



REVISIÓN

Análisis de biopsias líquidas para el diagnóstico del cáncer: revisión sistemática



Joana Hernández Jiménez y Consuelo Borrás Blasco*

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de abril de 2020
Aceptado el 10 de agosto de 2020
On-line el 5 de octubre de 2020

Palabras clave:

Biopsia líquida
Cáncer
Exosomas
Biomarcadores

Keywords:

Liquid biopsy
Cancer
Exosomes
Biomarkers

R E S U M E N

La incidencia del cáncer ha aumentado en los últimos años, especialmente en mayores de 65 años, suponiendo un problema sanitario de primer orden. Muchos tumores presentan mal pronóstico debido a que se diagnostican en etapas muy avanzadas, por ello muestra especial importancia incorporar en la práctica clínica la biopsia líquida como método para la detección tumoral en etapas muy tempranas. Se ha realizado una revisión sistemática con el objetivo principal de analizar la bibliografía disponible sobre la utilización de la biopsia líquida en el diagnóstico precoz del cáncer, y como objetivo secundario, conocer los tipos tumorales que pueden ser diagnosticados precozmente mediante la biopsia líquida y los biomarcadores disponibles. Los resultados indican una falta de concordancia en los biomarcadores detectados y tecnologías aplicadas, lo que destaca la necesidad de realizar estudios multicéntricos en grandes cohortes y establecer protocolos de actuación, para aumentar la validez analítica y poder disponer de un *screening* para cada tipo de tumor, lo cual sería un adelanto muy importante, pues podría mejorar en gran medida el manejo de los pacientes con cáncer.

© 2020 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Analysis of liquid biopsies for cancer diagnosis: Systematic review

A B S T R A C T

The incidence of cancer has increased in recent years, especially in those over 65 years of age, posing a major health problem. Many tumours have a poor prognosis because they are diagnosed at very advanced stages. It is therefore especially important to incorporate liquid biopsy into clinical practice as a method for detecting tumours at very early stages. A systematic review was conducted, with the main objective of analysing the available literature on the use of liquid biopsy in the early diagnosis of cancer, and as a secondary objective, to determine the types of tumours that can be diagnosed early by liquid biopsy and the available biomarkers. The results indicate a lack of agreement with the biomarkers detected and the technologies applied. This highlights the need for multicentre studies to look at large cohorts and to establish protocols of action, as well as to increase analytical validity and the possibility of using a screening test for each type of tumour. This could be a very important step forward, as it could improve the management of cancer patients to a great extent.

© 2020 SEGG. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Cáncer y envejecimiento

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por el fracaso del control de división y muerte celular como resultado de

una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en varios puntos de los mecanismos de regulación celular, ocasionando un deterioro de tejidos¹. Supone un problema sanitario de primer orden y según datos de la Organización Mundial de la Salud se estima que en 2018 fallecieron 9,6 millones de personas por cáncer, ocupando la segunda causa de defunciones en los países desarrollados, después de las enfermedades cardiovasculares, siendo el cáncer de pulmón la principal causa de muerte tumoral².

La incidencia del cáncer en mayores de 65 años ha aumentado en los últimos años de modo directamente proporcional al incre-

* Autora para correspondencia.

Correo electrónico: Consuelo.borras@uv.es (C. Borrás Blasco).

mento en la esperanza de vida. Aproximadamente la mitad de los tumores se diagnostican en mayores de 65 años y una cuarta parte en mayores de 75 años³.

En España el cáncer más prevalente en hombres es el de próstata, seguido del cáncer de pulmón y colorrectal, mientras que en las mujeres encontramos en primera posición el cáncer de mama, seguido del colorrectal y cáncer de cuello de útero⁴.

Importancia del diagnóstico precoz

Las células tumorales poseen una capacidad metastásica en diferentes tejidos. Como mecanismo previo encontramos una heterogeneidad celular, donde las células adoptan características similares a las células mesenquimales embrionarias mediante procesos de desdiferenciación y rediferenciación. Este fenómeno dinámico constituye una limitación importante a la hora de realizar un correcto diagnóstico⁵, debido a que muchos tumores presentan mal pronóstico a causa de su diagnóstico en etapas avanzadas. En la población anciana encontramos limitaciones sobreañadidas en el retraso diagnóstico debido a factores como la sintomatología de enfermedades crónicas que puede enmascarar la clínica de neoplasias malignas, y la exclusión de los programas de detección precoz a partir de una determinada edad para el cáncer de mama, cuello de útero y colorrectal⁶.

Biopsia líquida

La biopsia líquida consiste en un procedimiento no extremadamente invasivo, donde a partir de muestras de diversos fluidos corporales podemos aislar componentes celulares como células tumorales circulantes (CTC), ácidos nucleicos tumorales circulantes (ctDNA) y expresión de miARN, tanto del tumor primario como de las metástasis. Como muestras se pueden utilizar múltiples fluidos biológicos como plasma, orina, saliva, secreción nasal, leche materna, líquido amniótico, fluido uterino, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico, lavado broncoalveolar, heces, lágrimas y semen¹.

Actualmente las biopsias tisulares son el estándar del diagnóstico tumoral en la práctica clínica, pero presentan algunas limitaciones que la biopsia líquida es capaz de compensar, por ello el uso de biomarcadores a partir de biopsia líquida supone un importante adelanto en el diagnóstico precoz de procesos tumorales^{1,5,7}.

Exosomas

Entre las células del organismo existe un intercambio de información imprescindible para el mantenimiento de la homeostasis. Uno de los mecanismos de comunicación más importantes es la liberación de moléculas solubles, donde destacamos los exosomas¹. Estos son vesículas de pequeño tamaño (entre 30 y 150 nm de diámetro) rodeadas por una doble membrana lipídica en cuyo interior encontramos proteínas, lípidos y ácidos nucleicos¹. Su biogénesis comienza en los endosomas, maduran y se fusionan con la membrana plasmática formando microvesículas endosomales para posteriormente liberarse al espacio extracelular y ser captadas por nuevas células. Dicha liberación se produce mediante exocitosis por diversos tipos celulares pero puede verse alterada en las células tumorales⁵. Las funciones fisiológicas de los exosomas son diversas en función de las células de las que derivan, destacando el mantenimiento de la homeostasis, la modulación de la respuesta inmune, papel en el desarrollo embrionario, enfermedades neurodegenerativas y síntesis de melanina. Pero también pueden participar como mediadores de comunicación tumoral mediante el transporte de oncoproteínas y onco-ARN, ya desde las primeras fases de la alteración de la división celular. Los pacientes con cáncer tienen niveles más

altos de exosomas que los individuos sanos, por ello la utilización de la biopsia líquida y la búsqueda de biomarcadores en el interior de los exosomas circulantes es algo prometedor para el diagnóstico precoz del cáncer¹.

Justificación

Dada la gran repercusión sociosanitaria que supone el cáncer especialmente en pacientes mayores de 65 años, introducir la biopsia líquida como método de diagnóstico precoz en la práctica clínica sería un acontecimiento importante, lo cual podría reducir a gran escala la mortalidad. Para ello consideramos muy importante conocer toda la información disponible hasta el momento, y a partir de ahí crear nuevas líneas de investigación en aquellos campos donde no haya conclusiones significativas, que permitan determinar biomarcadores específicos para diferentes tipos de cáncer.

Este estudio se ha realizado con el objetivo principal de analizar la bibliografía disponible sobre la utilización de la biopsia líquida en el diagnóstico precoz del cáncer. También se han establecido como objetivos secundarios conocer los tipos de cáncer que pueden ser diagnosticados precozmente mediante la biopsia líquida y los biomarcadores disponibles.

Material y métodos

Estrategia de búsqueda de información y fuentes

Este trabajo se ha basado en la búsqueda bibliográfica en bases de datos científicas para obtener un mayor conocimiento sobre el uso de la biopsia líquida en el diagnóstico precoz del cáncer.

La búsqueda se inició en julio del 2019 y se actualizó en octubre del 2019. La principal fuente de información utilizada para la búsqueda bibliográfica ha sido PubMed, usando la estrategia de búsqueda [liquid biopsy (All Fields/MeSH Terms) AND cancer (All Fields)].

De la búsqueda se obtuvieron como resultado 3.353 publicaciones. Para acotar la búsqueda a un número menor de publicaciones se han utilizado una serie de filtros o limitadores de búsqueda: fecha de publicación en los últimos 5 años, acotando los resultados a un total de 2.454 artículos y únicamente en humanos, excluyendo otros 916 estudios. Otro limitador fue la selección por tipo de estudio [Clinical Trial AND Metanalysis AND Reviews AND Systematic Reviews] obteniendo un total de 575 artículos.

Tras sucesivas lecturas de los artículos, muchos de los estudios fueron excluidos por centrarse principal o únicamente en el desarrollo de técnicas y métodos de procesamiento de la biopsia líquida, enfermedad mínima residual, monitorización de un tratamiento determinado, monitorización de metástasis, método complementario a otras pruebas, valoración de la evolución de la enfermedad o cualquier otro uso ajeno al diagnóstico precoz. El resultado de búsqueda final fue de 48 estudios seleccionados a los que se añadieron 24 artículos ajenos a la búsqueda inicial (los cuales se obtuvieron en base a la bibliografía mencionada en los otros 48 artículos válidos utilizados) y 3 páginas web consultadas, obteniendo un total de 75 referencias bibliográficas (fig. 1).

Criterios de inclusión y exclusión

Para concretar la elección de estudios válidos para la realización del trabajo se han establecido unas características, las cuales todos los estudios deben tener en común, y así evitar discrepancias y sesgos de selección (tabla 1).

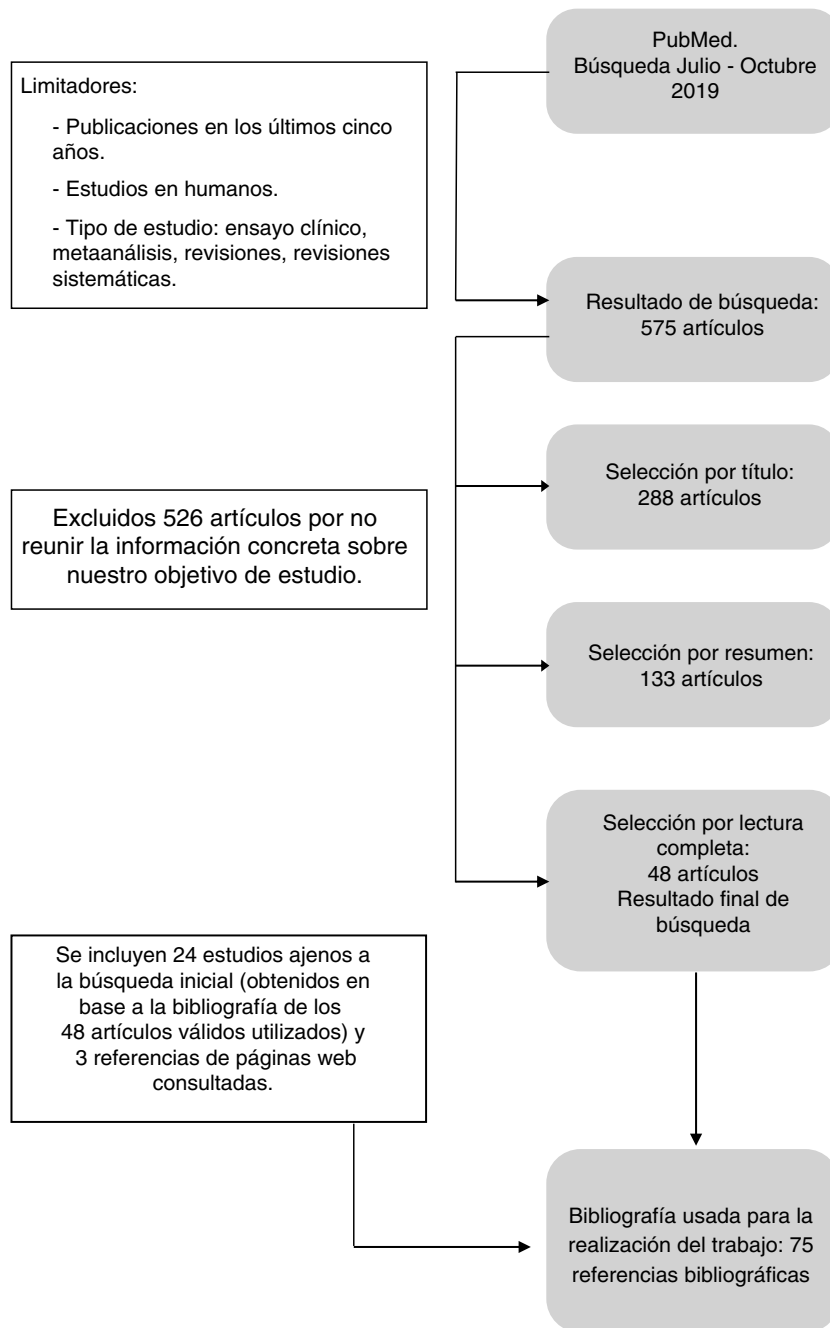


Figura 1. Diagrama de estrategia de búsqueda de información. Fuente: elaboración propia.

Tabla 1

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Estudios publicados en los últimos 5 años	Estudios con información referente a biomarcadores relacionados con el pronóstico de la enfermedad
Estudios realizados en humanos	Estudios con información referente a biomarcadores útiles para la monitorización o respuesta del tratamiento, recidiva de la enfermedad y monitorización de la enfermedad mínima residual
Tipo de estudio: ensayo clínico, metaanálisis, estudios de revisión o revisión sistemática	Estudios basados en el uso de la biopsia líquida para la monitorización de metástasis o evolución de la enfermedad
Estudios publicados en inglés o español	Estudios basados en mutaciones concretas para posteriormente diseñar y aplicar un tratamiento específico
Información referente al diagnóstico precoz	Estudios relacionados únicamente con información técnica sobre el desarrollo de las pruebas diagnósticas

Fuente: elaboración propia.

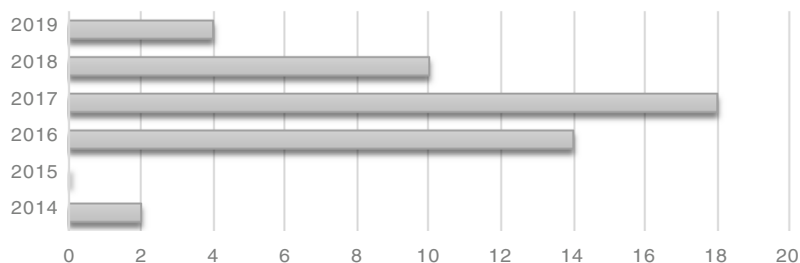


Figura 2. Clasificación de los estudios por fecha de publicación. Fuente: elaboración propia.

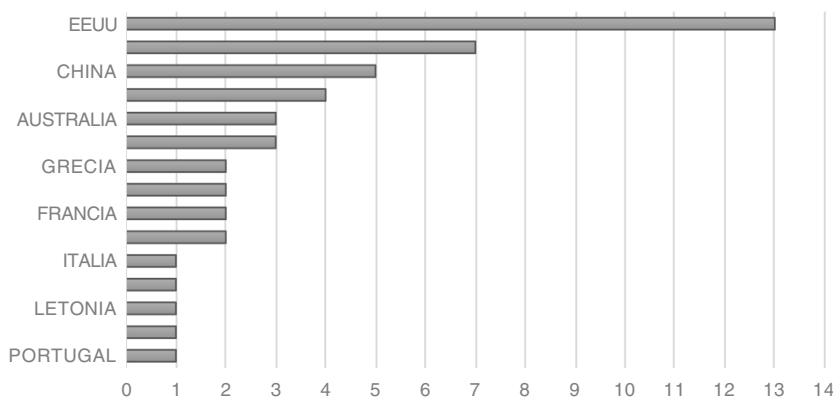


Figura 3. Clasificación de los estudios por país de procedencia. Fuente: elaboración propia.

Resultados

Resultados de la búsqueda

Los 48 estudios recogidos como resultado de la búsqueda bibliográfica presentan una serie de rasgos comunes, pero también unas características propias de cada estudio, a partir de las cuales hemos realizado unas tablas comparativas con el fin de reagrupar los resultados (*archivo suplementario 1*). En lo referente a la metodología de los estudios incluidos en la revisión, presentan gran heterogeneidad en el diseño, tamaño muestral, variables estudiadas y resultados obtenidos, por lo que no son estrictamente comparables.

En función de la fecha de publicación de los estudios, de forma general encontramos un aumento de las publicaciones en los últimos años, lo que indica un importante y reciente campo de estudio. De los estudios publicados en el 2015 no se seleccionó ninguno debido a que no reunían criterios de inclusión y se centraban en el desarrollo de las tecnologías utilizadas. También en 2018 y 2019 los estudios seleccionados fueron menores debido a que la gran mayoría se basaban en dianas terapéuticas y monitorización de la enfermedad y no en el diagnóstico (*fig. 2*).

El tema tratado despierta un gran interés internacional, debido a que la publicación de estudios al respecto está muy extendida en diferentes países, destacando Estado Unidos (*fig. 3*).

En relación con el tema principal de los resultados, 36 publicaciones (el 73,5% de los estudios) hablan sobre un tejido tumoral concreto, mientras que 6 de ellas (12,2%) revelan información sobre varios tipos de cáncer, aportando datos, bien de forma conjunta de los diferentes tejidos o de forma grupal y comparativa. El 14,3% restante, pertenece a 6 estudios que no se centran en un tipo específico de cáncer, sino que muestran información general sobre la biopsia líquida (*fig. 4*).

Entre los tipos de cáncer más estudiados encontramos los de mayor incidencia en la población, como el cáncer de próstata, sistema nervioso central, pulmón, mama y grastrintestinal (*fig. 5*).

Análisis de los resultados por tipo de cáncer

En la revisión se ha realizado un análisis exhaustivo segmentado sobre los biomarcadores disponibles para cada tipo de cáncer, así como la evaluación del tipo de muestra y medio utilizado, técnica de análisis de datos, AUC, sensibilidad y especificidad de cada prueba (*archivo suplementario 2*).

Evaluación global de los resultados

Actualmente el diagnóstico estándar de muchos tumores es la biopsia tisular, pero no revela el paisaje completo de toda la población de células tumorales del paciente⁸. Como alternativa, está en estudio la biopsia líquida como prueba diagnóstica precoz en el proceso tumoral, mediante la detección de biomarcadores específicos. Aproximadamente la sangre humana contiene 1,5 millones de exosomas/ml, doblando estas concentraciones en pacientes con cáncer⁹.

En 2016 se realizó una revisión que recoge las ventajas y desventajas de las diferentes fuentes utilizadas en la biopsia líquida. En primer lugar, la utilización de CTC tiene como ventajas la cuantificación y detección de reordenamientos y mutaciones puntuales, pero requiere alto coste y múltiples métodos de detección, sin existir una estandarización metodológica. En segundo lugar, los niveles de ctDNA y su carga mutacional se correlacionan estrechamente con la carga tumoral y pueden ser detectados por técnicas de secuenciación (NGS), con un procesamiento más fácil a partir de plasma en comparación con las CTC. Como desventaja, el ctDNA está altamente fragmentado y la detección de reordenamientos supone mayor dificultad. Generalmente los niveles de ctDNA se encuentran aumentados ante trastornos como el cáncer, infarto de miocardio, infecciones graves, embarazo y afecciones inflamatorias como resultado de muerte celular (ya sea por necrosis o apoptosis); por el contrario, permanece en niveles bajos en individuos sanos, aunque en ocasiones puede originarse también a partir de

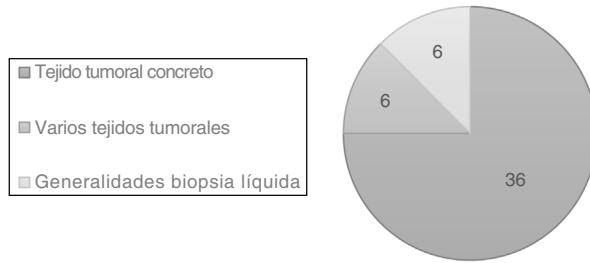


Figura 4. Clasificación de los estudios por temática. Fuente: elaboración propia.

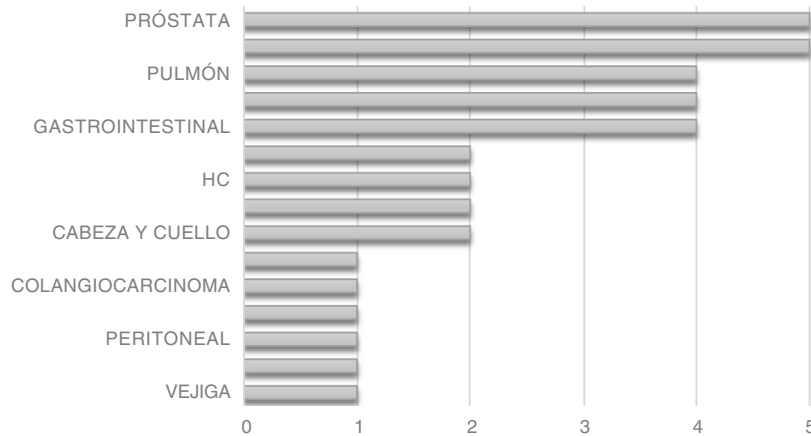


Figura 5. Clasificación de los estudios por tipo de cáncer abordado o tema principal. Fuente: elaboración propia.

células normales, dando falsos positivos¹⁰. Por último, los tumores muestran una expresión de miRNA único para cada tipo tumoral⁹, altamente reproducible y más económico que otras muestras, pero aporta menos datos. Alguno de ellos regulan negativamente varios genes supresores de tumores¹¹. Disponemos de diferentes miRNA sin obtener una estandarización para cada tipo de cáncer¹². La cantidad total de miRNA en suero y plasma es mucho menor que la aislada en tejidos específicos. Por ello, se deben desarrollar métodos de detección con mayor sensibilidad y especificidad que permitan una rápida cuantificación de miRNA¹³.

Según los resultados obtenidos de nuestra búsqueda, la mayor parte de los estudios que aportan información sobre el tipo de fuente utilizada se centran en el uso de exosomas o ctDNA, seguido de miRNA y en último lugar CTC¹⁴.

En relación con las muestras, la utilización de los distintos fluidos corporales difiere entre distintos estudios, siendo el plasma el principal medio (41,7% de los estudios de la revisión), seguido del suero (30%), orina (8,3%), líquido cefalorraquídeo (6,7%) y en menor medida el líquido biliar, líquido ascítico, esputo, saliva, heces y jugo pancreático. Diversos estudios relacionados con los tumores de tracto genitourinario coinciden en determinar biomarcadores a partir de muestras de orina utilizando los sedimentos que contiene, al igual que otros estudios sobre cáncer de próstata y cervix¹⁵.

Son muchos los biomarcadores estudiados en diferentes investigaciones (fig. 6). El miR21 posee alta sensibilidad en la patología tumoral, pero carece de especificidad, lo que limita su capacidad como herramienta diagnóstica. Entre los miRNA más comunes mencionados en varios estudios encontramos: miR1246 (en cáncer colorrectal y tumores gastrointestinales), miR150 (en CCR y CC) y miR122 (CC y HC). El miRNA125 ha demostrado ser un onco-ARN en el cáncer de próstata, pero también puede actuar como un supresor tumoral en cáncer de ovario y de mama¹⁶. Actuales investigaciones utilizan el CA125 como marcador principalmente para ovario y

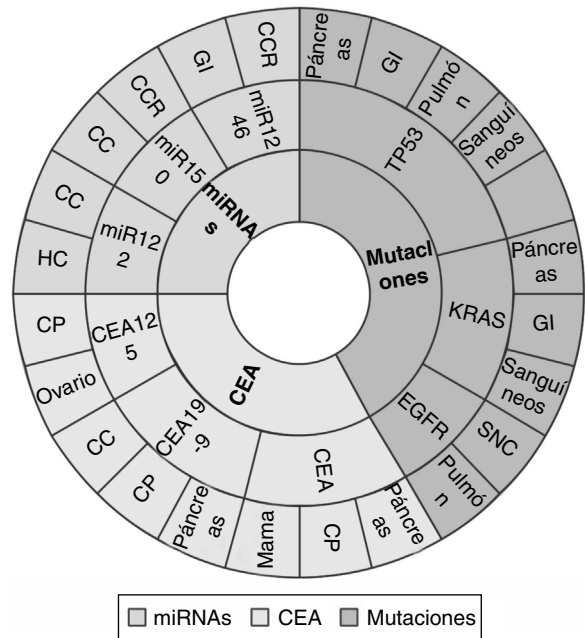


Figura 6. Principales biomarcadores estudiados de forma común en varios tipos de cáncer. CC: colangiocarcinoma; CCR: cáncer colorrectal; CP: carcinomatosis peritoneal; GI: cáncer gastrointestinal; HC: hepatocarcinoma; SNC: sistema nervioso central. Fuente: elaboración propia.

carcinomatosis peritoneal, aunque también se ha visto relacionado con endometrio, pulmón y mama¹⁷. También otros marcadores estudiados de forma común en varias investigaciones son el CAE (para cáncer de mama, CP y tumores de páncreas) y CA19-9 (para CC, CP y cáncer de páncreas). Diferentes tumores presentan

alteraciones comunes, entre las que destacamos la mutación TP53 (en tumores sanguíneos, pulmón, páncreas, gastrointestinales, cabeza y cuello), la mutación KRAS (en tumores sanguíneos, gastrointestinales y páncreas) y por último EGFR (en cáncer de pulmón y SNC).

La expresión de glicoproteína-1 en la superficie de exosomas se relaciona con cáncer de páncreas, gliomas y cáncer de mama¹⁷ y la liberación de la proteína HSP60 por células tumorales se correlaciona con un mayor riesgo de desarrollo tumoral en términos generales¹⁸.

La obtención de los exosomas presenta gran dificultad debido a su pequeño tamaño. Hasta estos momentos, los métodos convencionales se basan en ultracentrifugaciones de larga duración o precipitación por propiedades, con el objetivo de concentrar muestras con gran volumen y laborioso proceso de detección. Para solucionar estos retos tecnológicos de aislamiento y análisis se han diseñado dispositivos microfluídicos para recolectar exosomas intactos directamente de muestras biológicas. Estos sistemas suponen un gran avance en el aislamiento de altas concentraciones de exosomas, pero es necesario desarrollar nuevas tecnologías altamente sensibles y específicas que faciliten y agilicen el proceso¹⁹. La centrifugación puede ser inadecuada debido a la contaminación de otros tipos de microvesículas. La separación por gradiente de densidad también ha sido un método utilizado comúnmente, pero a pesar de aumentar la pureza de la fracción exosomal obtenida, el rendimiento puede no ser superior a los métodos descritos anteriormente. Por tanto, se prefiere la ultrafiltración para la detección de exosomas¹⁹. Junto a estos métodos también se usan ExoChips de alto rendimiento, mediante microcanales.

La principal técnica de identificación de biomarcadores, según los resultados de nuestra revisión, es qPCR, pero sin grandes diferencias respecto a otras técnicas. Debido al amplio uso de diferentes técnicas (NGS, qPCR, dPCR, RT-PCR, PCR múltiple y espectrometría de masas) no es posible llegar a una conclusión concisa sobre el uso preferente de un método¹⁴.

Recientemente se han obtenido datos de biomarcadores salivares con alta sensibilidad y especificidad, útil como medio diagnóstico en la detección temprana de tumores de páncreas, mama, pulmón, gástrico y orales²⁰.

A pesar de los datos obtenidos hasta el momento, la puesta en práctica de la biopsia líquida como método diagnóstico requiere la optimización de la sensibilidad y especificidad de las pruebas e instrumentos utilizados, junto con la realización de estudios clínicos multicéntricos en cohortes mayores de pacientes²¹. Las bajas tasas de sensibilidad pueden explicarse por la falta de consenso en el tipo de muestra, técnicas de detección o condiciones de almacenamiento utilizadas⁸.

Discusión

El diagnóstico precoz del cáncer ha sido durante muchos años uno de los objetivos principales de la investigación científica.

Tras analizar el marco actual del cáncer, muestra especial importancia incorporar en la práctica clínica métodos para la detección tumoral en etapas muy tempranas. Actualmente, las biopsias tisulares aportan gran información y son el estándar diagnóstico tumoral, pero suponen un procedimiento invasivo. En determinadas situaciones son impracticables, debido al estadio inicial en el que se encuentran algunos tumores, así como su heterogeneidad. Un acontecimiento importante ha sido el descubrimiento de la biopsia líquida, que surge como una herramienta capaz de compensar estas limitaciones mediante el estudio de biomarcadores específicos, ofreciendo la posibilidad de detectar el cáncer en estadios muy precoces, donde aún las células cancerosas no han formado una masa tumoral⁵.

A pesar de los grandes avances científicos, la biopsia líquida no está establecida de forma rutinaria en la práctica clínica como método diagnóstico, por lo que se debe continuar en esta línea de investigación hasta conseguir su implantación como método de *screening*. Uno de los componentes que se estudian en la biopsia líquida son los exosomas, los cuales están implicados en la invasión tumoral, donde las células cancerosas de mayor grado secretan mayores cantidades que las de grado inferior²².

El reciente conocimiento sobre estas nanovesículas proporciona una nueva visión y abre un camino hacia nuevas directrices en oncología. Recientemente, el número de publicaciones sobre exosomas y ctDNA está aumentando rápidamente, pero la mayoría son estudios pequeños y muy pocos tienen una validez analítica.

Hasta el momento, son muchos los biomarcadores detectados, pero ninguno ha sido validado con suficiente valor diagnóstico. Una limitación importante en su validación es el caro y lento aislamiento y procesamiento de los exosomas. Mediante el desarrollo de métodos rápidos, económicos, altamente sensibles y específicos para identificar marcadores se podría aumentar la supervivencia de los pacientes y mejorar su calidad de vida durante el proceso de la enfermedad, avanzando hacia una oncología molecular de mayor precisión⁹.

Como punto común a todas las investigaciones, el plasma destaca como fuente principal de ctDNA, usando EDTA como anticoagulante. El suero contiene normalmente entre 2 y 24 veces más ctDNA que el plasma, pero probablemente se debe a una contaminación por ADN derivado de la rotura de los glóbulos blancos durante la coagulación. Por ello los niveles de ctDNA son más estables en plasma que en suero²³, de ahí la tendencia a realizar estudios sobre todo a partir de muestras de plasma en lugar de suero.

Los estudios también difieren en las muestras obtenidas (plasma, suero y orina) y metodologías estadísticas. Debido a la falta de unificación de criterios, no es posible comparar los estudios publicados hasta el momento²⁴.

Conclusiones

- La incorporación de la biopsia líquida en la práctica clínica como método de diagnóstico precoz del cáncer podría reducir en gran medida las muertes por cáncer.
- Los exosomas están implicados en la secuencia del proceso invasivo del cáncer.
- Recientes investigaciones no solo se centran en el estudio de los marcadores de forma aislada, sino que evalúan posibles combinaciones como un conjunto, con el fin de aumentar la sensibilidad diagnóstica.
- Existe una falta de concordancia en los biomarcadores detectados y tecnologías aplicadas, lo que destaca la necesidad de realizar estudios multicéntricos en grandes cortes y establecer protocolos de actuación, para aumentar la validez analítica.

Financiación

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (PCIN-2017-117) y la EU Joint Programming Initiative "A Healthy Diet for a Healthy Life" (JPI HDHL INTIMIC-085) concedida a CB.

Conflicto de intereses

Las autoras declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

1. 214 entorno biológico del cáncer de mama. [Tesis]. Universidad Autónoma de Madrid. 2016; 1-214.

2. OMS: Organización Mundial de la Salud. Cáncer. [consultado 21 Ene 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
3. Sociedad Española de Geriatria y Gerontología (SEGG). V. Tratado de Geriatria para residentes. 2007. 820 p.
4. SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España: 2018. [consultado 18 Ene 2019]. Disponible en: <https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las.Cifras.del.cancer.en.Espana2018.pdf>.
5. García-Rico Fernández E, López Muñoz F. Biopsia líquida. [Tesis]. Universidad Camilo José Cela. 2017.
6. SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica. La importancia del diagnóstico precoz. [consultado 24 Feb 2019]. Disponible en: <https://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/infopublico/publicaciones/oncoviada.19.baja.pdf>.
7. Vaidyanathan R, Soon RH, Zhang P, Jiang K, Lim CT. Cancer diagnosis: From tumor to liquid biopsy and beyond. *Lab Chip*. 2019;19:11–34.
8. Vendrell JA, Mau-Them FT, Béganton B, Godreuil S, Coopman P, Solassol J. Circulating cell free tumor DNA detection as a routine tool for lung cancer patient management. *Int J Mol Sci*. 2017;18.
9. Steinbichler TB, Dudás J, Riechelmann H, Skvortsova II. The role of exosomes in cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2017;44:170–81, <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.02.006>.
10. Uttley L, Whiteman BL, Woods HB, Harnan S, Philips ST, Cree IA. Building the evidence base of blood-based biomarkers for early detection of cancer: A rapid systematic mapping review. *EBioMedicine*. 2016;10:164–73.
11. Song Y, Yu X, Zang Z, Zhao G. Circulating or tissue microRNAs and extracellular vesicles as potential lung cancer biomarkers: A systematic review. *Int J Biol Markers*. 2018;33:3–9.
12. Matikas A, Syrigos KN, Agelaki S. Circulating biomarkers in non-small-cell lung cancer: Current status and future challenges. *Clin Lung Cancer*. 2016;17:507–16.
13. Zhou B, Xu JW, Cheng YG, Gao JY, Hu SY, Wang L, et al. Early detection of pancreatic cancer: Where are we now and where are we going? *Int J Cancer*. 2017;141:231–41.
14. De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid biopsies in cancer diagnosis monitoring, and prognosis. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2019;40:172–86, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2019.01.006>.
15. Lin SY, Linehan JA, Wilson TG, Hoon DSB. Emerging utility of urinary cell-free nucleic acid biomarkers for prostate, bladder, and renal cancers. *Eur Urol Focus* [Internet]. 2017;3:265–72, <http://dx.doi.org/10.1016/j.euf.2017.03.009>.
16. Valentino A, Reclusa P, Sirera R, Giallombardo M, Camps C, Pauwels P, et al. Exosomal microRNAs in liquid biopsies: Future biomarkers for prostate cancer. *Clin Transl Oncol*. 2017;19:651–7.
17. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015;523:177–82.
18. Caruso Bavisotto C, Cappello F, Macario AJL, Conway de Macario E, Logozzi M, Fais S, et al. Exosomal HSP60: a potentially useful biomarker for diagnosis, assessing prognosis, and monitoring response to treatment. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2017;17:815–22, <http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2017.1356230>.
19. Nuzhat Z, Kinhal V, Sharma S, Rice GE, Joshi V, Salomon C. Tumour-derived exosomes as a signature of pancreatic cancer – liquid biopsies as indicators of tumour progression. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8:17279–91 [consultado 19 Ene 2019]. Disponible en: <http://www.oncotarget.com/abstract/13973>.
20. Kaczor-Urbanowicz KE, Martin Carreras-Presas C, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DTW. Saliva diagnostics – Current views and directions. *Exp Biol Med*. 2017;242:459–72.
21. Hofman P. Liquid biopsy for early detection of lung cancer. *Curr Opin Oncol*. 2017;29:73–8.
22. Wu K, Xing F, Wu SY, Watabe K. Extracellular vesicles as emerging targets in cancer: Recent development from bench to bedside. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2017;1868:538–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.10.001>.
23. Abdullah E, Idris A, Saparon A. Papr reduction using scs-slm technique in stfb mimo-ofdm. *ARNP J Eng Appl Sci*. 2017;12:3218–21.
24. Endzeliņš E, Melne V, Kalniņa Z, Lietuviets V, Riekstiņa U, Llorente A, et al. Diagnostic, prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer: A systematic review. *Mol Cancer*. 2016;15:1–13.