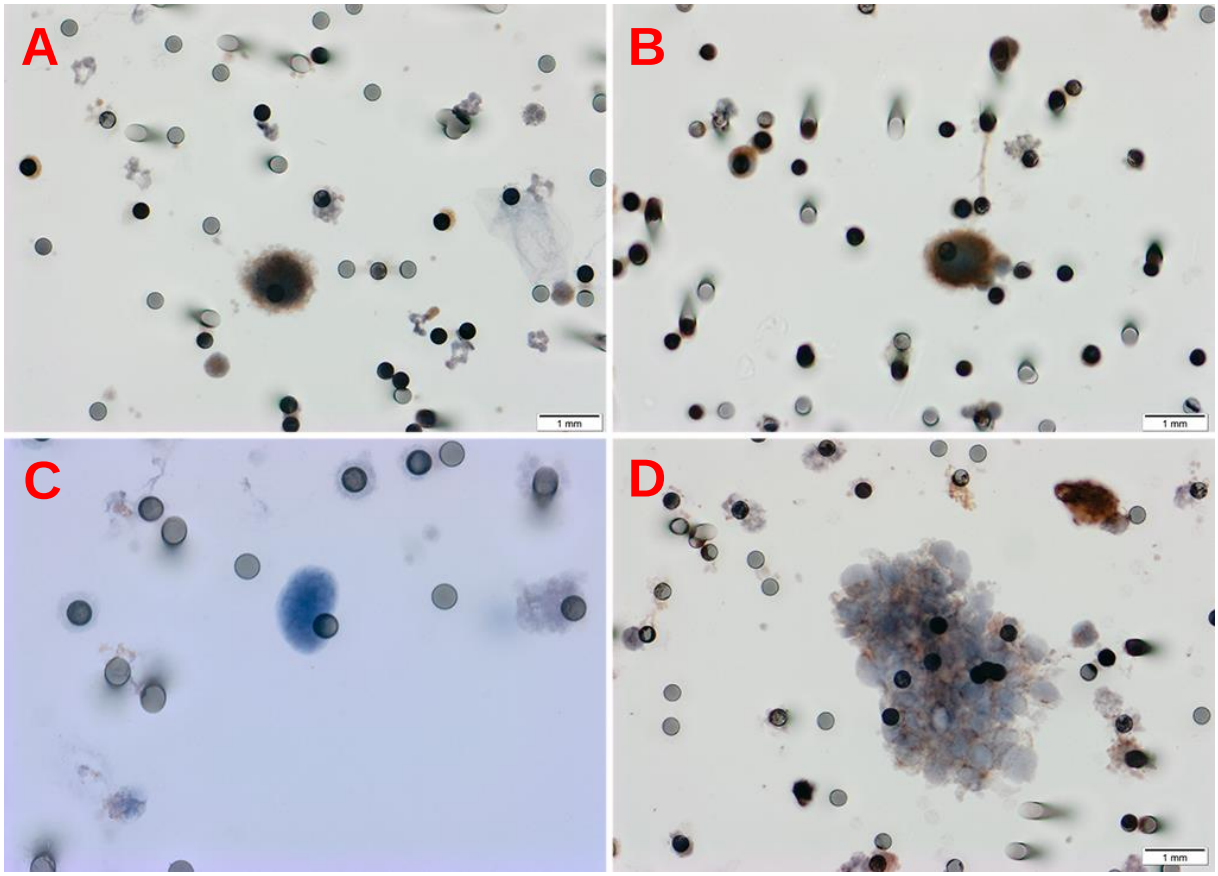

Figure 2. Results of samples from canine patients with oral melanoma submitted to isolation by Size of Tumoral Cells (ISET) method and stained by immunocytochemistry. **A.** Circulating tumoral cell (CTC) stained by melan-A. **B.** CTC stained by S100. **C.** Retained cell with morphology suggestive of CTC. **D.** Microembolus containing many cells stained by PNL2. DAB-chromogen. 2022.

We also found retained cells in both patients with fibrosarcoma and osteosarcoma. Neither melan-A nor PNL2-positive cells were found in these patients; however, both S100-positive and unstained cells were found.

CTC count was not statistically significant with pigmentation and tumor recurrence nor correlated with survival time. However, we found significantly higher CTC counts in patients with lymph node metastasis ($p < 0.05$) (Figure 3).

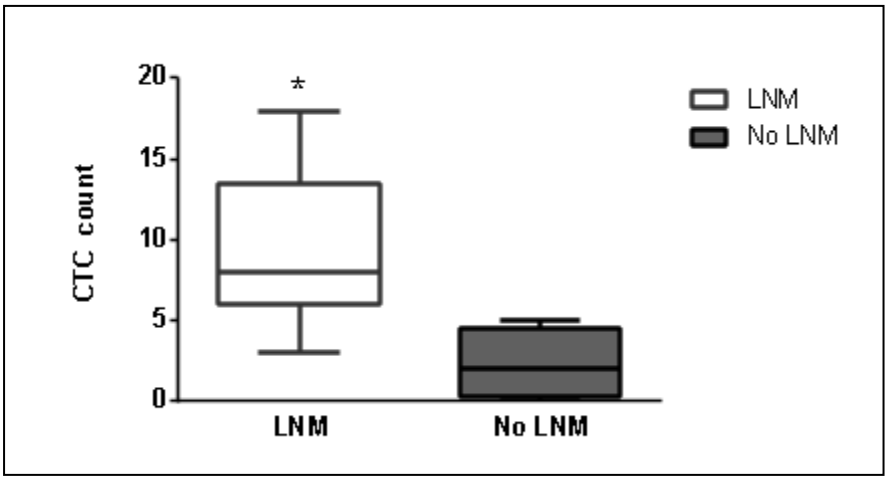

Figure 3. Boxplot analysis comparing CTC counts in patients with and without lymph node metastasis (LNM) at sampling. The mean CTC count was significantly higher in patients with LNM (p<0,05). 2022.

4.6 DISCUSSION

Liquid biopsy in veterinary medicine is still in its first steps, and it is seen as a potential way to improve the care of veterinary patients.[19] Also, liquid biopsy research in animal models could potentially lead to advances that can be applied to human research due to similarities in tumor biology[13–18]. Many biomarkers are available for liquid biopsy studies.[18] Veterinary research has recently focused on tumoral DNA detection.[20–22]. Regarding CTCs, studies were either performed by real-time transcriptase-PCR and microarray analysis,[27–29] flow cytometry,[35] or CellSearch®.[25] To our extent, this is the first time a physical-based method, more specifically microfiltration by the ISET technique, was used to detect CTCs in dogs.

It is also the first report of a CTC detection method applied for canine oral melanomas. Most previous reports on CTCs in canine tumors focused on mammary gland carcinomas [25,27–29]. Liquid biopsy was applied to canine oral melanoma to detect circulating tumoral DNA,[22] but not for intact CTCs.

We chose ISET, a size-based microfiltration method, for the enrichment of CTCs. A systematic review of successful enrichment methods used for human melanoma was published. It has shown that ISET is not commonly used for this tumor, only accounting for around 3% of published papers. However, it is also stated that physical-based methods may help avoid CTC loss due to low marker expression.[36] these methods may be beneficial to melanoma research, seeing it is known for its

heterogeneity.[37–39] Oral melanomas have one of the highest mutational burdens among canine tumors.[40] It was found that ISET could isolate around twice as many cells as immune-affinity-based methods being highly sensitive and not depending on the target immune marker's presence.[41]

ISET can then be combined with PCR or immunocytochemistry to characterize and confirm the tumoral origin of retained cells. Characterization is crucial when physical-based methods are used due to a slight overlap between leukocytes' and tumoral cells' characteristics.[24] Regarding their size, tumor cells tend to have a mean size of 15.6 µM, and larger leukocytes, such as activated monocytes, usually reach up to 15 µM.[42] Circulating melanoma cell size is also highly variable, ranging from 13 to 21 µM[43]. Stained tumoral cells are reported to have detectable malignancy criteria (large cell and nuclei size, irregular shape of nuclei, high nucleo-cytoplasmic ratio) that could help their distinction (DE GIORGI *et al.*, 2010). At first glance, we recognize that morphology may help the differentiation of these cells, but circulating atypical macrophages with large nuclei were already found in cancer patients.[44] Thus, characterization using a marker assay is a more precise and safe way to confirm tumoral origin.

We opted for immunocytochemistry instead PCR. Even though it is the most studied technique for liquid biopsy in melanoma, PCR is an indirect method of CTC detection, which means it does not prove the existence of intact viable circulating tumor cells. Not differentiating viable from nonviable CTCs could lead to low clinical utility. Also, even though it allows estimation of CTCs by comparing to controls, the actual number of cells is not confirmed.[36] Since one of the ISET advantages is maintaining cell integrity during enrichment, we opted for immunocytochemistry to visualize intact CTCs and access cell counting. Both techniques are equally as sensitive, as CTC detection by ISET was significantly associated with mRNA tyrosinase levels in the blood.[45]

We chose a multimarker assay comprised of commonly used markers for melanoma. Melan-A, a melanocyte differentiation antigen, S100, a family of proteins involved in cellular growth, and PNL2, a monoclonal antibody capable of staining melanocytes via an unknown protein, are classically used as markers for melanoma. Melan-A and PNL2 are deemed more specific. Meanwhile, S100 is deemed more sensitive.[46,47] Independently of characterization method choice, a multimarker assay should enhance sensitivity by accounting for the heterogeneity of circulating melanoma

cells.[37,38] Also, CTC staining may produce weaker signals than those of culture cell lines. Multimarker stains should help when weaker staining leads to dubious results.[36]

Our positive control has shown an excellent recovery of melanocytic culture cell lines by ISET methods. Melanocytic origin was confirmed by staining with melan-A, S100, and PNL2. However, it is worth noting that many leukocytes were found retained both in positive and negative controls and in some patients. CD45 staining confirmed leukocyte origin in negative controls. This finding may be due to platelet clumping obstructing the ISET device's pores. Platelet clumping is a relatively common finding in complete blood counts in veterinary patients due to activation during collection and handling or inherent higher aggregability.[48] Even though samples were maintained under gentle, constant homogenization and processed within two hours of their collection as described,[49] clumps were still seen, and a high number of leukocytes was consequently retained.

In our patients, we detected stained CTCs in 9/10 patients with melanoma, with a mean result of 1,1 cells per mL of blood analyzed and a range of up to 18 cells in 6 mL of blood. This many positive patients could be correlated with the clinical stage of melanoma at diagnosis and collection of blood. Most dogs with melanoma are diagnosed in later clinical stages,[32] and CTC counts tend to increase with stage and metastasis development.[3,50] Most of our patients were classified as stage III (7/10). Comparing CTC numbers among patients in different stages could represent a potential diagnostic and prognostic utility in melanoma. Still, very few patients were stage IV (2/10) and II (1/10), and no stage I patients were enrolled in our study due to diagnosis in this stage being uncommon.

3/10 of our patients had positive cells for melan-A, 3/10 had positive cells for PNL2, and 8/10 had positive cells for S100. Once only one patient had positive cells for all markers, we agree that the choice of multiple markers enhances assay sensitivity by avoiding the loss of negative CTCs for one marker but not for another, as shown in previous reports with human melanomas.[37,38]

In 8/10 patients, we found retained cells with sizes suggestive of CTCs but no expression of any melanocytic marker. Retained cells with no expression may correspond to highly heterogeneous CTCs that lost tested melanocytic marker expression, which should be expected due to this tumor's reported high heterogeneity.[37–39] However, we cannot exclude non-melanocytic bigger cells, such as activated macrophages or endothelial cells.[24] We reckon CD45 double staining should

help differentiate bigger leukocytes, and lack of CD45 could more accurately identify retained cells as CTCs, as seen in our negative control. Thus, negative stained retained cells should be interpreted carefully.

We also found S100-positive cells in patients with fibrosarcoma and osteosarcoma. S100 proteins are known to be sensitive but not specific markers for melanoma since proteins of this family are expressed by many tumors and cells in other pathologies.[51] In osteosarcoma, S100A4 may be upregulated, but fibrosarcoma should not express S100 proteins[52]. In dogs, reported specificity of S100 was 20% in differentiating melanoma from soft tissue sarcomas.[34] We hypothesize this may be either due to high heterogeneity of cells or, more likely, due to unspecific antibody binding. These findings show that markers should be carefully chosen and assessed for sensitivity and specificity.

CTMs were found in 2 patients. CTMs are defined as clusters of up to 50 cells, tumoral and not tumoral, that circulate adhered to each other. Spreading in groups may increase CTCs' overall survival and resistance to treatment. CTMs are reported to have up to 100-fold increased metastatic potential compared to individual CTCs and are related to poorer prognoses.[53] Curiously, CTMs are reported as more typical of epithelial tumors, as circulating melanoma cells tend to spread as individual cells.[45]

Analyzing each patient separately, we find interesting results. The patient with the higher number of CTCs was a 17-year-old dog with stage-IV-graded amelanotic and recurring melanoma, with lymph node and distant metastasis and poor disease progression, being euthanized after 38 days. This patient had positive CTCs for all tested markers and was the only patient presenting stained CTMs. Also, the patient with the most extended survival after diagnosis had the lowest stained CTC counts, with only one S100-stained cell. These findings may represent an initial insight into CTC counting and characterization's potential to predict tumoral progression.

However, we also found one patient with no detectable CTCs. This patient was graded as a stage III melanoma and had poor clinical evolution, being euthanized after 36 days. Even though the undetectability of CTCs is usually seen in early-stage patients, some advanced-stage cancer patients may not have detectable CTCs.[54] This finding shows that, even though liquid biopsy may be helpful for some patients, it will not always correlate with cancer progression. Thus, we reinforce the need to carefully analyze liquid biopsy data in large-scale clinical trials to validate its findings before its application in a clinical setting. We performed a simple statistical analysis comparing

total CTC counts with prognostic data obtained from patients. Tumor size, distant metastasis, and clinical staging were excluded because some analytical groups had fewer than two patients in those situations. There were insufficient patients for robust analysis of CTM presence and prognostic factors.

CTC counts were significantly higher in patients with lymph node metastasis than in those without ($p<0.05$). This finding shows that CTC counts in oral melanoma patients can be correlated with the disease's stage at sampling and a higher risk of metastasis, as shown in many human studies.[55–58] Analysis of tumor pigmentation and disease recurrence have not shown statistical significance. There was also no correlation between CTC counts and overall survival. We believe the lack of significance may be due to patients being submitted to different treatments, and we could not account for individual responses. Also, some patients were euthanized soon after diagnosis, which may lead to bias in overall survival data. We reckon the small sample size was the main limitation of this study. The limited number of samples hindered our statistical analysis, and we firmly believe a more significant number of patients could lead to more statistically robust results.

It is worth noting that many challenges will have to be overcome for liquid biopsy implementation. Pre-analytical handling of samples, sensitivity and specificity testing, and lack of standardization are the most often cited issues one should be aware of when working with liquid biopsy.[2,11,24,54] In our experience, large blood volume drawing was a key concern among pet owners and veterinarians. ISET module filtration has ten spots for 1 mL of blood each for 10 mL total, which may be a problem for miniature breeds, especially considering many patients with advanced stages of cancer may have poor clinical conditions. Our steps were based on previously published ISET protocols for human cancer research.[45,49,59] where size should not be a problem for adult patients. Thus, further adaptation and validation of adapted methods to veterinary reality are desirable.

4.7 CONCLUSION

We report a successful application of the ISET methodology to the enrichment of CTCs in dogs with oral melanoma. To our extent, this is the first time the ISET system was used as a liquid biopsy method in dogs and the first time that liquid biopsy was used to study canine oral melanoma.

Our findings show that ISET can be used to enrich CTCs in dogs with tumors, followed by immunocytochemistry for confirmation of tumor origin. We see the characterization of CTCs as a crucial step in confirming tumoral origin, and using a multimarker assay enhances the technique's sensitivity. Unstained cells may represent heterogeneous CTCs, but findings should be interpreted carefully. 9/10 patients had detectable CTCs, which could be due to melanoma's high aggressiveness and metastatic potential. Specific markers should be preferred, and melan-A and PNL2 showed better specificity than S100, found in patients with other tumor types.

The small sample size hindered a robust statistical analysis, and many variables could not be tested or did not show significant results. However, we found a statistically significant difference between CTC counts in patients with and without lymph node metastasis. This finding indicates that CTC detection and counting may help assess patients' clinical stage, which should be further evaluated in larger samples.

We suggest future studies should focus on assessing the clinical relevance of CTC detection by ISET and adaptation and standardization of this method to veterinary oncology reality. Larger sample sizes should be sought, including patients in all stages of melanoma, as well as benign melanic proliferations and healthy patients, for adequate comparison. We urge the need for more extensive clinical studies in liquid biopsy to assess its utility further, broaden its usage, and evaluate future benefits for patients in the clinical setting.

REFERENCES

1. Pang LY, Argyle DJ. Veterinary oncology: Biology, big data and precision medicine. *Veterinary Journal*. 2016;213:38-45. doi:10.1016/j.tvjl.2016.03.009

2. Alix-Panabières C. The future of liquid biopsy. *Nature*. 2020;579(7800):S9-S9. doi:10.1038/d41586-020-00844-5

3. Martins I, Ribeiro IP, Jorge J, et al. Liquid biopsies: Applications for cancer diagnosis and monitoring. *Genes (Basel)*. 2021;12(3):1-20. doi:10.3390/genes12030349

4. Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell*. 2017;31(2):172-179. doi:10.1016/j.ccell.2017.01.002

5. Poulet G, Massias J, Taly V. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytologica*. 2019;63(6):449-455. doi:10.1159/000499337

6. Heidrich I, Ačkar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K. Liquid biopsies: Potential and challenges. *International Journal of Cancer*. 2021;148(3):528-545. doi:10.1002/ijc.33217

7. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017;14(9):531-548. doi:10.1038/nrclinonc.2017.14

8. Wang J, Chang S, Li G, Sun Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Frontiers of Medicine*. 2017;11(4):522-527. doi:10.1007/s11684-017-0526-7

9. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discovery*. 2016;6(5):479-491. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1483

10. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(7):409-424. doi:10.1038/s41571-019-0187-3

11. Rossi G, Ignatiadis M. Promises and pitfalls of using liquid biopsy for precision medicine. *Cancer Research*. 2019;79(11):2798-2804. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3402

12. NATIONAL CANCER INSTITUTE. NCI Dictionary of Cancer Terms: http://www.cancer.gov/dictionary. Published 2014. Accessed July 6, 2022. https://www.nlm.nih.gov/research/umls/sourcereleasedocs/current/NCI_NCI-GLOSS/index.html

13. Nishiya AT, Massoco CO, Felizzola CR, et al. Comparative aspects of canine melanoma. *Veterinary Sciences*. 2016;3(1). doi:10.3390/vetsci3010007

14. Dow S. A Role for Dogs in Advancing Cancer Immunotherapy Research. *Frontiers in Immunology*. 2020;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02935

15. Prouteau A, André C. Canine melanomas as models for human melanomas: Clinical, histological, and genetic comparison. *Genes (Basel)*. 2019;10(7). doi:10.3390/genes10070501

16. Knoblaugh SE, Hohl TM, la Perle KMD. Pathology Principles and Practices for Analysis of Animal Models. *ILAR Journal*. 2018;59(1):40-50. doi:10.1093/ilar/ilz001

17. Barutello G, Rolih V, Arigoni M, et al. Strengths and weaknesses of pre-clinical models for human melanoma treatment: Dawn of dogs' revolution for immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(3). doi:10.3390/ijms19030799

18. Colombe P, Béguin J, Benchekroun G, le Roux D. Blood biomarkers for canine cancer, from human to veterinary oncology. *Veterinary and Comparative Oncology*. Published online July 11, 2022. doi:10.1111/vco.12848

19. Chibuk J, Flory A, Kruglyak KM, et al. Horizons in Veterinary Precision Oncology: Fundamentals of Cancer Genomics and Applications of Liquid Biopsy for the Detection, Characterization, and Management of Cancer in Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021;8. doi:10.3389/fvets.2021.664718

20. Colombo J, Moschetta-Pinheiro MG, Novais AA, et al. Liquid biopsy as a diagnostic and prognostic tool for women and female dogs with breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(20). doi:10.3390/cancers13205233

21. de Oliveira JR, Colombo J, Gonçalves FM, et al. Liquid biopsy can detect *BRCA2* gene variants in female dogs with mammary neoplasia. *Veterinary and Comparative Oncology*. 2022;20(1):164-171. doi:10.1111/vco.12758

22. Prouteau A, Denis JA, de Fornel P, et al. Circulating tumor DNA is detectable in canine histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma, and multicentric lymphoma. *Scientific Reports*. 2021;11(1):877. doi:10.1038/s41598-020-80332-y

23. Vasseur A, Kiavue N, Bidard FC, Pierga JY, Cabel L. Clinical utility of circulating tumor cells: an update. *Molecular Oncology*. 2021;15(6):1647-1666. doi:10.1002/1878-0261.12869

24. Li X, Li Y, Shao W, Li Z, Zhao R, Ye Z. Strategies for enrichment of circulating tumor cells. *Translational Cancer Research*. 2020;9(3):2012-2025. doi:10.21037/tcr.2020.01.17

25. Marconato L, Facchinetti A, Zanardello C, et al. Detection and Prognostic Relevance of Circulating and Disseminated Tumour Cell in Dogs with Metastatic Mammary Carcinoma: A Pilot Study. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2):163. doi:10.3390/cancers11020163

26. Jeong KY, Kim E, Park M, Kim H. Perspective on Cancer Therapeutics Utilizing Analysis of Circulating Tumor Cells. *Diagnostics*. 2018;8(2):23. doi:10.3390/diagnostics8020023

27. da Costa A, Kohn B, Gruber AD, Klopfleisch R. Multiple RT-PCR markers for the detection of circulating tumour cells of metastatic canine mammary tumours. *Veterinary Journal*. 2013;196(1):34-39. doi:10.1016/j.tvjl.2012.08.021

28. da Costa A, Oliveira JT, Gärtner F, Kohn B, Gruber AD, Klopfleisch R. Potential markers for detection of circulating canine mammary tumor cells in the peripheral blood. *The Veterinary Journal*. 2011;190(1):165-168. doi:10.1016/j.tvjl.2010.09.027

29. da Costa A, Lenze D, Hummel M, Kohn B, Gruber AD, Klopfleisch R. Identification of Six Potential Markers for the Detection of Circulating Canine Mammary Tumour Cells in the Peripheral Blood Identified by Microarray Analysis. *Journal of Comparative Pathology*. 2012;146(2-3):143-151. doi:10.1016/j.jcpa.2011.06.004

30. Smith SH, Goldschmidt MH, Mcmanus PM. *A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms*. Vol 39.; 2002.

31. Spangler WL, Kass PH. The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. *Veterinary Pathology*. 2006;43(2):136-149. doi:10.1354/vp.43-2-136

32. Bergman PJ. Canine Oral Melanoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 2007;22(2):55-60. doi:10.1053/j.ctsap.2007.03.004

33. Fonseca-Alves CE, Ferreira Ê, de Oliveira Massoco C, et al. Current Status of Canine Melanoma Diagnosis and Therapy: Report From a Colloquium on Canine Melanoma Organized by ABROVET (Brazilian Association of Veterinary Oncology). *Frontiers in Veterinary Science*. 2021;8. doi:10.3389/fvets.2021.707025

34. Smedley RC, Bongiovanni L, Bacmeister C, et al. Diagnosis and histopathologic prognostication of canine melanocytic neoplasms: A consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Veterinary and Comparative Oncology*. Published online July 4, 2022. doi:10.1111/vco.12827

35. Wright T, Brisson BA, Wood GA, et al. Flow Cytometric Detection of Circulating Osteosarcoma Cells in Dogs. *Cytometry Part A*. 2019;95(9):997-1007. doi:10.1002/cyto.a.23847

36. Rodic S, Mihalcioiu C, Saleh RR. Detection methods of circulating tumor cells in cutaneous melanoma: A systematic review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2014;91(1):74-92. doi:10.1016/j.critrevonc.2014.01.007

37. Aya-Bonilla CA, Morici M, Hong X, et al. Detection and prognostic role of heterogeneous populations of melanoma circulating tumour cells. *British Journal of Cancer*. 2020;122(7):1059-1067. doi:10.1038/s41416-020-0750-9

38. Marsavela G, Aya-Bonilla CA, Warkiani ME, Gray ES, Ziman M. Melanoma circulating tumor cells: Benefits and challenges required for clinical application. *Cancer Letters*. 2018;424:1-8. doi:10.1016/j.canlet.2018.03.013

39. Grzywa TM, Paskal W, Włodarski PK. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Translational Oncology*. 2017;10(6):956-975. doi:10.1016/j.tranon.2017.09.007

40. Alsaihati BA, Ho KLL, Watson J, et al. Canine tumor mutational burden is correlated with TP53 mutation across tumor types and breeds. *Nature Communications*. 2021;12(1):4670. doi:10.1038/s41467-021-24836-9

41. Khoja L, Lorigan P, Dive C, Keilholz U, Fusi A. Circulating tumour cells as tumour biomarkers in melanoma: Detection methods and clinical relevance. *Annals of Oncology*. 2015;26(1):33-39. doi:10.1093/annonc/mdu207

42. Dolfi SC, Li L, Chan -Ying, et al. *The Metabolic Demands of Cancer Cells Are Coupled to Their Size and Protein Synthesis Rates*.; 2013. http://www.cancerandmetabolism.com/content/1/1/20

43. Aya-Bonilla CA, Marsavela G, Freeman JB, et al. *Isolation and Detection of Circulating Tumour Cells from Metastatic Melanoma Patients Using a Slanted Spiral Microfluidic Device*.; 2017. www.impactjournals.com/oncotarget

44. Broncy L, Paterlini-Bréchot P. Cancer-associated circulating atypical cells with both epithelial and macrophage-specific markers. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*. 2018;3:91-91. doi:10.21037/jlpm.2018.10.05

45. de Giorgi V, Pinzani P, Salvianti F, et al. Application of a filtration- and isolation-by-size technique for the detection of circulating tumor cells in cutaneous melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010;130(10):2440-2447. doi:10.1038/jid.2010.141

46. Giudice C, Ceciliani F, Rondena M, Stefanello D, Grieco V. Immunohistochemical investigation of PNL2 reactivity of canine melanocytic neoplasms and comparison with Melan A. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2010;22(3):389-394. doi:10.1177/104063871002200307

47. Weinstein D, Leininger J, Hamby C, Safai B. *Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Melanoma*. Vol 7.; 2014.

48. Stokol T, Erb HN. A comparison of platelet parameters in EDTA- and citrate-anticoagulated blood in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*. 2007;36(2):148-154. doi:10.1111/j.1939-165X.2007.tb00201.x

49. Braun AC, Campos FAB, Abdallah EA, et al. Circulating Tumor Cells in Desmoid Tumors: New Perspectives. *Frontiers in Oncology*. 2021;11. doi:10.3389/fonc.2021.622626

50. Hall CS, Ross M, Bowman Bauldry JB, et al. Circulating Tumor Cells in Stage IV Melanoma Patients. *J Am Coll Surg*. 2018;227(1):116-124. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2018.04.026

51. Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Role of S100 proteins in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2020;1867(6):118677. doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118677

52. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(2):96-109. doi:10.1038/nrc3893

53. Umer M, Vaidyanathan R, Nguyen NT, Shiddiky MJA. Circulating tumor microemboli: Progress in molecular understanding and enrichment technologies. *Biotechnology Advances*. 2018;36(4):1367-1389. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.05.002

54. Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic — implementation issues and future challenges. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2021;18(5):297-312. doi:10.1038/s41571-020-00457-x

55. Rao C, Bui T, Connelly M, et al. Circulating melanoma cells and survival in metastatic melanoma. *International Journal of Oncology*. 2011;38(3):755-760. doi:10.3892/ijo.2011.896

56. Roland CL, Ross MI, Hall CS, et al. Detection of circulating melanoma cells in the blood of melanoma patients: A preliminary study. *Melanoma Research*. 2015;25(4):335-341. doi:10.1097/CMR.0000000000000168

57. Ulmer A, Schmidt-Kittler O, Fischer J, et al. Immunomagnetic Enrichment, Genomic Characterization, and Prognostic Impact of Circulating Melanoma Cells. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(2):531-537. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0424-03

58. Kamińska P, Buszka K, Zabel M, Nowicki M, Alix-Panabières C, Budna-Tukan J. Liquid biopsy in melanoma: Significance in diagnostics, prediction and treatment monitoring. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(18). doi:10.3390/ijms22189714

59. Chinen LTD, de Carvalho FM, Rocha BMM, et al. Cytokeratin-based CTC counting unrelated to clinical follow up. *Journal of Thoracic Disease*. 2013;5(5):593-599. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.09.18

6 CONCLUSÃO

Frente aos dados expostos, muitas dificuldades foram encontradas para a correta adaptação da técnica à realidade veterinária. Características inerentes ao próprio método e a dificuldade no transporte rápido das amostras até laboratório podem ter introduzido viés nos resultados. Este estudo serve para demonstrar que, apesar de todas as suas potenciais aplicabilidades, a biópsia líquida também tem as suas limitações, e estas deverão ser adaptadas a realidade dos pacientes veterinários e tutores para que possa ser empregada de forma confiável.

Foi demonstrado que a metodologia ISET pode ser aplicada para a detecção de células tumorais circulantes em cães com melanoma oral, sendo uma técnica sensível para detectar CTCs em maior frequência nas amostras de animais com metástase linfonodal. No entanto, o baixo grupo amostral deve ser levado em consideração, e esse achado precisa ser confirmado em um estudo com um maior número de pacientes.

O presente trabalho ilustra que a biópsia líquida tem grande potencial para a aplicação na oncologia veterinária. Essa é uma área pouco explorada e com grande potencial de crescimento. Visto que foram observados resultados promissores com a adaptação da metodologia, a implementação da biópsia líquida na medicina veterinária pode ser um caminho para melhorar a conduta clínica com os pacientes oncológicos, especialmente no caso de neoplasias agressivas como o melanoma.