

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BIOMARCADORES PRECOSES E BIÓPSIA LÍQUIDA NO CANCRO DO PÂNCREAS

Trabalho submetido por
Fabian Bernard Séraphin Sena
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

julho de 2026

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BIOMARCADORES PRECOSES E BIÓPSIA LÍQUIDA NO CANCRO DO PÂNCREAS

Trabalho submetido por
Fabian Bernard Séraphin Sena
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Alexandra Maia e Silva

e coorientado por
Professora Doutora Ana Clara Ribeiro

julho de 2026

Dedicatória

À ma mamie,

Cette thèse est pour toi.

Ton départ, avant même que je rejoigne Egas Moniz pour commencer mes études de pharmacie, a profondément bouleversé ma vie. Le cancer du pancréas t'a emportée avec une brutalité difficile à accepter, laissant derrière lui un immense vide. Cette maladie avance si vite qu'elle ne laisse parfois même pas le temps de comprendre, ni celui de dire au revoir à ceux qu'on aime.

C'est en pensant à toi que j'ai choisi ce sujet de thèse. À travers ce travail, j'ai voulu te rendre hommage et apporter, à mon échelle, une petite contribution à la lutte contre cette maladie encore trop souvent diagnostiquée trop tard.

J'espère que, là où tu es, tu es fière de moi et du chemin que j'ai parcouru. Chaque page de ce travail porte un peu de toi, de ta force et de tout ce que tu m'as transmis.

Tu resteras à jamais une source de motivation dans mon parcours et dans la personne que je suis devenue.

Tu me manques chaque jour.

Agradecimentos

Gostaria de começar por expressar a minha profunda gratidão à minha orientadora, a Professora Doutora Alexandra Maia e Silva, pelo acompanhamento, disponibilidade e orientação ao longo deste trabalho. O seu rigor científico e as suas observações foram essenciais para a elaboração desta tese.

Agradeço igualmente à minha coorientadora, a Professora Doutora Ana Clara Ribeiro, pelo apoio prestado, pelas sugestões e pela ajuda nas diferentes etapas deste trabalho.

Quero também expressar a minha profunda gratidão aos meus pais, pelo apoio incondicional ao longo de todo o meu percurso académico. A sua confiança, os seus incentivos e os sacrifícios que fizeram permitiram-me avançar com determinação, mesmo nos momentos mais exigentes. Esta conquista é também deles.

Merci Maman et Papa.

Dirijo ainda um pensamento muito especial à minha mamie e ao meu papi, que infelizmente já não estão presentes para partilhar este momento comigo. O seu amor, os seus valores e tudo o que me transmitiram continuam a acompanhar-me. Mesmo na sua ausência, sinto que me guiaram ao longo deste caminho e contribuíram profundamente para a pessoa que sou hoje. Esta conquista é também dedicada a eles. Merci Papi et Mamie.

Agradeço igualmente a toda a minha família, pela presença, pelo carinho e pelo encorajamento constantes. Cada um, à sua maneira, contribuiu para me dar a força e a motivação necessárias para concluir este trabalho.

Um agradecimento muito especial à minha namorada, pela paciência, pelo apoio diário e pela compreensão. A sua presença, mesmo nos momentos de dúvida ou cansaço, foi uma fonte preciosa de equilíbrio e motivação. Obrigado por teres partilhado comigo tanto as dificuldades como as conquistas desta etapa tão importante.

Agradeço sinceramente aos meus amigos de Portugal, que me acompanharam durante estes anos de estudo longe de casa. A sua presença tornou esta experiência mais humana, mais leve e mais rica. Contribuíram para que Portugal se tornasse não apenas um lugar de estudo, mas também um verdadeiro lugar de vida, de encontros e de memórias.

Aos meus amigos de França, deixo também o meu sincero agradecimento. Apesar da distância, mantiveram-se sempre presentes através da sua amizade, das suas mensagens e dos momentos partilhados nos meus regressos.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu percurso académico e pessoal. Esta tese representa o culminar de vários anos de trabalho, esforço e aprendizagem, mas também reflete o apoio precioso de todos aqueles que me acompanharam até aqui.

Declaração de Honra

Código | IMP-EM-EI-111_01

Declaro, por minha honra, que o presente trabalho académico é original e foi elaborado por mim próprio, não se tendo recorrido a quaisquer outras fontes, para além das indicadas, usadas, adotadas literalmente ou adaptados a partir dos seus originais (em fontes impressas, não impressas ou na internet) e encontram-se adequados, identificados e citados, com observância das convenções do trabalho académico em vigor.

Mais declaro que esta Tese Biomarcadores precoces e biópsia líquida no cancro do pâncreas não foi apresentada, para efeitos de avaliação, a qualquer outra entidade ou instituição, para além da(s) diretamente envolvida(s) na sua elaboração, e que os conteúdos das versões impressa e eletrónica são inteiramente coincidentes.

Declaro, igualmente, encontrar-me ciente de que a inclusão, neste texto, de qualquer falsa declaração terá consequências legais.

Data: 29/06/2026

Declaração Conflito de Interesses (DCI)

Código | IMP-EM-EI-110_01

Eu Fabian Bernard Séraphin Sena, referente a Tese Biomarcadores e biópsia líquida no cancro do pâncreas declaro que não possuo conflitos de interesse de ordem pessoal, comercial, académica, político ou financeiro.

*caso exista conflito de interesse deve o autor sob compromisso de honra, declarar existir conflito (s) de interesse na sua participação do referido trabalho.

Data: 29/06/2026

Declaração de Financiamento

Código | IMP-EM-EI-113_01

Não Aplicável

Declaração de Ética e Registo

Código | IMP-EM-EI-112_01

Não Aplicável

Declaração de Disponibilidade de Dados

Código | IMP-EM-EI-150

A presente Declaração de Disponibilidade de Dados reflete o compromisso do Instituto Universitário Egas Moniz em promover a transparência, a reprodutibilidade científica e o acesso aberto aos dados gerados no âmbito dos projetos a decorrer nesta IES, em conformidade com os princípios éticos e legais aplicáveis e com os princípios FAIR. Esta declaração estabelece as condições e as diretrizes para o acesso, o compartilhamento e a reutilização dos dados, garantindo que sejam utilizados de forma responsável e em benefício da comunidade científica e da sociedade.

A seguinte tabela apresenta diferentes opções de partilha de dados, incluindo exemplos de formatos e níveis de acessibilidade. Deverá seleccionar a(s) opção(ões) que melhor se adequa(m) ao seu projeto, assegurando o cumprimento das diretrizes éticas e científicas aplicáveis.

Tabela 1: Exemplos de declarações de disponibilidade de dados. Onde aparece [nome do repositório, por exemplo, "pure"] deve ser preenchido

Disponibilidade de dados	Modelo de declaração de disponibilidade de dados	Política de partilha	Assinale com "x"
Dados disponíveis num repositório público que emite conjuntos de dados com DOIs	Os dados que apoiam as conclusões deste estudo estão disponíveis em [nome do repositório, por exemplo, "pure"] em http://doi.org/[doi] , número de referência [número de referência].	Partilha geral sem pedido	
Dados abertamente disponíveis num repositório público que não emite DOIs	Os dados que apoiam as conclusões deste estudo estão disponíveis em [nome do repositório] em [URL], número de referência [número de referência].	Partilha geral sem pedido	
Dados derivados de recursos do domínio público	Os dados que apoiam as conclusões deste estudo estão disponíveis em [nome do repositório] em [URL/DOI], número de referência [número de referência]. Estes dados foram obtidos a partir dos seguintes recursos disponíveis no	Partilha geral sem pedido	

Declaração de Disponibilidade de Dados

Código | IMP-EM-EI-150

Disponibilidade de dados	Modelo de declaração de disponibilidade de dados	Política de partilha	Assinale com “x”
	domínio público: [listar recursos e URLs]		
Dados disponíveis no artigo ou nos seus materiais suplementares	Os autores confirmam que os dados que suportam as conclusões deste estudo estão disponíveis no artigo [e/ou] nos seus materiais suplementares.	Básico, partilhar a pedido	
Dados gerados numa instalação central de grande escala, disponíveis mediante pedido	Os dados em bruto foram gerados em [nome da instalação]. Os dados derivados que suportam as conclusões deste estudo estão disponíveis junto do autor correspondente [iniciais], mediante pedido.	Básico, partilhar a pedido	
Embargo dos dados devido a restrições comerciais	Os dados que suportam os resultados estarão disponíveis em [nome do repositório] em [URL / ligação DOI] após um embargo de [6 meses] a partir da data de publicação para permitir a comercialização dos resultados da investigação.	Básico, Partilhar a pedido	
Dados disponíveis a pedido devido a restrições de privacidade/éticas	Os dados que sustentam as conclusões deste estudo estão disponíveis mediante pedido ao autor correspondente, [iniciais]. Os dados não estão disponíveis ao público devido a [restrições, por exemplo, o facto de conterem informações que podem comprometer a privacidade dos participantes na investigação].	Básico, Partilhar a pedido	
Dados sujeitos a restrições de terceiros	Os dados que suportam as conclusões deste estudo estão disponíveis [junto de] [terceiros]. Aplicam-se restrições à disponibilidade destes dados, que foram utilizados sob licença para este estudo. Os dados estão disponíveis [através dos autores / no URL] com a permissão de [terceiros].	Básico, Partilhar a pedido	

Declaração de Disponibilidade de Dados

Código | IMP-EM-EI-150

Disponibilidade de dados	Modelo de declaração de disponibilidade de dados	Política de partilha	Assinale com "x"
Dados disponíveis a pedido dos autores	Os dados que suportam as conclusões deste estudo estão disponíveis junto do autor correspondente, [iniciais do autor], mediante pedido razoável.	Básico, Partilhar a pedido	
Partilha de dados não aplicável - não foram gerados novos dados	A partilha de dados não é aplicável a este artigo, uma vez que não foram criados ou analisados novos dados neste estudo.	-	X
Dados não digitais disponíveis	Os dados não digitais que suportam este estudo são conservados em [adicionar local].	Básicos	
Dados não disponíveis devido a restrições [éticas/legais/comerciais]	Devido à natureza da investigação, os dados de apoio [éticos/legais/comerciais] não estão disponíveis.	-	
Dados não disponíveis - consentimento do participante	Os participantes neste estudo não deram consentimento escrito para que os seus dados fossem partilhados publicamente, pelo que, devido à natureza sensível da investigação, os dados de apoio não estão disponíveis.	-	

O Orientando: Fabian Bernard Séraphin Sena Data: 29/06/2026

O Orientador: Alexandra Maia e Silva Data: 29/06/2026

O Coorientador (se aplicável): Ana Clara Ribeiro Data: 29 /06/2026

Resumo

O adenocarcinoma ductal pancreático é uma patologia de extrema agressividade, cujo prognóstico é fortemente comprometido por um diagnóstico muitas das vezes demasiado tardio. Com uma taxa de sobrevivência aos cinco anos de apenas 13%, o principal desafio reside na deteção precoce, capaz de aumentar esta sobrevivência para mais de 80% no estágio I. Este trabalho explora os avanços da biópsia líquida como uma ferramenta poderosa para colmatar as limitações da imagiologia e do marcador convencional CA19-9.

O estudo analisa a emergência do conceito de « circuloma », privilegiando uma abordagem integrada e multianalítica. Entre os biomarcadores mais promissores, os perfis de metilação do DNA (nomeadamente dos genes *BNC1* e *ADAMTS1*) apresentam uma sensibilidade e especificidade superiores a 90% nos estádios precoces. A análise das vesículas extracelulares (proteína GPC1) e a identificação de assinaturas moleculares baseadas em rácios de expressão de microRNA (nomeadamente o rácio miR-95-3p/miR-26b-5p) abrem perspetivas concretas para o diagnóstico diferencial. Além disso, a inovação representada pelo score proteómico urinário PancRISK permite sinalizar a presença tumoral até um ano antes do diagnóstico clínico, de forma totalmente não invasiva.

A integração destes dados através da inteligência artificial e da aprendizagem automática (*machine learning*), como no projeto PANLIPSY, é fundamental para estabelecer scores de risco personalizados. Por fim, este trabalho destaca o papel estratégico do farmacêutico: a sua competência em biologia molecular e a sua proximidade com o doente permitem-lhe identificar sinais de alerta, como a diabetes de início recente após os 50 anos, e orientar eficazmente as populações de alto risco para um rastreio direcionado.

Em conclusão, a revolução da biópsia líquida permite perspetivar a transformação do cancro do pâncreas numa doença detetável numa fase potencialmente reversível.

Palavras-chave: Biópsia líquida; Adenocarcinoma ductal pancreático; Deteção precoce; Circuloma; Biomarcadores

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma is an extremely aggressive disease whose prognosis is severely compromised by a diagnosis that is often made too late. With a five-year survival rate of only 13%, the main challenge lies in early detection, which has the potential to increase survival to more than 80% when the disease is diagnosed at stage I. This work explores advances in liquid biopsy as a powerful tool to overcome the limitations of imaging techniques and the conventional biomarker CA19-9.

The study examines the emergence of the "circulome" concept, promoting an integrated and multi-analyte approach. Among the most promising biomarkers, DNA methylation profiles, particularly those involving the *BNC1* and *ADAMTS1* genes, demonstrate sensitivity and specificity exceeding 90% in early-stage disease. The analysis of extracellular vesicles (GPC1 protein) and the identification of molecular signatures based on microRNA expression ratios, notably the miR-95-3p/miR-26b-5p ratio, provide promising opportunities for differential diagnosis. Furthermore, the innovation represented by the urinary proteomic score PancRISK enables the detection of tumour presence up to one year before clinical diagnosis in a completely non-invasive manner.

The integration of these data through artificial intelligence and machine learning, as illustrated by the PANLIPSY project, is essential for establishing personalised risk scores. Finally, this work highlights the strategic role of the pharmacist: expertise in molecular biology combined with close patient interaction enables pharmacists to identify warning signs, such as new-onset diabetes after the age of 50, and effectively direct high-risk populations towards targeted screening programmes.

In conclusion, the liquid biopsy revolution offers the prospect of transforming pancreatic cancer into a disease that can be detected at a potentially curable stage.

Keywords: Liquid biopsy; Pancreatic ductal adenocarcinoma; Early detection; Circulome; Biomarkers

Résumé

L'adénocarcinome canalaire pancréatique est une pathologie d'une extrême agressivité, dont le pronostic est fortement compromis par un diagnostic bien souvent trop tardif. Avec un taux de survie à cinq ans de seulement 13%, le principal défi réside dans la détection précoce, capable d'augmenter cette survie à plus de 80% au stade I. Ce travail explore les avancées de la biopsie liquide comme un outil puissant permettant de pallier les limites de l'imagerie et du marqueur conventionnel CA19-9.

L'étude analyse l'émergence du concept de « circulome », privilégiant une approche intégrée et multianalytique. Parmi les biomarqueurs les plus prometteurs, les profils de méthylation de l'ADN (notamment ceux des gènes *BNC1* et *ADAMTS1*) présentent une sensibilité et une spécificité supérieures à 90% aux stades précoces. L'analyse des vésicules extracellulaires (protéine GPC1) et l'identification de signatures moléculaires fondées sur des ratios d'expression de microARN (notamment le ratio miR-95-3p/miR-26b-5p) ouvrent des perspectives concrètes pour le diagnostic différentiel. En outre, l'innovation représentée par le score protéomique urinaire PancRISK permet de signaler la présence d'une tumeur jusqu'à un an avant le diagnostic clinique, de manière totalement non invasive.

L'intégration de ces données par l'intelligence artificielle et l'apprentissage automatique (*machine learning*), comme dans le projet PANLIPSY, est essentielle pour établir des scores de risque personnalisés. Enfin, ce travail met en évidence le rôle stratégique du pharmacien : ses compétences en biologie moléculaire et sa proximité avec le patient lui permettent d'identifier des signes d'alerte, tels qu'un diabète d'apparition récente après l'âge de 50 ans, et d'orienter efficacement les populations à haut risque vers un dépistage ciblé.

En conclusion, la révolution de la biopsie liquide permet d'envisager la transformation du cancer du pancréas en une maladie détectable à un stade potentiellement curable.

Mots clefs : Biopsie liquide; Adénocarcinome ductal pancréatique; Détection précoce; Circulome; Biomarqueurs

Índice	
<i>Introdução</i>	17
Contexto epidemiológico	17
Problemática	19
Objetivo da tese	21
Metodologia	22
1 <i>Cancro do pâncreas e os desafios do diagnóstico atual</i>	23
1.1 <i>Generalidades e fisiopatologia</i>	23
1.1.1 Definição e enquadramento anatómico	23
1.1.2 Sequência de carcinogénese e lesões precursoras	24
1.1.3 Panorama genético e molecular	24
1.1.4 O microambiente tumoral	25
1.2 <i>Limitações do diagnóstico convencional</i>	25
1.2.1 As limitações da imagiologia médica	26
1.2.2 Limitações biológicas: o fracasso do CA19-9 no rastreio	26
1.2.3 Constrangimentos e riscos da biópsia tecidular	27
1.2.4 O carácter « silencioso » da doença e o atraso no diagnóstico	27
1.3 <i>Necessidade de uma mudança de paradigma</i>	28
2 <i>A biópsia líquida como ferramenta disruptiva</i>	31
2.1 <i>Conceitos e metodologia</i>	31
2.1.1 Definição da biópsia líquida e vantagens	31
2.1.2 Natureza das amostras: utilização predominante do sangue e de fluidos alternativos	32
2.2 <i>Desafios técnicos e pré-analíticos</i>	34

2.2.1	Instabilidade biológica e baixa concentração dos biomarcadores circulantes.....	34
2.2.2	Condicionantes pré-analíticas e padronização das amostras	37
2.2.3	Variabilidade interindividual e limitações interpretativas.....	39
3	Análise crítica dos novos biomarcadores circulantes.....	43
3.1	DNA tumoral circulante e perfis de metilação	43
3.1.1	Origem biológica e definição.....	43
3.1.2	Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral.....	43
3.1.3	Interesse específico no cancro do pâncreas e na deteção precoce	43
3.1.4	Métodos de análise disponíveis.....	44
3.1.5	Interpretação clínica dos resultados	45
3.1.6	Limitações atuais, constrangimentos técnicos, biológicos e clínicos	45
3.2	Vesículas extracelulares e exossomas	47
3.2.1	Origem biológica e definição.....	47
3.2.2	Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral.....	47
3.2.3	Interesse específico no cancro do pâncreas e na deteção precoce	48
3.2.4	Métodos de análise disponíveis.....	48
3.2.5	Interpretação clínica dos resultados	49
3.2.6	Limitações atuais, constrangimentos técnicos, biológicos e clínicos	50
3.3	MicroRNA e outros RNA não codificantes	51
3.3.1	Origem biológica e definição.....	51
3.3.2	Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral.....	52
3.3.3	Interesse específico no cancro do pâncreas e na deteção precoce	52
3.3.4	Métodos de análise disponíveis.....	53
3.3.5	Interpretação clínica dos resultados	54

3.3.6	Limitações atuais, constrangimentos técnicos, biológicos e clínicos	55
3.4	Biomarcadores proteicos e proteômica circulante	56
3.4.1	Origem biológica e definição	56
3.4.2	Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral	57
3.4.3	Interesse específico no cancro do pâncreas e limitações do CA19-9	58
3.4.4	Métodos de análise disponíveis	58
3.4.5	Interpretação clínica dos resultados	59
3.4.6	Limitações atuais e constrangimentos clínicos	60
3.5	Células tumorais circulantes	61
3.5.1	Origem biológica e definição	61
3.5.2	Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral	61
3.5.3	Interesse específico no cancro do pâncreas e na deteção precoce	62
3.5.4	Métodos de análise disponíveis	62
3.5.5	Interpretação clínica dos resultados	64
3.5.6	Limitações atuais e constrangimentos clínicos	65
3.6	Plaquetas educadas pelo tumor	65
3.6.1	Origem biológica e definição	65
3.6.2	Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral	66
3.6.3	Interesse específico no cancro do pâncreas e na deteção precoce	66
3.6.4	Métodos de análise disponíveis	67
3.6.5	Interpretação clínica dos resultados	67
3.6.6	Limitações atuais, constrangimentos técnicos, biológicos e clínicos	68
3.7	Inteligência Artificial e abordagens « Omics » : rumo a uma integração multidimensional dos biomarcadores	68

3.7.1	Da informação biológica isolada à assinatura integrada	69
3.7.2	As abordagens « Omics » aplicadas à biópsia líquida	69
3.7.3	Contributo do <i>Machine Learning</i> na seleção de biomarcadores.....	70
3.7.4	IA explicável e interpretação dos modelos	70
3.7.5	Limitações metodológicas e clínicas das abordagens IA/Omics	71
4	<i>Integração clínica dos biomarcadores e papel do farmacêutico</i>	73
4.1	Da investigação translacional à validação clínica	73
4.1.1	Do biomarcador experimental ao teste clínico.....	73
4.1.2	Validação em populações de risco	73
4.1.3	Limitações atuais da translação clínica	74
4.2	Padronização, qualidade e enquadramento regulamentar dos testes de biópsia líquida.....	75
4.2.1	Padronização pré-analítica	75
4.2.2	Padronização analítica e interpretação dos resultados	76
4.2.3	Qualidade, sociedades científicas e enquadramento regulamentar	76
4.3	O papel do farmacêutico na integração clínica da biópsia líquida	77
4.3.1	O farmacêutico e a interpretação dos testes diagnósticos inovadores	77
4.3.2	Identificação, prevenção e orientação dos doentes em risco	77
5	<i>Conclusão</i>	79
6	<i>Bibliografia</i>	81

Índice de Figuras

<i>Figura 1 Anatomia do pâncreas e organização do sistema ductal pancreático. Adaptado de Servier Medical Art, sob licença CC BY 4.0.</i>	<i>23</i>
--	-----------

Índice de Tabelas

Tabela 1 Principais biomarcadores da biópsia líquida investigados para a deteção precoce do adenocarcinoma ductal pancreático: métodos de análise, vantagens, limitações e aplicações clínicas	72
--	----

Lista de Abreviaturas

3' UTR - Região 3' não traduzida (do inglês 3' untranslated region)

AUC - Área sob a curva (do inglês Area Under the Curve)

CA19-9 - Antígeno carboidrato 19-9 (do inglês Carbohydrate Antigen 19-9)

CAF - Fibroblastos associados ao cancro (do inglês Cancer Associated Fibroblasts)

CEC - Células epiteliais circulantes (do inglês Circulating Epithelial Cells)

cfDNA - DNA livre circulante (do inglês cell-free Deoxyribonucleic Acid)

cfRNA - RNA livre circulante (do inglês cell-free Ribonucleic Acid)

CHIP - Hematopoiese clonal de potencial indeterminado (do inglês Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential)

circRNA - RNA circular (do inglês circular Ribonucleic Acid)

CTC - Células tumorais circulantes (do inglês Circulating Tumor Cells)

ctDNA - DNA tumoral circulante (do inglês circulating tumor Deoxyribonucleic Acid)

ddPCR - Reação em cadeia da polimerase digital em gotículas (do inglês droplet digital Polymerase Chain Reaction)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)

ECLIA - Imunoensaio por eletroquimioluminescência (do inglês Electrochemiluminescence Immunoassay)

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês Ethylenediaminetetraacetic Acid)

ELBS - Sociedade Europeia de Biópsia Líquida

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EMT - Transição epitélio-mesenquimal

EpCAM - Molécula de adesão celular epitelial (do inglês Epithelial Cell Adhesion Molecule)

EQA - Avaliação externa da qualidade

EUS - Ecoendoscopia (do inglês Endoscopic Ultrasound)

EUS-FNA - Punção aspirativa por agulha fina guiada por ecoendoscopia (do inglês Endoscopic Ultrasound-guided Fine-Needle Aspiration)

FDA - Agência dos Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (do inglês Food and Drug Administration)

GPC1 - Glypican-1

GPC1(+) - Glypican 1 positivos

IA - Inteligência artificial

IC50 - Concentração inibitória média

ICP-MS - Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

IL-6 - Interleucina-6

IPMN - Neoplasia mucinosa papilar intraductal

ISLB - Sociedade Internacional de Biópsia Líquida

IVDR - Regulamento relativo aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* (do inglês In Vitro Diagnostic Regulation)

lncRNA - RNA não codificante longo

LoB - Limite do branco

LoD - Limite de deteção

LoQ - Limite de quantificação

LRG1 - Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein 1

MALDI-TOF - Dessorção/ionização a laser assistida por matriz - tempo de voo
(do inglês Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight)

MALDI-TOF MS - Espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz - tempo de voo (do inglês Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry)

miRNA - MicroRNA

ML - Aprendizagem automática (do inglês Machine Learning)

MRD - Doença residual mínima (do inglês Minimal Residual Disease)

mRNA - RNA mensageiro

ncRNA - RNA não codificante

NGS - Sequenciação de nova geração

NOD - Diabetes de início recente (do inglês New-Onset Diabetes)

OS - Sobrevida global (do inglês Overall Survival)

PanIN - Neoplasia intraepitelial pancreática

PanIN-1 - Neoplasia intraepitelial pancreática de grau 1

PanIN-2 - Neoplasia intraepitelial pancreática de grau 2

PanIN-3 - Neoplasia intraepitelial pancreática de grau 3

PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)

PDAC - Adenocarcinoma ductal pancreático

PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas (do inglês Platelet-Derived Growth Factor)

PFS - Sobrevida livre de progressão (do inglês Progression-Free Survival)

QALY - Ano de vida ajustado pela qualidade (do inglês Quality-Aadjusted Life Year)

RM - Ressonância magnética

RNA - Ácido ribonucleico (do inglês Ribonucleic Acid)

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa (do inglês Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction)

SEC - Cromatografia por exclusão de tamanho (do inglês Size Exclusion Chromatography)

SERS - Espectroscopia Raman intensificada por superfície (do inglês Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)

SHAP - Explicações aditivas de Shapley (do inglês Shapley Additive explanations)

sncRNA - Pequeno RNA não codificante (do inglês Small non-coding RNA)

SOP - Procedimento operacional padrão (do inglês Standard Operating Procedure)

SPR - Ressonância plasmónica de superfície (do inglês Surface Plasmon Resonance)

TC - Tomografia computadorizada

TEP - Plaquetas educadas pelo tumor

TGF- β - Fator de crescimento transformante beta (do inglês Transforming Growth Factor beta)

TIMP1 - Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1

TIRFM - Microscopia de fluorescência por reflexão interna total

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TNM - Tumor, nódulo, metástase (do inglês Tumor, Node, Metastasis)

UMI - Identificadores moleculares únicos (do inglês Unique Molecular Identifiers)

VE - Vesículas extracelulares

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês Vascular Endothelial Growth Factor)

XAI - Inteligência artificial explicável (do inglês Explainable Artificial Intelligence)

Introdução

Contexto epidemiológico

Contexto epidemiológico e gravidade da doença

O cancro do pâncreas representa um dos maiores desafios da oncologia contemporânea, distinguindo-se por uma agressividade extrema e por um prognóstico particularmente desfavorável (1,2). A nível mundial, classifica-se atualmente como a sétima principal causa de morte por cancro, apesar de ocupar apenas o décimo lugar em termos de incidência (2). Esta disparidade evidencia a letalidade excecional deste tipo de cancro, com uma taxa de sobrevivência a cinco anos que atinge apenas cerca de 13% dos casos nos Estados Unidos. A gravidade é reforçada pelo facto de aproximadamente 50% dos doentes apresentarem, desde o início, doença metastática, enquanto apenas 15 a 20% dos casos são considerados ressecáveis cirurgicamente no momento do diagnóstico(3). Nos Estados Unidos, já constitui a terceira principal causa de mortalidade por cancro, e as projeções sugerem que se tornará a segunda causa de morte por cancro nos países ocidentais até 2030 (4,5).

A incidência da doença encontra-se em aumento constante, com um crescimento médio anual estimado em cerca de 1,1% a nível global (2). Em França, o número de casos aumentou de 7 500 em 2009 para mais de 14 000 em 2018 (6). Embora a idade constitua o principal fator de risco, com um pico de incidência entre os 65 e os 75 anos, dados recentes indicam um aumento preocupante dos diagnósticos em indivíduos mais jovens, particularmente entre as mulheres (5,7).

Características anatomopatológicas

Do ponto de vista anatómico, o pâncreas é um órgão retroperitoneal com cerca de 15 cm de comprimento, cuja localização profunda dificulta consideravelmente o diagnóstico precoce (2). Mais de 90% dos tumores pancreáticos correspondem a adenocarcinomas ductais pancreáticos (PDAC), originários do epitélio dos ductos pancreáticos. Outras formas exócrinas, como os carcinomas acinares ou adenosquamosos, são significativamente mais raras (2,7).

O desenvolvimento do PDAC segue geralmente a sequência do processo *multistep* assim, a iniciação e promoção faz-se a partir de lesões precursoras não invasivas, principalmente as neoplasias intraepiteliais pancreáticas (PanIN), mas também as neoplasias mucinosas papilares intraductais (IPMN) e os neoplasias quísticas mucinosas (2,5,7). A progressão das lesões de baixo grau (PanIN-1/2) para alto grau (PanIN-3) e posteriormente para cancro invasivo constitui, teoricamente, uma janela de intervenção, embora as PanIN não sejam detetáveis pelas técnicas de imagiologia atualmente disponíveis (2,5).

O desafio do diagnóstico precoce

O principal problema clínico do cancro do pâncreas reside no seu carácter assintomático nas fases iniciais (1,6). Os sintomas sugestivos, como icterícia, dor abdominal, perda de peso ou diabetes de início recente, surgem geralmente apenas quando o tumor já se encontra numa fase avançada de progressão (1,7). Consequentemente, mais de 80% dos doentes são diagnosticados em estádios avançados (estádio III ou IV), nos quais o tumor já invadiu os vasos peripancreáticos ou originou metástases, tornando impossível uma ressecção cirúrgica curativa (5,6,8).

A importância do rastreio precoce é, portanto, crucial: enquanto a taxa de sobrevivência a cinco anos diminui para cerca de 3% nos estádios metastáticos (estádio IV), aumenta para 83,7% nos doentes diagnosticados no estágio I/IIA, nos quais a cirurgia completa é ainda possível (1,3,5). Atualmente, não existe nenhum programa de rastreio eficaz para a população geral, e o único biomarcador utilizado rotineiramente, o *Carbohydrate Antigen 19-9* (CA19-9), apresenta sensibilidade e especificidade insuficientes para um diagnóstico precoce fiável (1,6).

Fatores de risco e predisposições

A identificação de populações de risco é fundamental para melhorar a eficácia das estratégias de vigilância e favorecer um diagnóstico mais precoce. Os fatores de risco podem ser classificados em duas categorias, de acordo com o seu carácter modificável ou não modificável.

Os fatores não modificáveis incluem, entre outros, a idade, o grupo sanguíneo (com risco aumentado para indivíduos não pertencentes ao grupo 0) e

disparidades geográficas marcantes (9). Embora os dados norte-americanos sublinhem uma vulnerabilidade acrescida nas populações afro-americanas, o contexto europeu destaca-se por apresentar as taxas de incidência padronizadas por idade mais elevadas a nível mundial, atingindo 9,8 por 100 000 na Europa Ocidental (5). Os fatores genéticos desempenham igualmente um papel relevante, estando implicados em cerca de 5 a 10% dos casos (5,9). Foram identificadas várias mutações germinativas, nomeadamente nos genes *BRCA2*, *BRCA1*, *PALB2*, *ATM*, *STK11* e *CDKN2A*, o que evidencia a importância das predisposições genéticas (5,7,9).

Os fatores modificáveis incluem diferentes elementos relacionados com o estilo de vida e determinadas condições patológicas. O tabagismo constitui um dos principais fatores de risco, estando associado a um duplicar do risco de desenvolver cancro do pâncreas (5). A obesidade e a diabetes mellitus tipo 2, em particular a diabetes de início recente, também designada NOD (new-onset diabetes), são igualmente considerados fatores de risco importantes. A pancreatite crónica e o consumo excessivo de álcool contribuem também para o aumento do risco de desenvolvimento da doença. Por fim, desequilíbrios do microbiota oral e intestinal têm sido associados a fatores predisponentes relevantes (2,5,7).

Em conclusão, a compreensão aprofundada da epidemiologia e da patogénese do PDAC evidencia a urgência de desenvolver novas estratégias de deteção precoce, como a biópsia líquida e a utilização da inteligência artificial (IA), com o objetivo de melhorar o prognóstico desta doença devastadora (2,4,10).

Problemática

As limitações das ferramentas diagnóstico atual: uma necessidade de inovação

Apesar da gravidade do PDAC, as ferramentas clínicas atualmente disponíveis revelam-se insuficientes para garantir uma deteção precoce eficaz. A imagiologia médica (TC, RM e ecoendoscopia), embora essencial para a estadiamento da doença, apresenta dificuldades na identificação de lesões pré-invasivas de pequena dimensão, como as PanIN (5). Além disso, a biópsia tecidular convencional, considerada o exame de referência, apresenta riscos não

negligenciáveis de complicações, como pancreatite aguda, hemorragias ou perfurações duodenais (1,6).

Do ponto de vista biológico, o único biomarcador utilizado na prática clínica corrente, o CA19-9, apresenta limitações importantes. A sua sensibilidade (80%) e especificidade (75%) são consideradas subótimas para o rastreio, sobretudo porque os seus níveis podem encontrar-se falsamente elevados em patologias benignas, como a cirrose ou a pancreatite (1,6). Mais crítico ainda, cerca de 5 a 10% da população não possui o antígeno de Lewis necessário à sua expressão, tornando este biomarcador ineficaz nestes doentes (1).

O interesse da biópsia líquida: rumo a um novo paradigma

Neste contexto, a biópsia líquida surge como uma tecnologia inovadora particularmente promissora. Esta abordagem permite detetar componentes derivados do tumor em biofluidos, principalmente no sangue, de forma minimamente invasiva (1,4,6). Interesse desta estratégia baseia-se em vários fatores-chave :

Maior acessibilidade: Ao contrário da biópsia tecidular, a biópsia líquida pode ser realizada de forma mais fácil, não invasiva e com menos custo ao longo do protocolo clínico, permitindo um acompanhamento em tempo real da progressão tumoral e da eficácia terapêutica (1,4).

Caracterização da heterogeneidade tumoral : Os biomarcadores circulantes refletem o conjunto dos clones tumorais, incluindo micrometástases frequentemente não detetáveis pela imagiologia convencional (4,6,11).

Multiplicidade de alvos: A análise simultânea de DNA tumoral circulante (ctDNA), células tumorais circulantes (CTC), exossomas e proteínas proporciona uma visão multi-ómica precisa do perfil biológico do cancro (1,6,11).

A emergência da epigenética e das assinaturas moleculares

Um dos eixos mais inovadores deste trabalho diz respeito à epigenética, e a uma marca epigenética específica a metilação do DNA. As alterações de metilação ocorrem muito precocemente na carcinogénese pancreática, muito antes do aparecimento dos sintomas clínicos (11). A identificação de marcadores específicos, como a metilação dos genes *BNC1* e *ADAMTS1*, demonstrou taxas

de sensibilidade e especificidade superiores a 90% nos estádios precoces (Estádio I/II) (11). A combinação destas assinaturas epigenéticas com marcadores proteicos clássicos poderá transformar radicalmente o prognóstico dos doentes, permitindo aumentar a taxa de sobrevivência a cinco anos de cerca de 3% para mais de 80%, quando a ressecção cirúrgica é realizada numa fase precoce da doença (5).

Objetivo da tese

O principal interesse deste trabalho consiste em analisar de forma estruturada os avanços recentes relativos aos biomarcadores precoces e às abordagens baseadas em biópsia líquida, com o objetivo de avaliar a sua relevância e potencial de aplicação na prática clínica. A integração destas ferramentas provenientes da biologia molecular no percurso de cuidados poderá contribuir para melhorar a capacidade de deteção em fases precoces da doença. No contexto de uma patologia caracterizada por uma mortalidade particularmente elevada, o desenvolvimento de novas tecnologias de diagnóstico constitui um desafio fundamental para otimizar a abordagem terapêutica dos doentes.

O objetivo central desta investigação consiste em identificar, com base nos dados científicos mais recentes, os biomarcadores circulantes detetáveis por biópsia líquida que apresentam o maior potencial para a deteção precoce do adenocarcinoma ductal pancreático. Uma análise metodológica da literatura científica permitirá avaliar o potencial diagnóstico de diferentes categorias de marcadores moleculares e celulares, nomeadamente o ctDNA, as vesículas extracelulares (VE), como os exossomas, bem como as células tumorais circulantes.

A identificação destes biomarcadores visa determinar a sua capacidade de integração em futuras estratégias de rastreio, baseadas em abordagens pouco invasivas e aplicáveis na prática clínica. Ao evidenciar o interesse destas ferramentas de diagnóstico de precisão, este trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de vigilância, capazes de ultrapassar as limitações atuais do diagnóstico, com o objetivo de favorecer uma deteção mais precoce e melhorar o prognóstico dos doentes afetados por esta patologia.

Metodologia

Este estudo baseia-se numa investigação secundária realizada sob a forma de uma revisão narrativa da literatura. Foi feita uma pesquisa documental sistemática nas bases de dados PubMed, ScienceDirect e Google Scholar, com o objectivo de identificar trabalhos recentes (publicados nos últimos dez anos) sobre biomarcadores precoces e biópsia líquida no cancro do pâncreas.

Foram incluídos artigos científicos publicados nos últimos 10 anos, de forma a assegurar a utilização da evidência científica mais atual. Foram excluídos artigos publicados antes de 2016, salvo quando correspondiam a referências consideradas fundamentais para a compreensão do tema ou descreviam conceitos, metodologias ou descobertas essenciais que permanecem atuais e amplamente reconhecidas na literatura científica.

As palavras-chave utilizadas na pesquisa bibliográfica incluíram, nomeadamente: “pancreatic cancer”, “early biomarkers”, “liquid biopsy”, “circulating tumor DNA (ctDNA)”, “exosomes”, “microRNA (miRNA)”, “proteomics”, “early detection” e “screening”, isoladamente ou combinadas através dos operadores booleanos AND e OR.

Os artigos seleccionados foram analisados de forma crítica e comparativa, de modo a identificar os principais avanços científicos, as limitações metodológicas das abordagens actuais, bem como as perspectivas de melhoria no rastreio precoce do cancro pancreático.

1 Cancro do pâncreas e os desafios do diagnóstico atual

1.1 Generalidades e fisiopatologia

1.1.1 Definição e enquadramento anatómico

O pâncreas é um órgão retroperitoneal com cerca de 15 cm de comprimento, localizado profundamente no abdómen superior, entre o estômago e a coluna vertebral (2). Do ponto de vista anatómico, é composto por cabeça (incluindo o processo uncinado), colo, corpo e cauda. Como se pode observar na *Figura 1* (12).

Em termos funcionais, o parênquima pancreático encontra-se dividido em dois compartimentos: o pâncreas exócrino, constituído por células acinares (responsáveis pela secreção de enzimas digestivas) e por células ductais (responsáveis pela secreção de bicarbonato), e o pâncreas endócrino, organizado em ilhas de Langerhans, que secretam hormonas, como a insulina (2,7).

O PDAC é um tumor maligno originado nas células epiteliais que revestem os ductos pancreáticos (2). Representa a forma mais frequente de cancro do pâncreas, correspondendo a mais de 90% dos casos (2,5,6). As restantes formas exócrinas (carcinomas acinares, adenoescamosos ou de células gigantes) são significativamente mais raras (2,7). Aproximadamente 75% dos PDAC desenvolvem-se na cabeça do pâncreas, enquanto 17 a 26% se localizam no corpo ou na cauda do órgão (7).

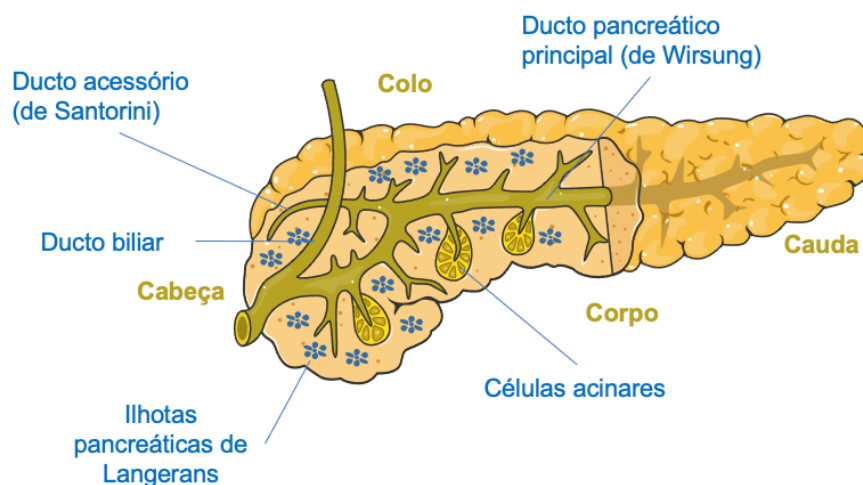


Figura 1 Anatomia do pâncreas e organização do sistema ductal pancreático. Adaptado de Servier Medical Art, sob licença CC BY 4.0.

1.1.2 Sequência de carcinogénese e lesões precursoras

O desenvolvimento do PDAC não constitui um evento súbito, mas sim o resultado de uma progressão lenta e gradual a partir de lesões precursoras não invasivas (5). Distinguem-se três principais tipos de lesões precursoras. Em primeiro lugar, as PanIN representam as lesões mais frequentes (7). Estas lesões são microscópicas inferiores a 5 mm e desenvolvem-se nos pequenos ductos pancreáticos (2,7). A sequência PanIN evolui segundo três graus de severidade crescente: PanIN-1 (baixo grau), PanIN-2 (grau intermédio) e PanIN-3 (alto grau ou carcinoma in situ), conduzindo, em última instância, ao carcinoma invasivo (2). Em segundo lugar, as IPMN correspondem a lesões macroscópicas que se desenvolvem no ducto pancreático principal ou nas suas ramificações. Embora sejam relativamente frequentes (detetados em cerca de 20% dos doentes por imagiologia), apenas uma proporção limitada evolui para uma forma invasiva.

Por fim, os quistos mucinosos são mais raros e são predominantemente observados em mulheres (5). Esta fase de transição entre lesões de baixo grau e cancro invasivo é estimada em mais de 10 anos, oferecendo teoricamente uma janela de oportunidade para o rastreio precoce. No entanto, as lesões PanIN permanecem indetetáveis através das técnicas de imagiologia convencional atualmente disponíveis (5).

1.1.3 Panorama genético e molecular

A fisiopatologia do PDAC caracteriza-se pela acumulação progressiva de mutações somáticas, associadas a alterações epigenéticas, conduzindo à seleção clonal de populações celulares com potencial tumoral crescente (5). Este processo evolutivo baseia-se, nomeadamente, na alteração recorrente de quatro genes condutores (*driver genes*), envolvidos no controlo da proliferação celular, na estabilidade genómica e na regulação dos mecanismos de apoptose.

Paralelamente, ocorrem alterações epigenéticas significativas, nomeadamente a hipermetilação das ilhas CpG nas regiões promotoras de genes supressores tumorais (como *p16* ou *BRCA1*), levando ao seu silenciamento sem alteração da sequência de DNA (10). Estas alterações epigenéticas são dinâmicas e podem

ser detetadas precocemente em biofluidos (10). As marcas epigenéticas nas biopsias líquidas são particularmente importantes pois permitem identificar a origem do DNA em análise, adicionalmente neste caso são importantes como caracterização do epigenoma do tumor.

Para além dos genes condutores clássicos, têm emergido novos alvos moleculares, como a expressão da proteína de junção apertada Claudin 18.2 (ausente no pâncreas saudável) ou a sobreexpressão de HER2, identificada em cerca de 40% dos casos (3).

1.1.4 O microambiente tumoral

Uma característica fundamental do PDAC é a presença de um estroma desmoplásico intenso, que pode representar até 80% da massa tumoral (7). Este microambiente tumoral é composto por matriz extracelular, células inflamatórias e, sobretudo, por fibroblastos associados ao cancro (CAF) (7,10).

Este estroma desempenha um papel ativo na progressão tumoral através de vários mecanismos :

- Evasão imunitária : o microambiente tumoral cria uma barreira física e bioquímica, limitando a infiltração de linfócitos T citotóxicos e favorecendo um ambiente imunossupressor (8).
- Resistência às terapêuticas : a elevada pressão intersticial gerada pela desmoplasia comprime os vasos sanguíneos, dificultando a distribuição eficaz dos agentes quimioterapêuticos no interior do tumor (2,4).
- Interações metabólicas : os adipócitos e os CAF fornecem nutrientes, como a glutamina, às células cancerígenas, facilitando a sua sobrevivência num ambiente pobre em nutrientes (13).

Em síntese, o PDAC é uma patologia complexa, na qual a transformação maligna do epitélio é sustentada por um perfil genético robusto e por um microambiente protetor, o que explica a sua elevada agressividade e resistência aos tratamentos convencionais (4,6).

1.2 Limitações do diagnóstico convencional

As técnicas de diagnóstico atuais baseiam-se numa combinação de imagiologia, análises clínica sérica e histopatologia. No entanto, no entanto apresentam

limitações variadas o que pode explicar a razão pela qual o diagnóstico é muitas vezes tardio, o que explica por que razão mais de 80% dos doentes continuam a ser diagnosticados em estádios avançados ou metastáticos da doença (4–6).

1.2.1 As limitações da imagiologia médica

As técnicas de imagiologia, constituem a base da detecção numa fase inicial, porém a sua sensibilidade nos estádios precoces é consideravelmente limitada. A tomografia computadorizada (TC), embora seja o exame de referência para o estadiamento, apresenta capacidade limitada na detecção de tumores em estágio I (1,7). Além disso, entre 5% e 17% dos adenocarcinomas pancreáticos são isoatenuantes, o que os torna praticamente invisíveis na TC convencional (7). A ecoendoscopia (EUS) é considerada a técnica mais sensível, com uma sensibilidade que pode atingir 94%, mas trata-se de um procedimento invasivo, que requer sedação, e cujos resultados dependem fortemente da experiência do operador (1). Relativamente às lesões pré-invasivas, nenhuma técnica de imagiologia atual permite visualizar de forma fiável as PanIN com menos de 5 mm, perdendo assim a janela potencial de remissão completa (5–7).

1.2.2 Limitações biológicas: o fracasso do CA19-9 no rastreio

O CA 19-9 é o único biomarcador utilizado rotineiramente a nível mundial, contudo não cumpre os critérios necessários para um teste de rastreio eficaz (4,7).

Em primeiro lugar, o desempenho diagnóstico do CA19-9 é limitado, apresentando uma sensibilidade de cerca de 80 % e uma especificidade próxima de 75 %, valores considerados subótimos e, por isso, insuficientes para um método de rastreio fiável. De facto, níveis elevados deste marcador podem ser observados em diversas patologias não malignas, nomeadamente cirrose, pancreatite crónica ou colestase, o que reduz a sua capacidade de distinguir especificamente as patologias tumorais pancreáticas (1,6).

Adicionalmente, a interpretação das concentrações de CA19-9 é limitada por variações biológicas interindividuais (1,7).

Num estudo realizado por Kim e colaboradores, foi evidenciada a sua ineficácia. O estudo que incluiu 70 940 indivíduos assintomáticos: entre os 1 063 participantes com níveis elevados de CA19-9, apenas 4 apresentavam

efetivamente PDAC, correspondendo a um valor preditivo positivo de apenas 0,9% (3).

Embora o CA19-9 possa ter utilidade no seguimento da resposta terapêutica, o seu aumento ocorre geralmente em fases já avançadas da doença. Esta característica limita a sua utilidade como ferramenta de rastreio em indivíduos assintomáticos, nos quais uma deteção mais precoce representaria um fator determinante para a melhoria do prognóstico (5,7).

1.2.3 Constrangimentos e riscos da biópsia tecidular

A confirmação histológica por punção aspirativa por agulha fina guiada por ecoendoscopia (EUS-FNA) permanece o gold standard, mas não está isenta de complicações (1).

O recurso a técnicas de colheita de tecido apresenta riscos iatrogénicos não negligenciáveis. Estas intervenções podem estar associadas a diversas complicações, nomeadamente pancreatite aguda, hemorragias ou perfurações duodenais. Em situações raras, foi também descrita disseminação tumoral ao longo do trajeto da agulha, levantando preocupações relativamente à segurança destes métodos invasivos (1,6).

Adicionalmente, a obtenção de uma amostra celular representativa pode revelar-se tecnicamente complexa. A localização anatómica profunda do pâncreas constitui um primeiro obstáculo ao acesso direto à lesão. Além disso, a presença frequente de um microambiente tumoral caracterizado por uma resposta inflamatória significativa e por um estroma fibroso denso, fenómeno designado por desmoplasia, pode limitar a qualidade ou a quantidade do material recolhido. Estas dificuldades podem levar à necessidade de repetir os procedimentos, aumentando o carácter invasivo do processo diagnóstico sem garantir a obtenção de um diagnóstico histológico conclusivo (4,6).

1.2.4 O carácter « silencioso » da doença e o atraso no diagnóstico

A própria fisiopatologia da doença contribui para o insucesso do diagnóstico convencional (14). A identificação precoce do adenocarcinoma ductal pancreático é particularmente difícil devido à ausência de manifestações clínicas específicas nas fases iniciais da doença. De facto, o PDAC evolui frequentemente de forma assintomática nos estádios precoces (1,14). Quando

surgem sintomas, estes são geralmente pouco específicos, como dor abdominal difusa ou perturbações digestivas do tipo dispepsia, frequentemente atribuídas a patologias benignas do trato gastrointestinal. Esta ausência de sintomatologia específica contribui para o atraso na realização de exames diagnósticos adequados, favorecendo a progressão da doença para estádios mais avançados, frequentemente com o aparecimento de metástases hepáticas ou peritoneais (14).

Por outro lado, as estratégias de vigilância atualmente aplicadas a populações de alto risco apresentam também limitações. Apesar de um seguimento imagiológico anual, uma proporção significativa de tumores pancreáticos é diagnosticada entre dois exames considerados normais. Estes tumores, designados cancros de intervalo, caracterizam-se por uma evolução particularmente rápida e agressiva, evidenciando as limitações das estratégias de vigilância atuais na deteção precoce de determinadas formas da doença (5,15).

Em conclusão, a incapacidade dos métodos atuais para detetar lesões precoces de forma não invasiva e fiável evidencia a necessidade urgente de desenvolver novas abordagens de diagnóstico de elevada sensibilidade, com baixo risco para o doente e que seja específicas do tumor em causa, baseadas na biópsia líquida e nos biomarcadores moleculares circulantes (6).

1.3 Necessidade de uma mudança de paradigma

A urgência de uma transformação profunda da estratégia diagnóstica do PDAC é imposta por uma constatação clínica inequívoca: as técnicas atuais falham na deteção da doença numa fase em que esta ainda é potencialmente curável (1,10). Embora a taxa de sobrevivência global a cinco anos permaneça uma das mais baixas em oncologia, inferior a 13%, os dados estatísticos evidenciam um contraste marcante consoante o estágio em que a doença é diagnosticada (1,5,10). Com efeito, enquanto a sobrevivência a cinco anos diminui para apenas 3% nas formas metastáticas, pode atingir 83,7% nos doentes diagnosticados em estágio I ou IA, nos quais a ressecção cirúrgica completa é possível (1,3,5). Atualmente, cerca de 80% dos doentes são diagnosticados em fases avançadas ou metastáticas, privando a maioria de qualquer possibilidade de cura cirúrgica

(1,4,6). Este atraso no diagnóstico está intrinsecamente relacionado com as limitações técnicas e biológicas dos métodos convencionais. A imagiologia médica, apesar dos progressos tecnológicos, apresenta dificuldades na identificação de lesões pré-invasivas microscópicas, como as PanIN, ou de tumores sólidos com menos de 10 mm (5). Acresce ainda que o carácter invasivo e os riscos iatrogénicos associados às biópsias tecidulares convencionais, tais como pancreatite aguda ou hemorragias, limitam a sua utilização repetida para uma vigilância contínua de populações de alto risco (1,6).

A mudança de paradigma assenta na adoção da biópsia líquida como elemento central de uma nova estratégia de deteção precoce. Mais do que uma simples alternativa não invasiva à biópsia tecidular, esta metodologia oferece uma importante mais-valia clínica, ao permitir o isolamento e a caracterização de biomarcadores circulantes diretamente derivados do tumor (4,6). Ao contrário da biópsia tecidular, uma simples colheita sanguínea permite uma análise dinâmica da doença e possibilita a captura da heterogeneidade molecular tumoral, através da deteção de DNA livre circulante (cfDNA), ctDNA, RNA livre circulante (cfRNA), CTC e exossomas (3,4,6). Para além do diagnóstico inicial, a biópsia líquida oferece uma capacidade mais elevada de monitorização temporal em comparação com os métodos convencionais. Estudos demonstram que a deteção de CTC pode sinalizar uma recidiva da doença até dois meses antes de esta ser visível nos exames de imagiologia padrão, permitindo uma adaptação precoce da estratégia terapêutica perante uma progressão tumoral ainda não detetável clinicamente (3). O desenvolvimento de novos biomarcadores, nomeadamente epigenéticos, abre igualmente perspetivas inovadoras: a deteção da hipermetilação de genes como *BNC1* e *ADAMTS1* demonstrou sensibilidade e especificidade superiores a 90% nos estádios precoces, permitindo um rastreio biológico significativamente mais preciso do que o proporcionado pelos marcadores proteicos clássicos (1,10).

Por fim, esta evolução diagnóstico implica a transição de uma abordagem reativa para uma estratégia de vigilância proativa e direcionada. Tendo em conta a baixa incidência do PDAC na população geral, o rastreio populacional em massa não é atualmente recomendado (5,15). O principal desafio reside, portanto, na estratificação e monitorização intensiva das populações de alto risco, incluindo

indivíduos portadores de mutações genéticas com predisposição para cancro (*BRCA1/2*, *CDKN2A*, *ATM*), doentes com diabetes de início recente ou portadores de lesões quísticas pancreáticas (5,15). A integração da inteligência artificial, como proposto pelo estudo francês PANLIPSY, permite combinar assinaturas multi-ómicas circulantes complexas com dados clínicos e imagiológicos, de forma a estabelecer um perfil de risco personalizado (4,6). Paralelamente, a viabilidade deste novo paradigma é reforçada pela melhoria da acessibilidade tecnológica. O custo do sequenciação de nova geração (NGS) diminuiu significativamente, passando de aproximadamente 5 900 dólares em 2012 para 454 dólares em 2021, tornando a implementação de testes multi-biomarcadores cada vez mais viável do ponto de vista económico para os sistemas de saúde. A utilização de painéis de genes direcionados revela-se, aliás, mais custo-efetiva do que a realização sequencial de testes gene a gene, contribuindo simultaneamente para a melhoria da qualidade de vida ajustada aos anos de vida (QALY) através de uma orientação terapêutica mais precisa (3).

A transição para uma medicina de precisão constitui, assim, uma condição essencial para transformar o prognóstico desta patologia devastadora e contribuir para a redução da mortalidade global até 2030 (1,4,6,10).

2 A biópsia líquida como ferramenta disruptiva

2.1 Conceitos e metodologia

O advento da biópsia líquida marcou uma verdadeira revolução de paradigma na oncologia, particularmente no contexto do PDAC, onde o acesso difícil ao órgão e o caráter invasivo dos métodos convencionais de confirmação histológica levantam importantes limitações. Este capítulo apresenta os fundamentos metodológicos desta tecnologia, bem como os principais desafios associados à sua implementação na prática clínica.

2.1.1 Definição da biópsia líquida e vantagens

A biópsia líquida afirmou-se inquestionavelmente como uma contribuição de extrema importância na deteção, diagnóstico, seguimento das doenças oncológicas, abrindo portas para um futuro promissor na deteção precoce, prognóstico e personalização do tratamento, sendo definida como a análise de biomarcadores derivados de tumores, tais como ácidos nucleicos, células, proteínas ou metabolitos, obtidos a partir de fluidos biológicos (16–18). Embora o sangue periférico continue a ser o meio mais amplamente estudado, o conceito engloba atualmente uma vasta gama de fluidos corporais, incluindo urina, saliva, suco pancreático, derrames pleurais, líquido ascítico e líquido cefalorraquidiano (17,19). Esta abordagem permite avaliar a biologia tumoral através de diferentes analitos circulantes, nomeadamente o ctDNA, as CTC, as vesículas extracelulares, como os exossomas, e as plaquetas educadas pelo tumor (TEP) (20–23). Ao contrário da biópsia tecidual, que fornece uma imagem estática da doença num determinado momento, a biópsia líquida permite obter informações genómicas, transcriptómicas e proteómicas em tempo real, refletindo assim a dinâmica evolutiva da patologia oncológica (22,24,25).

O carácter minimamente invasivo da biópsia líquida constitui a sua vantagem mais imediata, assumindo particular relevância no contexto do PDAC (19,22,26). Tradicionalmente, o diagnóstico definitivo do PDAC baseia-se na ecoendoscopia com EUS-FNA, um procedimento invasivo, dispendioso e tecnicamente exigente (19,27). Em contraste, a biópsia líquida requer apenas uma simples colheita de sangue ou de outro fluido biológico, eliminando os riscos de complicações significativas inerentes aos procedimentos cirúrgicos ou endoscópicos, como

hemorragias, infeções ou disseminação iatrogénica de células malignas (17,20). Esta segurança permite considerar o risco de efeitos adversos como praticamente inexistente, facilitando o acesso à caracterização molecular em doentes cujo estado clínico ou localização tumoral inviabilizam a realização de uma biópsia convencional (17,19).

A reprodutibilidade desta modalidade analítica acrescenta uma dimensão temporal essencial à medicina de precisão (17,22,24). A facilidade de execução dos procedimentos de colheita possibilita um acompanhamento seriado ao longo de todo o percurso clínico, permitindo monitorizar de forma contínua a carga tumoral e a resposta terapêutica (17,20,24). Esta capacidade de monitorização dinâmica é fundamental para a deteção precoce da doença residual mínima, para a identificação do aparecimento de clones tumorais resistentes sob pressão terapêutica e para o diagnóstico de recidivas moleculares vários meses antes da manifestação de sinais clínicos ou imagiológicos (17,20). Ao fornecer informações atualizadas sobre o estado da doença, a biópsia líquida permite aos clínicos adaptar rapidamente as estratégias terapêuticas (22,26).

Por fim, a biópsia líquida permite ultrapassar um dos principais desafios da oncologia convencional: a heterogeneidade tumoral (17,18,26). Uma biópsia sólida encontra-se intrinsecamente limitada pelo seu carácter localizado, fornecendo apenas uma amostra restrita que pode não representar adequadamente a diversidade genética da totalidade do tumor primário ou dos diferentes focos metastáticos (17,20,21). Em contrapartida, os componentes tumorais libertados para a circulação provêm de todos os focos tumorais ativos do organismo, proporcionando uma visão global, espacial e temporal do panorama genómico da doença (17,20). Esta representação abrangente da complexidade molecular do cancro é essencial para garantir uma seleção mais adequada das terapêuticas dirigidas e contribuir para a melhoria do prognóstico global dos doentes (16,20).

2.1.2 Natureza das amostras: utilização predominante do sangue e de fluidos alternativos

A exploração da biologia tumoral através da biópsia líquida baseia-se na análise de diversos fluidos biológicos, que funcionam como reservatórios naturais dos

analitos circulantes libertados pelos processos de renovação celular ou de secreção ativa (16,17). Na prática corrente, o plasma é sistematicamente privilegiado em relação ao soro para a análise do ctDNA e do cfRNA, uma vez que reduz a contaminação por DNA genómico proveniente da lise acidental dos leucócitos durante o processo de coagulação (16,23). Esta predominância do compartimento sanguíneo explica-se pela riqueza e representatividade das informações moleculares transportadas pela circulação sistémica, permitindo uma visão global e dinâmica da doença oncológica (19,23).

No entanto, a investigação tem vindo a orientar-se cada vez mais para a utilização de fluidos biológicos alternativos, que apresentam vantagens específicas, quer pelo seu carácter totalmente não invasivo, quer pela sua proximidade anatómica ao órgão-alvo (16,17). A urina, a saliva e as fezes constituem fontes de particular interesse, uma vez que a sua recolha pode ser efetuada de forma simples e repetida, facilitando um acompanhamento longitudinal rigoroso e a implementação de programas de rastreio em larga escala (16,17,19,28). A título de exemplo, a urina permite inúmeras recolhas ao longo do dia, o que representa uma vantagem para avaliar a cinética de libertação dos biomarcadores, embora o ctDNA urinário apresente frequentemente um grau de fragmentação superior ao observado no plasma (17,19). Da mesma forma, a saliva e diversas secreções exócrinas, apesar de apresentarem uma carga molecular por vezes inferior à do sangue, fornecem informações relevantes sobre a localização da lesão e as características específicas do microambiente tumoral local (19).

No contexto específico do PDAC, os chamados fluidos proximais, como o suco pancreático e a biliar, assumem uma importância diagnóstica particularmente relevante (16,19,25). O suco pancreático, recolhido durante procedimentos endoscópicos, contém frequentemente concentrações significativamente mais elevadas de material genético proveniente das células ductais pancreáticas, aumentando assim a sensibilidade para a deteção de mutações fundadoras, como as mutações do gene *KRAS*, mesmo em fases precoces da doença (19). A análise da biliar permite igualmente identificar alterações genéticas e epigenéticas específicas, constituindo um importante complemento diagnóstico na abordagem dos doentes com obstruções biliares (25). Por fim, o arsenal da

biópsia líquida inclui ainda outros fluidos biológicos, como o líquido ascítico, os derrames pleurais e o líquido cefalorraquidiano, particularmente utilizados nos estádios avançados ou metastáticos, onde contribuem para a caracterização da heterogeneidade molecular associada aos diferentes locais de disseminação tumoral secundária (16,17,19).

2.2 Desafios técnicos e pré-analíticos

A implementação da biópsia líquida na prática clínica do PDAC enfrenta importantes limitações biológicas e tecnológicas que condicionam a fiabilidade dos resultados. Ao contrário da biópsia tecidular, na qual o material recolhido é posteriormente fixado, a biópsia líquida baseia-se na análise de analitos altamente lábeis, que circulam num ambiente biológico dinâmico. Consequentemente, o controlo rigoroso da fase pré-analítica constitui um dos principais desafios para transformar esta inovação numa ferramenta de diagnóstico verdadeiramente padronizada.

2.2.1 Instabilidade biológica e baixa concentração dos biomarcadores circulantes

Um dos principais obstáculos à utilização da biópsia líquida no contexto da deteção precoce reside na baixa concentração dos analitos tumorais na circulação sistémica, frequentemente inferior ao limite de deteção das tecnologias atualmente disponíveis, bem como na sua instabilidade intrínseca. No caso do PDAC, esta problemática é agravada por características biológicas específicas do tumor, nomeadamente uma arquitetura estromal densa associada a uma intensa reação desmoplásica, bem como por uma vascularização relativamente reduzida (23). Estas barreiras físicas limitam mecanicamente a libertação para o compartimento sanguíneo de componentes tumorais, como as CTC, o ctDNA e os exossomas, sobretudo nos estádios iniciais da doença (23).

O conceito de libertação tumoral (*shedding*) constitui o fundamento biológico da biópsia líquida, correspondendo ao processo através do qual componentes derivados do tumor são libertados nos fluidos biológicos, como o sangue, a urina ou o suco pancreático (23,25). Este fenómeno permite a deteção de diversos analitos, nomeadamente o ctDNA, as CTC e as vesículas extracelulares, como os exossomas (16,23,24). Os mecanismos responsáveis por esta libertação são

múltiplos e podem ser classificados em processos passivos e processos ativos (18).

A libertação passiva está intrinsecamente associada à dinâmica da morte celular no interior da massa tumoral, ocorrendo principalmente através dos processos de apoptose e necrose (16,23,26). Durante estes fenómenos, as células tumorais fragmentam-se e libertam o seu conteúdo genético e vesicular para o microambiente tumoral e, subsequentemente, para a circulação sistémica (16,18,21). No caso das CTC, a libertação passiva pode igualmente resultar de constrangimentos mecânicos externos, tais como a pressão exercida pelo crescimento do próprio tumor ou manipulações iatrogénicas associadas a procedimentos cirúrgicos (18).

Por outro lado, a libertação ativa corresponde a um processo regulado por células tumorais viáveis com o objetivo de interagir com o seu ambiente envolvente (16,26). As células cancerígenas secretam ativamente exossomas e outras vesículas extracelulares, que transportam material genético (DNA e RNA) e proteínas oncogénicas, desempenhando um papel fundamental na comunicação intercelular e na formação de nichos pré-metastáticos (16,23,29). Relativamente às CTC, a libertação ativa é frequentemente mediada pela transição epitélio-mesenquimatosa (EMT), uma alteração fenotípica que confere às células tumorais maior capacidade migratória e invasiva, permitindo-lhes infiltrar ativamente os vasos sanguíneos e linfáticos (18,19,26).

A quantidade de material tumoral libertado para a circulação encontra-se estreitamente relacionada com a carga tumoral, o estágio da doença e a localização anatómica do tumor (16,21). Esta relação explica porque o ctDNA e as CTC são geralmente detetados em concentrações significativamente mais elevadas nos estádios metastáticos do que nas fases iniciais da doença (16,21). No contexto específico do PDAC, o processo de libertação é dificultado por características biológicas particulares, nomeadamente a presença de um estroma desmoplásico denso e de uma vascularização relativamente reduzida (23). Esta barreira física limita mecanicamente a passagem dos componentes tumorais para o compartimento sanguíneo, constituindo um dos principais desafios à sensibilidade das estratégias de deteção precoce baseadas na biópsia líquida (21,23).

Uma vez libertados para a circulação, estes biomarcadores tumorais estão sujeitos a uma rápida depuração plasmática, o que faz da biópsia líquida uma verdadeira fotografia instantânea da biologia tumoral (19,23,26). A sua semivida biológica extremamente curta, variando entre 15 minutos e 2,5 horas para o ctDNA e entre 1 e 2 horas para as CTC, impõe restrições temporais rigorosas para a captura destes sinais biológicos antes da sua degradação ou eliminação (16,19,23). Além disso, o perfil de libertação tumoral é dinâmico e pode ser influenciado pela resposta ao tratamento, refletindo em tempo real a eficácia terapêutica ou o surgimento de clones resistentes (24,26).

A concentração de ctDNA encontra-se diretamente correlacionada com a carga tumoral global, tornando a sua deteção particularmente difícil quando o tumor apresenta pequenas dimensões ou permanece localizado (21). Estima-se que o ctDNA represente frequentemente apenas uma fração mínima do cfDNA, geralmente compreendida entre 0,01% e 1%, podendo ser inferior a 0,01% nos estádios precoces da doença (16,19,21). Esta diluição maciça do sinal tumoral pelo DNA proveniente de células saudáveis em apoptose exige tecnologias dotadas de uma sensibilidade analítica excecional, de forma a minimizar o risco de resultados falso-negativos (19,21). De igual modo, as CTC caracterizam-se por uma raridade extrema, apresentando frequentemente concentrações inferiores a 10 células por mililitro de sangue total, o que corresponde aproximadamente a uma célula tumoral por cada milhão de leucócitos (16,25).

A esta baixa concentração acrescenta-se uma marcada instabilidade biológica, associada à sua rápida eliminação da circulação. O ctDNA apresenta uma semivida muito curta, estimada entre 15 minutos e 2,5 horas, devido à sua degradação pelas nucleases plasmáticas e à sua eliminação por via urinária (16,19,23). As CTC apresentam uma fragilidade semelhante, com uma sobrevivência circulante que raramente ultrapassa 1 a 2 horas (16,21). Estas células estão sujeitas a múltiplos fatores agressivos, incluindo as forças de cisalhamento hemodinâmico, a ação do sistema imunitário e o fenómeno de anoiquia (anoikis), uma forma de morte celular induzida pela perda de adesão à matriz extracelular (19,21).

Esta dinâmica de renovação extremamente rápida impõe não apenas requisitos pré-analíticos rigorosos para preservar a integridade das amostras, mas reduz

igualmente a janela temporal disponível para a detecção dos biomarcadores (21,23). Consequentemente, o sucesso da biópsia líquida enquanto ferramenta inovadora de diagnóstico depende da capacidade das plataformas tecnológicas para captar um sinal biológico simultaneamente raro e transitório, distinguindo de forma fiável as alterações genéticas de origem tumoral do ruído biológico de fundo, nomeadamente das mutações associadas ao envelhecimento celular ou à hematopoiese clonal de potencial indeterminado (CHIP - *Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential*) (17,21).

2.2.2 Condicionantes pré-analíticas e padronização das amostras

A implementação da biópsia líquida na prática clínica do cancro do pâncreas depende de um controlo rigoroso da fase pré-analítica, cuja variabilidade constitui atualmente um dos principais obstáculos à reprodutibilidade e à fiabilidade dos resultados (20,22,23). A validade clínica dos biomarcadores obtidos por biópsia líquida está intrinsecamente dependente da gestão adequada desta etapa, uma vez que qualquer variação na manipulação das amostras pode introduzir vieses significativos nas análises moleculares subsequentes (20).

A escolha do dispositivo de colheita representa a primeira etapa crítica deste processo. A utilização de tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) constitui atualmente a prática de referência para prevenir a coagulação sanguínea, embora estes tubos não garantam a estabilização das células nucleadas (22,23). Na ausência de uma estabilização imediata, a lise acidental dos leucócitos conduz à libertação de grandes quantidades de DNA genómico somáticas para o plasma, provocando uma diluição significativa do sinal tumoral, que já é particularmente reduzido nos estádios precoces do PDAC (16,21,23,24). Para minimizar este fenómeno de degradação, os protocolos clínicos recomendam um processamento rápido das amostras recolhidas em tubos com EDTA, sendo ideal que a separação do plasma por centrifugação ocorra entre duas e seis horas após a colheita sanguínea (22,23). Em alternativa, a utilização de tubos de colheita especializados, contendo agentes estabilizadores químicos, como os tubos Streck® ou cfDNA BCT®, permite preservar a integridade das células sanguíneas e estabilizar o cfDNA durante vários dias à temperatura

ambiente. Esta abordagem facilita significativamente a logística de transporte das amostras para plataformas analíticas centralizadas (16,22,23).

As modalidades de centrifugação e conservação das amostras biológicas exigem igualmente a adoção de procedimentos rigorosamente padronizados para garantir a reprodutibilidade dos resultados. De um modo geral, recomenda-se a realização de uma centrifugação dupla fracionada, com o objetivo de obter um plasma acelular de elevada pureza, isento de detritos celulares suscetíveis de contaminar a fração de ctDNA (22,23). Após o isolamento, o plasma deve ser congelado e armazenado a uma temperatura de -80°C , de forma a evitar qualquer atividade residual das nucleases. Além disso, os ciclos repetidos de congelação e descongelação devem ser estritamente evitados, uma vez que podem alterar a estrutura física das vesículas extracelulares e promover uma fragmentação adicional dos ácidos nucleicos circulantes (22,23).

Estas limitações tornam-se ainda mais relevantes no caso do cfRNA e das CTC, que apresentam uma instabilidade biológica superior à do DNA e uma elevada sensibilidade às variações de temperatura e aos stress mecânicos durante o transporte e processamento das amostras (21,22). No caso específico dos exossomas, a padronização dos métodos de isolamento, incluindo a ultracentrifugação diferencial, a cromatografia por exclusão de tamanho e a precipitação polimérica, continua a representar um desafio significativo, uma vez que cada técnica influencia de forma distinta a pureza, a quantidade e a funcionalidade biológica das populações vesiculares obtidas (16,21,23,26). De forma semelhante, a análise das TEP exige uma manipulação extremamente cuidadosa durante a colheita e centrifugação das amostras, de modo a evitar qualquer ativação plaquetária exógena. Tal ativação pode modificar de forma irreversível o perfil transcriptómico das plaquetas, comprometendo a interpretação dos resultados moleculares (23).

Perante esta complexidade biológica e tecnológica, a ausência de procedimentos operacionais normalizados (*Standard Operating Procedures* - SOP) a nível internacional constitui atualmente um dos principais entraves à integração da biópsia líquida na prática clínica de rotina (20,24,26,29). As discrepâncias observadas entre diferentes estudos, nomeadamente ao nível da sensibilidade e da especificidade dos testes, são frequentemente atribuídas à

heterogeneidade dos métodos de recolha, processamento e armazenamento utilizados pelos diversos centros de investigação (20–22). Em resposta a esta necessidade de padronização, vários consórcios internacionais, como a European Liquid Biopsy Society e o CANCER-ID, têm desenvolvido iniciativas destinadas à elaboração de diretrizes universais e de programas de controlo externo da qualidade (*External Quality Assessment* - EQA) (21,22,26,28). A implementação destes padrões de qualidade ao longo de toda a cadeia analítica constitui uma condição indispensável para transformar a biópsia líquida numa ferramenta robusta de diagnóstico precoce, capaz de gerar dados moleculares comparáveis, reproduzíveis e clinicamente úteis para a abordagem personalizada dos doentes com cancro do pâncreas (17,20,23,24).

2.2.3 Variabilidade interindividual e limitações interpretativas

Um dos principais obstáculos à generalização da biópsia líquida na prática clínica reside na elevada variabilidade interindividual das concentrações de biomarcadores circulantes, o que dificulta significativamente o estabelecimento de limiares de diagnóstico universais (16,24). A quantidade de material tumoral libertado para a circulação, quer se trate de ctDNA, CTC ou exossomas, está estreitamente relacionada com fatores biológicos dinâmicos, como o estágio clínico da doença, a carga tumoral global, a localização das metástases e a taxa de renovação celular (16,24). No contexto do PDAC, esta variabilidade é ainda mais acentuada devido à presença de um estroma desmoplásico denso, que limita a vascularização intratumoral e dificulta mecanicamente a passagem dos analitos para a circulação sanguínea (23). Consequentemente, enquanto a fração alélica variante do DNA tumoral pode atingir valores compreendidos entre 5% e 80% nos contextos metastáticos, permanece frequentemente inferior a 1%, ou mesmo inferior a 0,01%, nos estádios localizados ou precoces da doença, tornando o sinal biológico extremamente difícil de detetar com as tecnologias atualmente disponíveis (16,21).

Para além desta raridade intrínseca, a interpretação dos resultados é dificultada pela presença de um importante ruído biológico de fundo. O plasma contém naturalmente cfDNA proveniente da apoptose de células saudáveis, nomeadamente células hematopoiéticas e endoteliais, cuja concentração pode variar consideravelmente entre indivíduos e em função do estado inflamatório ou

de outras condições patológicas (22,24,26). Uma das limitações mais importantes da biópsia líquida reside na sua incapacidade atual para distinguir de forma absolutamente fiável as alterações genéticas de origem tumoral das alterações associadas à CHIP (17,24). Este fenómeno, particularmente frequente em indivíduos idosos, caracteriza-se pela acumulação de mutações somáticas em células estaminais hematopoiéticas, que podem ser erroneamente interpretadas como mutações tumorais durante a análise do cfDNA, originando resultados falso-positivos (21,24). Além disso, determinadas condições benignas, como a pancreatite crónica ou a icterícia obstrutiva, podem provocar uma elevação inespecífica de alguns biomarcadores circulantes, reduzindo a especificidade dos testes de deteção precoce (21,23).

A heterogeneidade espacial e temporal do tumor impõe igualmente limitações interpretativas importantes, associadas ao denominado viés de amostragem. Embora a biópsia líquida possua o potencial teórico de refletir o conjunto do panorama genómico da doença, não existe garantia de que todos os clones tumorais ou todos os locais metastáticos contribuam de forma equivalente para a libertação de componentes tumorais circulantes (17,23,24). Esta libertação heterogénea pode conduzir a uma sub-representação de determinados subclones resistentes ou, inversamente, a uma sobrestimação da carga tumoral, dependendo das características de vascularização de cada lesão (17,23,25). Consequentemente, um resultado negativo obtido por biópsia líquida, particularmente nos estádios precoces do cancro do pâncreas, não permite excluir de forma definitiva a presença de uma lesão maligna (17,21,24).

Por outro lado, a ausência de protocolos padronizados para a recolha, manipulação e análise das amostras constitui uma fonte adicional de variabilidade técnica que se sobrepõe à já considerável variabilidade biológica (20,21,26). Esta heterogeneidade metodológica continua a limitar a comparabilidade dos resultados entre diferentes centros e estudos, dificultando a implementação generalizada da biópsia líquida na prática clínica. Para ultrapassar estas limitações e aumentar a precisão diagnóstica, torna-se cada vez mais necessária a integração de modelos de interpretação assistidos por IA e por técnicas de aprendizagem automática (*machine learning*) (17,20,23). Estas ferramentas permitem analisar assinaturas moleculares complexas, como a

fragmentómica, baseada no estudo do tamanho e da distribuição padrões dos fragmentos de ctDNA ou os perfis de metilação à escala do genoma completo, contribuindo para uma melhor distinção entre os sinais tumorais e o ruído biológico de fundo, bem como para uma identificação mais precisa da origem tecidular das alterações detetadas (20,23,26). Em conclusão, o sucesso da biópsia líquida enquanto ferramenta inovadora para a deteção precoce do PDAC depende de uma abordagem verdadeiramente multidisciplinar, que combine os dados provenientes das análises moleculares com as informações fornecidas pela imagiologia convencional, pelos parâmetros clínicos do doente e por sistemas avançados de apoio à decisão baseados em IA (17,20).

3 Análise crítica dos novos biomarcadores circulantes

3.1 DNA tumoral circulante e perfis de metilação

3.1.1 Origem biológica e definição

O cfDNA é constituído por fragmentos de ácidos nucleicos de dupla cadeia que circulam livremente no compartimento vascular e em diversos biofluidos, como a urina ou a saliva (30–32). Embora uma pequena fração possa resultar da secreção ativa pelas células através de vesículas extracelulares, a sua presença é atribuída principalmente aos processos de morte celular por apoptose e necrose (11,33,34). O ctDNA corresponde à subfração específica do cfDNA libertada diretamente por células de tumores primários ou metastáticos (11,33,34). No contexto do PDAC, estas moléculas funcionam como transportadores circulantes das alterações somáticas, genómicas e epigenéticas características da doença tumoral (11,35).

3.1.2 Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral

Em condições fisiológicas, o cfDNA resulta maioritariamente da renovação normal das células saudáveis, sobretudo de origem hematopoiética, sendo a sua concentração mantida em níveis basais reduzidos através da depuração hepática e renal (33). Em contrapartida, a fisiopatologia do PDAC caracteriza-se por um intenso remodelamento tecidular e por um aumento da morte celular maligna, conduzindo a uma libertação significativamente superior de fragmentos de DNA para a circulação (34,36). Devido à sua origem predominantemente apoptótica, o ctDNA apresenta-se geralmente sob a forma de fragmentos curtos, com um comprimento médio de cerca de 166 pares de bases, correspondente à proteção do DNA pelos nucleossomas durante o processo de degradação enzimática (34,37). Esta fração circulante fornece uma representação dinâmica da heterogeneidade clonal do tumor pancreático, permitindo captar mutações provenientes de diferentes regiões da massa tumoral que poderiam não ser identificadas através de uma única biópsia tecidular (36,38,39).

3.1.3 Interesse específico no cancro do pâncreas e na deteção precoce

O interesse diagnóstico do ctDNA no PDAC baseia-se historicamente na deteção de mutações do oncogene *KRAS*, presentes em mais de 90% a 95% dos casos

(11,35,38). A proteína KRAS atua como um interruptor molecular que alterna entre uma forma inativa ligada ao GDP e uma forma ativa ligada ao GTP, promovendo a ativação de vias de sinalização envolvidas na sobrevivência celular, como RAF/MEK/ERK e PI3K/AKT (35,40). AS mutações que ocorrem no oncogene *Kras* constituem uma das alterações genéticas mais precoces do processo de carcinogénese pancreática (11,38,40). Contudo, os perfis aberrantes de metilação do DNA, incluindo fenómenos de hipermetilação de regiões promotoras e de hipometilação global, têm emergido como biomarcadores potencialmente mais sensíveis para a deteção precoce da doença (11,31). Assinaturas epigenéticas envolvendo genes como *ADAMTS1*, *BNC1*, *BMP3* e *SST* demonstraram capacidade para diferenciar lesões pancreáticas malignas de patologias benignas com elevada especificidade, mesmo em estádios localizados (11,19,31). Uma evolução particularmente promissora consiste na análise da 5-hidroximetilcitosina (5hmC). As assinaturas desta modificação epigenética identificadas no cfDNA demonstraram capacidade para detetar doentes com PDAC mesmo no estágio I, apresentando uma sensibilidade de 68,3% (11,32,41).

3.1.4 Métodos de análise disponíveis

A deteção do cfDNA e do ctDNA exige tecnologias altamente sensíveis, capazes de identificar alterações moleculares num contexto em que o ctDNA pode representar menos de 0,1% do cfDNA total (31,34,35). A PCR digital em gotículas (ddPCR) constitui atualmente uma das técnicas de referência para a quantificação absoluta de mutações específicas do *KRAS*, nomeadamente nos codões 12, 13 e 61. Esta metodologia baseia-se na divisão da amostra em milhares de microcompartimentos independentes, permitindo alcançar limites de deteção próximos de 0,01% (19,33,38). Para uma análise mais abrangente do genoma ou para a identificação de mutações desconhecidas, recorre-se ao NGS de elevada profundidade (19,38). Neste contexto, a utilização de identificadores moleculares únicos (*Unique Molecular Identifiers* - UMI) assume uma importância fundamental, uma vez que permite reduzir os erros introduzidos pela PCR e pelo próprio sequenciamento, distinguindo variantes genuínas de artefactos técnicos (33,34). Relativamente à análise epigenética, o sequenciamento genómico completo após tratamento com bissulfito oferece uma resolução ao

nível de uma única base em todo o genoma. No entanto, o seu elevado custo e a complexidade bioinformática associada têm incentivado o desenvolvimento de abordagens mais facilmente transferíveis para a prática clínica, incluindo painéis de metilação direcionados e métodos de enriquecimento seletivo, como *Reduced Representation Bisulfite Sequencing* e TELQAS, que permitem uma análise mais eficiente e economicamente viável dos perfis de metilação associados ao cancro do pâncreas (31,42,43).

3.1.5 Interpretação clínica dos resultados

A deteção de ctDNA portador de mutações tumorais ou de assinaturas específicas de metilação está geralmente associada a uma elevada carga tumoral e a um prognóstico desfavorável (35,44). No contexto clínico, a análise longitudinal destes biomarcadores permite avaliar de forma dinâmica a evolução da doença e a resposta aos tratamentos. Um dos conceitos mais relevantes é o de doença residual mínima (MRD - *Minimal Residual Disease*). A persistência ou o reaparecimento de ctDNA após uma cirurgia com intenção curativa constitui um forte indicador da presença de células tumorais residuais e pode anteceder em vários meses a deteção de uma recidiva através dos métodos imagiológicos convencionais (30,44). Por outro lado, a ausência de ctDNA detetável durante ou após o tratamento é geralmente interpretada como um sinal de resposta terapêutica favorável, refletindo uma redução significativa da carga tumoral (19,34). Mais recentemente, o desenvolvimento de algoritmos baseados em inteligência artificial (IA) e aprendizagem automática (*machine learning*) permitiu integrar simultaneamente múltiplos biomarcadores moleculares provenientes de diferentes regiões genómicas. Estes modelos combinam informações relativas a mutações, perfis de metilação e outros parâmetros biológicos para gerar indicadores de risco personalizados, melhorando significativamente o desempenho diagnóstico quando comparados com a utilização isolada do marcador convencional CA19-9 (11,19,44).

3.1.6 Limitações atuais, constrangimentos técnicos, biológicos e clínicos

Apesar do seu elevado potencial, a utilização do ctDNA no diagnóstico precoce do PDAC continua limitada por diversos desafios técnicos e biológicos. A utilização das mutações do *KRAS* como biomarcador único apresenta uma

sensibilidade relativamente modesta nos estádios iniciais da doença, variando entre 10% e 47%, consoante os estudos realizados (37,38). Do ponto de vista biológico, um dos principais desafios é representado pela CHIP. Este fenómeno, frequente em indivíduos idosos, caracteriza-se pela presença de mutações somáticas adquiridas em células hematopoiéticas, incluindo alterações em genes como *TP53* ou *KRAS*, originando resultados falso-positivos na ausência de qualquer tumor sólido (33,37). Outro fator limitante é a existência de doentes classificados como « *low shedders* » (fracos libertadores), que libertam quantidades extremamente reduzidas de ctDNA para a circulação, mesmo perante a presença de uma massa tumoral clinicamente significativa (31,33). As limitações pré-analíticas representam igualmente um desafio importante. A semivida muito curta do ctDNA, estimada entre 15 minutos e 2,5 horas, exige a implementação de protocolos rigorosos de recolha e processamento das amostras. A utilização de tubos contendo agentes estabilizadores das membranas celulares é essencial para evitar a lise dos leucócitos após a colheita sanguínea (30,33,36).

Embora o ctDNA e os seus perfis epigenéticos constituam atualmente alguns dos biomarcadores mais promissores para a deteção precoce do cancro do pâncreas, o seu desempenho isolado permanece insuficiente para assegurar um rastreio eficaz nos estádios I da doença, devido a limitações técnicas e biológicas ainda não totalmente ultrapassadas (19,31,44). Por esta razão, a sua utilização mais promissora parece residir em estratégias multimodais e integradas. Neste contexto, tem ganho destaque o conceito de « circuloma », que consiste na combinação de diferentes categorias de biomarcadores circulantes, incluindo mutações do *KRAS*, perfis de metilação do DNA e biomarcadores proteicos séricos como o CA19-9, o TIMP1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1) e o LRG1 (Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein 1) (5,9). A integração destes diferentes sinais biológicos parece atualmente representar a estratégia mais promissora para alcançar os níveis de sensibilidade e especificidade necessários à implementação de programas de deteção precoce clinicamente robustos e aplicáveis na prática clínica de rotina (34,37).

3.2 Vesículas extracelulares e exossomas

3.2.1 Origem biológica e definição

As vesículas extracelulares (VE) constituem uma população heterogênea de partículas delimitadas por uma bicamada lipídica, secretadas pela quase totalidade dos tipos celulares no microambiente e nos fluidos biológicos (19,45,46). Podem ser classificadas em três subpopulações principais, de acordo com o seu tamanho e biogénese: os exossomas (30 a 150 nm), de origem endocítica ou exocítica e formados pelo gemulação interno de corpos multivesiculares; as microvesículas (150 a 1000 nm), resultantes do gemulação direto da membrana plasmática; e os corpos apoptóticos (500 a 2000 nm), libertados durante a fase tardia da morte celular (19,46,47). Estas estruturas funcionam como vetores de uma carga molecular protegida das enzimas líticas circulantes, composta por proteínas membranares, lípidos, metabolitos e ácidos nucleicos, nomeadamente RNA mensageiro (mRNA) e microRNA (11,36,44,45). Entre os componentes proteicos, o Glypican-1 (GPC1), um proteoglicano de sulfato de heparano ancorado à membrana por uma ligação glicosilfosfatidilinositol, emergiu como um marcador relevante da biópsia líquida no cancro do pâncreas (48,49).

3.2.2 Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral

Em condições fisiológicas, as VE atuam como mediadores essenciais da comunicação intercelular, facilitando a transferência horizontal de sinais biológicos (34,45,46). No contexto do PDAC, a secreção vesicular encontra-se amplamente aumentada e desempenha um papel deletério, ao participar ativamente na remodelação do microambiente tumoral (36,41,44). As VE favorecem a angiogénese, induzem a transição epitélio-mesenquimatosa (EMT) e facilitam a evasão imunitária, nomeadamente através da alteração da função das células dendríticas mediada pela transferência de miR-212-3p e miR-203 (44). Além disso, o fator inibidor da migração de macrófagos transportado pelos exossomas tumorais prepara ativamente nichos pré-metastáticos, particularmente a nível hepático, ao estimular a secreção de fibronectina pelas células estreladas (34). Relativamente ao GPC1, o seu papel fisiopatológico está relacionado com a regulação de vias de sinalização oncogénicas fundamentais,

como as vias Wnt, Hedgehog e dos fatores de crescimento dos fibroblastos (49). A sua distribuição vesicular é complexa: enquanto que o mRNA de GPC1 está enriquecido nos exossomas, a proteína GPC1 está maioritariamente presente nas microvesículas associadas ao tumor (49). Este fenómeno pode ser explicado pelo reciclagem endocítica da proteína GPC1, que sofre degradação enzimática pela heparanase no interior dos endossomas, tornando a estrutura proteica completa menos prevalente nos exossomas de origem endocítica (49).

3.2.3 Interesse específico no cancro do pâncreas e na deteção precoce

O interesse das VE para a deteção precoce do PDAC assenta na sua elevada estabilidade biológica e na sua capacidade de refletir o estado funcional de células tumorais viáveis, ao contrário do ctDNA, que resulta predominantemente de fenómenos de apoptose e necrose (19,44,50). A deteção do GPC1 despertou um interesse considerável na comunidade científica após estudos pioneiros terem sugerido que este biomarcador poderia atuar como um verdadeiro « classificador perfeito », apresentando valores de sensibilidade e especificidade de 100%, inclusivamente em estádios iniciais da doença nos quais os exames imagiológicos permaneciam inconclusivos (19,46,50,51). Embora investigações posteriores tenham relativizado estes resultados iniciais, o GPC1 continua a ser considerado um dos biomarcadores mais promissores para a deteção precoce do cancro do pâncreas. O seu desempenho parece ser particularmente relevante quando integrado numa estratégia de « duplo sinal », combinando simultaneamente a análise do mRNA exossomal de GPC1 e da proteína GPC1 presente em microvesículas associadas ao tumor, aumentando a robustez diagnóstica da abordagem (49). Além do GPC1, outras assinaturas vesiculares têm demonstrado interesse clínico. Entre estas destacam-se o rácio miR-95-3p/miR-26b-5p e a presença da proteína EphA2, que permitem diferenciar eficazmente o PDAC de patologias benignas, como a pancreatite crónica, bem como de lesões pré-neoplásicas, nomeadamente os neoplasmas mucinosos papilares intraductais (IPMN) (35,49,51).

3.2.4 Métodos de análise disponíveis

O isolamento das vesículas extracelulares continua a representar um importante desafio técnico devido à sua reduzida abundância relativa nos fluidos biológicos

e à heterogeneidade das populações vesiculares presentes. A ultracentrifugação diferencial permanece a técnica historicamente mais utilizada e considerada o método de referência para o isolamento de VE. Contudo, apresenta várias limitações, incluindo um elevado gasto de tempo, custos significativos e o risco de alterar a integridade estrutural das vesículas durante o processo de isolamento (19,47). Como alternativa, a cromatografia por exclusão de tamanho (*Size Exclusion Chromatography* - SEC) tem vindo a ganhar relevância por permitir a obtenção de preparações com maior pureza e melhor preservação da atividade biológica das vesículas extracelulares (19,47). Mais recentemente, têm sido desenvolvidas tecnologias inovadoras destinadas a automatizar e padronizar o processo de isolamento. Um exemplo é o sistema EXODUS, que utiliza oscilações de pressão negativa para promover um isolamento ultrarrápido das vesículas extracelulares, permitindo concluir o processo em menos de 10 minutos (47).

Para a deteção altamente sensível do GPC1, foram igualmente desenvolvidas várias plataformas analíticas avançadas. Entre estas destaca-se a plataforma de biópsia nanolíquida, baseada na co-reconhecimento do GPC1 e da proteína EphA2 através de nanopartículas magnéticas e de ouro. A amplificação do sinal é posteriormente realizada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), permitindo atingir um limite de deteção de apenas 78 pg/mL (51). Outra tecnologia promissora é o biochip de nanopartículas lipoplex imunizadas, que possibilita a deteção simultânea da proteína GPC1 e do respetivo mRNA ao nível de uma única vesícula extracelular, utilizando microscopia de fluorescência por reflexão interna total (TIRFM) (49). Por sua vez, a análise por espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*), associada à utilização de marcadores de massa ligados a nanopartículas de ouro, permite uma quantificação precisa dos exossomas GPC1 positivos (GPC1(+)), abrangendo uma ampla gama dinâmica de concentrações (52).

3.2.5 Interpretação clínica dos resultados

Do ponto de vista clínico, os níveis de GPC1 associados a VE apresentam uma forte correlação com a carga tumoral e com o estadiamento TNM da doença (36,49,51,52). Uma diminuição rápida das concentrações de GPC1 após cirurgia

constitui geralmente um indicador favorável de ressecção tumoral eficaz, enquanto a persistência ou o reaparecimento precoce deste biomarcador pode sugerir a presença de doença residual ou o desenvolvimento de uma recidiva tumoral (19,49). Diversos estudos prospetivos demonstraram ainda que a integração do GPC1 em painéis multi-analíticos, combinando este marcador com o CA19-9 e diferentes perfis de miRNA, permite melhorar significativamente o desempenho diagnóstico. Nestes modelos combinados, a AUC ultrapassa frequentemente 0,90, superando claramente os resultados obtidos com a utilização isolada do CA19-9 (35,43,49).

3.2.6 Limitações atuais, constrangimentos técnicos, biológicos e clínicos

Apesar do seu elevado potencial, a aplicação clínica das vesículas extracelulares continua limitada por vários obstáculos metodológicos e biológicos. Um dos principais desafios reside na ausência de protocolos de isolamento universalmente padronizados, o que gera uma considerável heterogeneidade dos resultados entre laboratórios e dificulta a comparação direta dos estudos disponíveis (19,44,49). Do ponto de vista biológico, a análise das VE é frequentemente dificultada pela presença de lipoproteínas plasmáticas e de vesículas extracelulares provenientes de células hematopoiéticas saudáveis, que podem contaminar as amostras e reduzir a capacidade de identificação do sinal tumoral específico, particularmente nos estádios precoces da doença (19,47). Outra limitação importante diz respeito à especificidade do GPC1. Embora este biomarcador esteja fortemente associado ao cancro do pâncreas, a sua expressão não é exclusiva deste tumor. Níveis elevados de GPC1 também foram descritos em outros tipos de neoplasias, incluindo os cancros da mama, do esófago e colorretal, o que limita a sua especificidade enquanto marcador exclusivo do PDAC (49,51). Além disso, a implementação destas abordagens em larga escala continua condicionada pelos elevados custos associados às tecnologias analíticas mais avançadas. Equipamentos como a TIRFM, a ICP-MS e a MALDI-TOF MS exigem infraestruturas especializadas, investimento financeiro significativo e pessoal altamente qualificado. Em alguns casos, a necessidade de volumes relativamente elevados de amostra biológica constitui também uma limitação adicional para a aplicação em programas de rastreio populacional (19,44).

Em síntese, as vesículas extracelulares, e particularmente o GPC1, representam uma das evoluções mais promissoras da biópsia líquida moderna. No entanto, devido à sua especificidade limitada para o órgão de origem e aos desafios técnicos ainda existentes, estes biomarcadores não podem atualmente ser considerados suficientes como estratégia diagnóstica isolada (35,44,49). O seu futuro parece residir na utilização de painéis multimarcadores integrados, combinando a deteção de GPC1 com outros marcadores membranares, como EphA2 e EpCAM, bem como com RNA não codificantes vesiculares e biomarcadores proteicos convencionais, como o CA19-9 (13,17,18,22,23). A integração destes dados através de algoritmos de inteligência artificial e modelos de aprendizagem automática constitui atualmente a estratégia mais promissora para alcançar os níveis de sensibilidade e especificidade necessários à implementação de programas de deteção precoce sistemática e clinicamente robusta do cancro do pâncreas (19,44,45,49,50).

3.3 MicroRNA e outros RNA não codificantes

3.3.1 Origem biológica e definição

Os RNA não codificantes (ncRNA) constituem uma classe heterogénea de moléculas transcritas a partir de aproximadamente 60% do genoma humano, mas que não são traduzidas em proteínas (53). Estes RNA são geralmente classificados de acordo com o seu tamanho em duas grandes categorias: os pequenos RNA não codificantes (*small non-coding RNA* - sncRNA), com menos de 200 nucleótidos, dos quais os microRNA (miRNA), com cerca de 18 a 25 nucleótidos, representam o grupo mais estudado; e os RNA não codificantes longos (*long non-coding RNA* - lncRNA), que possuem mais de 200 nucleótidos (19,54). A estas categorias juntam-se os RNA circulares (circRNA), caracterizados por uma estrutura em anel fechado formada por uma ligação covalente entre as extremidades da molécula. Esta conformação particular confere-lhes uma elevada resistência à degradação por exonucleases circulantes, tornando-os significativamente mais estáveis do que os RNA lineares (19,44). No contexto da biópsia líquida, os ncRNA podem ser libertados para a circulação através de mecanismos passivos, associados à apoptose ou à necrose celular, ou por mecanismos ativos de secreção seletiva. Esta libertação ocorre predominantemente através da sua incorporação em vesículas

extracelulares, como os exossomas, ou sob a forma de complexos ribonucleoproteicos associados à proteína Argonaute 2. Estes mecanismos de proteção permitem preservar a integridade das moléculas de RNA em ambientes biológicos ricos em RNases, como o plasma e o soro (19,44).

3.3.2 Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral

Os miRNA desempenham um papel central na regulação pós-transcricional da expressão génica. O seu mecanismo de ação baseia-se na ligação complementar à região 3' não traduzida (3'UTR) dos mRNA alvo, promovendo a sua degradação ou inibindo a sua tradução em proteínas (11,19,40). Durante a carcinogénese pancreática, este sistema regulador sofre profundas alterações. Os miRNA cuja sobre-expressão contribui para a transformação maligna, a progressão tumoral, a invasão tecidual e a evasão imunitária são designados por oncomiR (11,53). Entre os exemplos mais relevantes encontra-se o miR-21, considerado um dos oncomiRs mais importantes no PDAC. A sua sobre-expressão conduz à inibição de genes supressores tumorais fundamentais, como *PTEN* e *PDCD4*, promovendo a ativação das vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK, diretamente envolvidas na sobrevivência, proliferação e resistência terapêutica das células tumorais (11,40,53). Paralelamente, alguns RNA não codificantes longos (lncRNA) desempenham funções reguladoras ao nível da organização da cromatina e da expressão génica. Moléculas como HOTAIR e MALAT1 encontram-se frequentemente sobre-expressas no PDAC e contribuem para a progressão tumoral através da promoção da EMT, fenómeno associado ao aumento da invasividade celular e da capacidade metastática (11,44,53).

3.3.3 Interesse específico no cancro do pâncreas e na deteção precoce

O interesse dos ncRNA no contexto do PDAC reside na sua capacidade de refletir alterações biológicas muito precoces, frequentemente antes do aparecimento de uma massa tumoral detetável pelos métodos imagiológicos convencionais. Entre os biomarcadores mais promissores destaca-se o miR-483-3p, cuja sobre-expressão foi demonstrada já ao nível das lesões pré-neoplásicas pancreáticas, evidenciando o seu potencial para a identificação de alterações iniciais da carcinogénese pancreática (36,44). Do ponto de vista funcional, este microRNA atua através da inibição direta do gene *SMAD4*, um

regulador central da via de sinalização TGF- β , cuja perda favorece a proliferação celular descontrolada, a progressão tumoral e a evasão imunitária (53). A detecção do miR-483-3p no soro ou em exossomas circulantes permite identificar doentes com PDAC localizado, apresentando uma AUC compreendida entre 0,81 e 0,83 (36,44,55). Para além da sua utilidade diagnóstica, este biomarcador demonstrou também interesse na diferenciação entre o PDAC e determinadas lesões quísticas pancreáticas, nomeadamente os IPMN (53).

Um conceito inovador e particularmente robusto tem emergido para otimizar a precisão do rastreio : a utilização de rácios de microRNA. A análise de rácios, como o rácio miR-95-3p/miR-26b-5p, permite ultrapassar os principais desafios relacionados com a normalização dos dados nos biofluidos (56). Ao utilizar um par de miRNA (um sobre-expresso e outro subexpresso ou estável), é possível compensar as variações interindividuais da concentração plasmática e os vieses pré-analíticos (56). Este rácio miR-95-3p/miR-26b-5p demonstrou uma capacidade excecional para distinguir o PDAC da pancreatite crónica, apresentando uma sensibilidade de 86,7% e uma especificidade que atingiu 100% em algumas coortes de validação (35,56).

3.3.4 Métodos de análise disponíveis

A quantificação dos ncRNA baseia-se tradicionalmente na técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), considerada o método de referência devido à sua elevada sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Esta abordagem utiliza frequentemente reagentes fluorescentes, como o PowerUp™ SYBR™ Green, permitindo a quantificação precisa da expressão de microRNA específicos (19,57). Para a identificação de assinaturas transcriptómicas mais complexas e para a descoberta de novos biomarcadores, recorre-se frequentemente ao sequenciamento de nova geração (Next-Generation Sequencing - NGS). Plataformas como o NovaSeq 6000 permitem uma análise abrangente do chamado « circuloma », possibilitando a caracterização simultânea de múltiplas espécies de RNA circulantes presentes nos biofluidos (19,57). Paralelamente, têm sido desenvolvidas tecnologias inovadoras destinadas a simplificar e acelerar a aplicação clínica destas análises. Um exemplo relevante é a plataforma de multiplexagem Abcam FirePlex™, que permite a detecção

simultânea de até 68 microRNA diferentes a partir de apenas 20 µL de plasma (19). Uma das principais vantagens desta tecnologia consiste na eliminação das etapas convencionais de extração e purificação do RNA, reduzindo significativamente os vieses pré-analíticos e encurtando o tempo necessário para obtenção dos resultados. Esta característica torna-a particularmente atrativa para uma futura integração em contextos hospitalares de rotina (19). Mais recentemente, surgiram novas abordagens baseadas em nanobiotecnologia, incluindo biossensores nanoestruturados e técnicas de deteção fundamentadas na ressonância plasmónica de superfície (*Surface Plasmon Resonance* – SPR) ou na espectroscopia Raman intensificada por superfície (*Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* - SERS). Estas tecnologias permitem uma deteção ultrasensível dos ncRNA sem necessidade de amplificação prévia, reduzindo simultaneamente o tempo de análise e aumentando o potencial de aplicação clínica em programas de deteção precoce (43).

3.3.5 Interpretação clínica dos resultados

A interpretação clínica dos ncRNA evoluiu para uma ferramenta diagnóstica de elevado desempenho, capaz de colmatar as limitações dos biomarcadores convencionais (43,44). Uma meta-análise de grande dimensão demonstrou que os painéis de miRNA alcançam uma sensibilidade de 88% e uma especificidade de 91% para a deteção do PDAC, com uma AUC global de 0,95, superando significativamente o desempenho do CA19-9 (43). O principal valor diagnóstico destas assinaturas reside na sua capacidade para realizar um diagnóstico diferencial fiável entre o PDAC e a pancreatite crónica, uma situação frequente em imagiologia (43,56,57). Por exemplo, painéis que incluem miR-1246, miR-205-5p e miR-191-5p apresentaram uma precisão diagnóstica de 94,4% para esta distinção (44). Clinicamente, a utilização de rácios como o miR-95-3p/miR-26b-5p permite identificar doentes nos estádios I e II, com uma especificidade que pode atingir 96,6%. Além disso, a aplicação de um score de risco baseado numa assinatura composta por 20 miRNA, validada em mais de 800 amostras, demonstrou a capacidade de manter uma AUC de 0,87 em diferentes plataformas tecnológicas, incluindo microarray e sequenciação de RNA (58). Estes biomarcadores conservam igualmente a sua utilidade diagnóstica nos 5%

a 10% de doentes Lewis-negativos (43,58). A combinação destas assinaturas de RNA com o CA19-9 permite aumentar a AUC diagnóstica de 0,89 para 0,94, melhorando significativamente a estratificação dos doentes suspeitos e orientando de forma mais precisa aqueles que poderão beneficiar de uma abordagem cirúrgica precoce (19,44).

A integração da IA tornou-se indispensável para o tratamento destes dados de elevada número. A utilização de algoritmos como o Random Forest, associada à análise SHAP (*Shapley Additive explanations*), permite identificar a importância relativa de cada miRNA como o miR-6875-5p ou o miR-196a-5p na predição diagnóstica, reduzindo assim o caráter de « caixa negra » frequentemente associado aos modelos de IA (58).

3.3.6 Limitações atuais, constrangimentos técnicos, biológicos e clínicos

Apesar do potencial promissor dos ncRNA como biomarcadores para a deteção precoce do PDAC, a sua implementação clínica continua condicionada por diversas limitações metodológicas e biológicas. Um dos principais desafios reside na significativa heterogeneidade pré-analítica observada entre estudos e laboratórios. A ausência de protocolos universalmente padronizados para a extração, isolamento e quantificação do RNA compromete a comparabilidade dos resultados. Adicionalmente, existe uma grande variabilidade na escolha dos genes ou moléculas de referência utilizados para normalização, sendo frequentemente utilizados controlos distintos, como o U6 sncRNA ou o miR-16, o que dificulta a reprodutibilidade dos dados e a definição de valores de referência clinicamente robustos (41,44,55). Do ponto de vista biológico, a principal limitação está relacionada com a especificidade insuficiente para o órgão de origem. Muitos dos microRNA associados ao PDAC pertencem ao grupo dos oncomiRs, cuja expressão alterada também é observada noutros tumores sólidos. Além disso, a expressão destes biomarcadores pode ser influenciada por diversas condições sistémicas não malignas, como o diabetes mellitus, processos inflamatórios, reduzindo a sua especificidade diagnóstica quando utilizados isoladamente (41,55). Outro aspeto relevante prende-se com a existência de diferenças biológicas associadas ao sexo. Estudos recentes demonstraram que determinados microRNA apresentam comportamentos distintos em homens e mulheres. Por exemplo, a expressão do miR-27a-3p

encontra-se correlacionada com o estágio tumoral nas mulheres, enquanto os miR-17-5p e miR-20a-5p demonstram uma associação semelhante nos homens. Estas observações sugerem que futuras estratégias diagnósticas poderão necessitar de limiares específicos ajustados ao sexo, de forma a otimizar a precisão dos testes (59). Do ponto de vista tecnológico, a utilização de plataformas avançadas de NGS continua limitada pelo seu elevado custo, pela necessidade de infraestruturas especializadas e pela complexidade dos processos bioinformáticos necessários para a análise e interpretação dos dados obtidos (42).

Em síntese, os microRNA e outros ncRNA circulantes representam uma das categorias mais promissoras de biomarcadores emergentes para o diagnóstico precoce do cancro do pâncreas. A elevada estabilidade destas moléculas e a deteção precoce de alterações associadas a marcadores como o miR-483-3p, bem como a utilização de estratégias inovadoras baseadas em rácios de microRNA, reforçam o seu potencial clínico. No entanto, estes biomarcadores não parecem destinados a ser utilizados isoladamente. O seu maior valor reside na integração em painéis multi-ómicos. As estratégias mais promissoras incluem a associação de assinaturas de oncomiRs, perfis de metilação do DNA, biomarcadores proteicos convencionais e algoritmos de inteligência artificial interpretável, capazes de integrar e analisar simultaneamente múltiplas variáveis biológicas (55).

A longo prazo, o sucesso do rastreio precoce do PDAC dependerá provavelmente de abordagens multimodais e protocolos que permitam atingir os níveis de sensibilidade e especificidade necessários para uma vigilância eficaz das populações de alto risco, contribuindo para um diagnóstico mais precoce e para uma melhoria significativa do prognóstico dos doentes.

3.4 Biomarcadores proteicos e proteómica circulante

3.4.1 Origem biológica e definição

O proteoma circulante, também designado por secretoma, corresponde ao conjunto de proteínas e peptídeos libertados pelas células para os fluidos biológicos, constituindo uma importante fonte de biomarcadores para o PDAC (30,42). A presença destas moléculas na circulação resulta de dois mecanismos

biológicos distintos, mas complementares: a secreção ativa e a libertação passiva (30). A secreção ativa envolve proteínas sintetizadas pelas células tumorais ou pelas células do estroma tumoral circundante, que são posteriormente libertadas através de vias secretoras clássicas ou encapsuladas em vesículas extracelulares (30). Como exemplo, a GPC1 pode ser libertada sob uma forma solúvel após clivagem da membrana celular ou permanecer associada à membrana dos exossomas (48,49). Por outro lado, a libertação passiva resulta diretamente da fisiopatologia agressiva do PDAC. Os fenómenos de apoptose, necrose tecidual e remodelação intensa da matriz extracelular promovem a libertação de componentes estruturais e enzimáticos para a circulação sanguínea (30). Este processo é amplificado pela intensa reação desmoplásica, uma característica marcante do cancro do pâncreas, que altera profundamente as trocas moleculares entre o tumor e os sistemas vascular e linfático (30). No contexto do PDAC, os biomarcadores proteicos circulantes incluem uma grande diversidade de moléculas, como glicoproteínas de superfície, enzimas proteolíticas, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento (11,41).

3.4.2 Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral

Em condições fisiológicas, muitas proteínas circulantes desempenham funções essenciais de sinalização celular, transporte molecular e manutenção estrutural dos tecidos. Contudo, durante a progressão do PDAC, tanto as células tumorais como o seu microambiente desmoplásico promovem alterações profundas no perfil proteico sistémico (11,41,60). O secretoma tumoral não deve ser encarado apenas como um subproduto metabólico da atividade neoplásica. Pelo contrário, constitui um elemento central da progressão tumoral, participando ativamente na comunicação parácrina e sistémica (34,42). Entre os biomarcadores mais relevantes encontram-se o TIMP1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1) e o LRG1 (Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein 1), proteínas ativamente secretadas pelas células tumorais e pelo microambiente tumoral. Estas moléculas contribuem para a invasão celular, remodelação da matriz extracelular e angiogénese através da ativação de múltiplas vias de sinalização oncogénicas (11,35). Paralelamente, o ambiente inflamatório associado ao PDAC promove a libertação de diversas citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina-6 (IL-

6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Estas moléculas não favorecem apenas a proliferação tumoral e a sobrevivência celular, mas também participam no desenvolvimento de síndromes paraneoplásicas, como a caquexia associada ao cancro (11). A análise proteómica permite igualmente identificar alterações da resposta imunitária sistémica. Entre estas destacam-se os aumentos de proteínas da família S100, nomeadamente S100A6 e S100A8, observados em monócitos e células dendríticas circulantes de doentes com PDAC. O plasma humano é dominado por proteínas altamente abundantes, como a albumina, que podem mascarar biomarcadores presentes em concentrações muito reduzidas. Por este motivo, a identificação de proteínas tumorais específicas exige técnicas de proteómica de alta resolução capazes de detetar sinais moleculares de baixa abundância (30,34). Neste contexto, a exploração de outros biofluidos tem ganho crescente interesse. A urina, por exemplo, constitui uma alternativa particularmente atrativa, uma vez que apresenta um secretoma mais estável, menos complexo do que o plasma e pode ser obtida de forma totalmente não invasiva (30).

3.4.3 Interesse específico no cancro do pâncreas e limitações do CA19-9

O interesse dos biomarcadores proteicos reside na sua acessibilidade e na sua utilização rotineira nos laboratórios de análises clínicas. Contudo, o CA19-9 apresenta limitações críticas para o rastreio precoce: carece de especificidade (elevações frequentes em casos de colestase ou pancreatite) e de sensibilidade nos estádios iniciais da doença (11,35,41,42,44). Para ultrapassar esta limitação, o DUPAN-2, precursor do CA19-9, surge como uma alternativa diagnóstica valiosa nestes doentes (11,35,41). Adicionalmente, a utilização de painéis que combinam o CA19-9 com TIMP1 e LRG1 permite aumentar significativamente a deteção dos cancros em estágio I e II quando comparada com a utilização isolada deste marcador (37,41).

3.4.4 Métodos de análise disponíveis

A quantificação das proteínas baseia-se classicamente em técnicas imunológicas como o ELISA ou a eletroquimioluminescência (ECLIA) (42,43,48,61). No entanto, o surgimento da proteómica de alto débito está a transformar a descoberta de biomarcadores. A espectrometria de massa

(nomeadamente a MALDI-TOF MS) permite gerar « impressões digitais proteicas » séricas complexas para identificar assinaturas discriminativas (34,41). Abordagens inovadoras, como a tecnologia APTASHAPE, que utiliza bibliotecas de aptâmeros (oligonucleótidos modificados) capazes de se ligar especificamente a qualquer epítipo proteico, permitem a análise simultânea de milhares de moléculas a um custo reduzido (42). Por outro lado, a análise do proteoma urinário (incluindo LYVE-1 (Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1), REG1B (Regenerating Family Member 1 Beta) e TFF1 (Trefoil Factor 1)) surge como uma alternativa totalmente não invasiva e termoestável, simplificando os constrangimentos pré-analíticos em comparação com o plasma (30,41,42).

3.4.5 Interpretação clínica dos resultados

A interpretação clínica orienta-se cada vez mais para algoritmos de pontuação de risco multi-analitos. A integração de painéis de proteínas séricas (score PancRISK ou painéis que incluem *MUC5AC*) permite atingir AUC diagnósticas superiores a 0,90 (30,41,42,44). O desenvolvimento do score PancRISK constitui um modelo preditivo baseado numa assinatura proteómica urinária que inclui três proteínas-chave: LYVE-1, REG1B e TFF1 (30,41). O score PancRISK integra as concentrações destas proteínas com a idade do doente e o nível de creatinina urinária para gerar uma probabilidade de presença tumoral (41). A adição do CA19-9 plasmático a este painel urinário permite alcançar níveis excecionais de sensibilidade e especificidade, na ordem dos 96%, para distinguir indivíduos saudáveis de doentes com PDAC (41). No contexto da deteção precoce, este score demonstrou uma elevada robustez ao manter uma AUC de 0,892 até um ano antes do diagnóstico clínico, tornando-se uma das ferramentas de rastreio não invasivo mais promissoras para populações de alto risco (41). Do ponto de vista prognóstico, níveis pré-operatórios muito elevados de CA19-9 (> 529 U/mL em algumas recomendações) estão associados a um elevado risco de metástases ocultas, orientando a estratégia terapêutica para uma quimioterapia neoadjuvante em vez de uma abordagem cirúrgica imediata (11,35,41,44). A cinética pós-operatória dos biomarcadores proteicos (diminuição rápida versus persistência dos níveis elevados) constitui igualmente um indicador robusto da eficácia da resseção cirúrgica e do risco de recidiva precoce (11,35,41,61).

A interpretação clínica dos biomarcadores proteicos tem também evoluído para responder ao desafio do diagnóstico diferencial entre o PDAC e a pancreatite crónica (57). Neste contexto, a mucina *MUC5AC*, uma glicoproteína de elevado peso molecular normalmente ausente no pâncreas saudável, emergiu como um biomarcador discriminativo particularmente relevante (11). A *MUC5AC* encontra-se sobre-expressa precocemente, já nos estádios das PanIN e dos neoplasmas quísticos, como os IPMN (30). O seu interesse diagnóstico reside na capacidade de identificar processos malignos em situações nas quais o CA19-9 pode apresentar limitações devido à presença de fenómenos inflamatórios ou de colestase (19,30). Estudos multicêntricos demonstraram que a deteção sérica de *MUC5AC*, frequentemente combinada com o CA19-9, permite atingir uma AUC entre 0,82 e 0,91, melhorando significativamente a especificidade do rastreio em doentes com suspeita de massas pancreáticas (30,36).

3.4.6 Limitações atuais e constrangimentos clínicos

Apesar destes avanços, vários obstáculos continuam a limitar a adoção da proteómica na prática clínica de rotina. Além disso, muitas proteínas, como o TIMP1 ou diversas citocinas inflamatórias, apresentam uma especificidade de órgão limitada, podendo igualmente estar aumentadas noutros tipos de cancro ou em doenças inflamatórias sistémicas. Do ponto de vista técnico, a complexidade do proteoma plasmático, dominado por proteínas com abundância elevada como a albumina, exige etapas de depleção dispendiosas e complexas para permitir a deteção de biomarcadores tumorais presentes em baixas concentrações (30,34).

Do ponto de vista clínico a variabilidade interindividual relacionada com diferentes comorbilidades, como a diabetes, a icterícia ou a insuficiência renal (no caso dos biomarcadores urinários), impõe igualmente uma padronização rigorosa dos limiares clínicos utilizados para interpretação dos resultados (31,36,41). Por fim, a ausência de uma padronização internacional dos valores de positividade entre as diferentes plataformas analíticas limita a reprodutibilidade dos resultados e dificulta a comparação direta entre centros e estudos (11,31,36).

Os biomarcadores proteicos continuam a constituir um dos pilares do diagnóstico do cancro do pâncreas. Embora o CA19-9, utilizado isoladamente, seja insuficiente para responder aos desafios do rastreio precoce, a sua combinação com painéis de proteínas complementares, como DUPAN-2, TIMP1 e LRG1, bem como com assinaturas metabolómicas e genómicas, representa a base das futuras estratégias de deteção precoce (34,41,44). O futuro passa pelo desenvolvimento e implementação de testes multiplex automatizados, validados em grandes coortes prospetivas, capazes de identificar com elevada especificidade os doentes que deverão beneficiar de exames imagiológicos mais complexos ou de intervenções terapêuticas precoces (11,41,42).

3.5 Células tumorais circulantes

3.5.1 Origem biológica e definição

As CTC são células cancerígenas que se desprendem do tumor primário ou de locais metastáticos para penetrar no compartimento vascular (11,19). São consideradas as « sementes » da disseminação metastática, circulando na corrente sanguínea para colonizar órgãos distantes (11,51). No PDAC, a sua presença é extremamente rara, com uma concentração frequentemente estimada em apenas uma célula por mil milhões de células sanguíneas normais, ou entre 1 e 100 células por 10 mL de sangue (35,51). Ao contrário dos biomarcadores acelulares (ctDNA, exossomas), que resultam de processos de degradação ou secreção, as CTC representam entidades celulares completas e potencialmente viáveis, conservando a integridade da informação genómica, transcriptómica e proteómica da célula de origem (34,35).

3.5.2 Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral

A fisiopatologia das CTC está intrinsecamente ligada ao processo de EMT (19). Para conseguirem infiltrar-se nos vasos sanguíneos, as células do PDAC perdem progressivamente as suas características epiteliais e adquirem um fenótipo mesenquimatoso mais invasivo, caracterizado pela expressão de proteínas como a vimentina e a N-caderina (11,19). Uma vez na circulação, a sua sobrevivência é curta, estimando-se uma duração entre 1 e 2,5 horas, devido às forças mecânicas de cisalhamento e à ação do sistema imunitário (19,32). Para contrariar estas agressões, as CTC podem agregar-se a TEP, formando

um escudo físico que as protege da vigilância imunológica e facilita a sua fixação em nichos pré-metastáticos (32,41). Estas células refletem a heterogeneidade espacial e temporal da carga tumoral global, oferecendo uma visão mais abrangente da doença do que as biópsias tecidulares convencionais realizadas num único local e num único momento (34).

3.5.3 Interesse específico no cancro do pâncreas e na deteção precoce

O principal interesse das CTC reside na sua elevada especificidade: estão virtualmente ausentes em indivíduos saudáveis, tornando qualquer deteção altamente sugestiva de um processo maligno (19,35). Estudos sugerem que a disseminação hematogénica poderá ser um acontecimento extremamente precoce, ocorrendo mesmo antes da formação de uma massa tumoral visível por imagiologia (19). A deteção de células epiteliais circulantes (CEC) foi assim descrita em 40% dos doentes portadores de lesões quísticas pré-neoplásicas (IPMN, PanIN) (19,35). Embora a sua raridade no estágio I limite a sua utilização como método de rastreio em monoterapia, a sua deteção em estadios localizados apresenta uma sensibilidade de 75% e uma especificidade de 96,4% (19,35). A integração das CTC com outros biomarcadores, como os exossomas GPC1(+), permitiu atingir uma sensibilidade diagnóstica de 100% em algumas coortes prospetivas (35,44).

3.5.4 Métodos de análise disponíveis

O isolamento e a caracterização das CTC no âmbito do « circuloma » pancreático representam um dos desafios técnicos mais complexos da biópsia líquida, devido à sua extrema raridade e fragilidade estrutural (34,36). Os diferentes métodos dividem-se classicamente em duas etapas sequenciais: o enriquecimento, que visa aumentar a concentração de células tumorais relativamente ao ruído de fundo celular sanguíneo, e a deteção, destinada a confirmar a origem maligna das células capturadas (34,36).

As estratégias de enriquecimento biológico constituem a abordagem mais amplamente documentada, tendo como referência o sistema CellSearch, a única tecnologia aprovada pela FDA para determinados tumores sólidos (19,35,44). Este sistema baseia-se na utilização de esferas imunomagnéticas funcionalizadas com anticorpos dirigidos contra o antigénio de superfície EpCAM

(*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) (19,36,44). Contudo, a eficácia desta abordagem no PDAC é comprometida pelo processo de transição EMT, durante o qual as células tumorais perdem a expressão dos seus marcadores epiteliais e adquirem um fenótipo mais invasivo (19,34,36,44). Esta heterogeneidade fenotípica gera um número significativo de falsos negativos, limitando a sensibilidade da captura imunomagnética convencional (19,34,36).

Para ultrapassar estas limitações, foram desenvolvidos métodos de enriquecimento físico, ou *label-free*, que exploram as diferenças de propriedades biofísicas entre as células tumorais e as células hematopoiéticas normais (19,36). Estas técnicas utilizam membranas microporosas para filtração por tamanho (sistema CellSieve), gradientes de densidade por centrifugação ou ainda dispositivos microfluídicos avançados (19,36). O sistema microfluídico SMART-Chip ilustra esta evolução, manipulando fluxos laminares para isolar as CTC de acordo com a sua morfologia, permitindo reduzir o tempo de processamento das amostras em mais de 50% quando comparado com métodos manuais (19). Paralelamente, abordagens baseadas na dielectroforese permitem manipular as células de acordo com a sua capacitância membranar, constituindo uma alternativa interessante para a captura de CTC que sofreram uma EMT completa (19,36).

Para aumentar a taxa de deteção face à raridade das CTC nos estádios precoces, foram desenvolvidas estratégias baseadas no aumento do volume de sangue analisado e na otimização do local de colheita (19,44). A leucoaférese diagnóstica permite analisar volumes de sangue muito superiores aos das colheitas convencionais (até vários litros), aumentando significativamente a probabilidade de captura e permitindo atingir taxas de deteção de 74% nas formas metastáticas (44). De igual modo, a colheita de sangue da veia porta demonstrou um rendimento superior ao do sangue periférico, devido à sua maior proximidade anatómica com o tumor (19,44).

Uma vez concluída a etapa de enriquecimento, a fase de deteção e caracterização recorre a métodos de imagiologia ou de análise molecular (19,36). A imunocitoquímica, associada à microscopia de fluorescência de alta resolução (como o sistema ACCEPT), permite visualizar simultaneamente marcadores de superfície (citoqueratinas, vimentina) e marcadores nucleares

(DAPI), confirmando a viabilidade e a origem das células analisadas (19,32,36,44). Paralelamente, abordagens moleculares baseadas em RT-qPCR ou em NGS permitem detetar transcritos tumorais específicos ou mutações oncogénicas, como as mutações do *KRAS* (19,36,44). O aparecimento da sequenciação de célula única (*single-cell NGS*) representa atualmente o nível tecnológico mais avançado desta área, permitindo caracterizar a heterogeneidade genómica e transcriptómica intratumoral e identificar as subpopulações celulares responsáveis pela resistência terapêutica e pela disseminação metastática (19,44).

3.5.5 Interpretação clínica dos resultados

A interpretação clínica das CTC no PDAC baseia-se no seu estatuto de entidades celulares completas, consideradas os vetores da disseminação metastática (19,35). Ao contrário do ctDNA ou dos exossomas, as CTC conservam a integridade da informação genómica, transcriptómica e proteómica da célula de origem, permitindo uma análise funcional da viabilidade tumoral (19,34).

Do ponto de vista diagnóstico, o principal interesse das CTC reside na sua excecional especificidade, uma vez que estão virtualmente ausentes em indivíduos saudáveis (35). A deteção de CTC foi descrita em 33% a 40% dos doentes portadores de PanIN ou IPMN, sugerindo que a disseminação hematogénica é um acontecimento muito precoce, ocorrendo antes mesmo da formação de uma massa tumoral visível por imagiologia (19,32,35). Embora a sua raridade limite a sensibilidade diagnóstica quando utilizadas isoladamente (cerca de 75% nos estadios localizados), a sua integração em abordagens multi-analíticas revela um desempenho particularmente elevado (19,32). A associação das CTC com o CA19-9 ou com exossomas GPC1(+) permite atingir níveis de precisão diagnóstica e de sensibilidade até 97,5%, podendo mesmo alcançar 100% em algumas coortes prospetivas (19,34,35).

A interpretação prognóstica baseia-se principalmente na quantificação das CTC. Uma contagem elevada, geralmente definida por um limiar igual ou superior a 3 CTC por 4 mL de sangue, constitui um fator independente de mau prognóstico, associado a uma redução da sobrevivência global (OS) e da sobrevivência livre

de progressão (PFS). Para além da simples quantificação, a caracterização fenotípica das CTC fornece informações importantes sobre a agressividade da doença (19,35). A presença de marcadores associados à EMT, como a vimentina ou a N-caderina, permite identificar subpopulações celulares com maior potencial invasivo e metastático (11,19,36).

3.5.6 Limitações atuais e constrangimentos clínicos

Apesar do seu potencial, as CTC enfrentam vários obstáculos à sua implementação na rotina hospitalar. A sua extrema raridade e fragilidade exigem protocolos pré-analíticos complexos e dispendiosos (19,32,34,35). O fenómeno de EMT, ao induzir a perda dos marcadores epiteliais clássicos, gera uma heterogeneidade fenotípica que torna métodos de captura padronizados, como o CellSearch, insuficientemente sensíveis para o PDAC (19,36,44). Além disso, a ausência de protocolos internacionais padronizado para o isolamento e a caracterização das CTC limita a reprodutibilidade dos resultados entre diferentes centros de investigação (19,44).

As células tumorais circulantes representam uma componente de valor biológico inestimável no contexto do « circuloma » pancreático (34,44). Embora a sua raridade constitua uma limitação para a sua utilização como teste de rastreio universal, estas células assumem um papel importante em abordagens multi-analíticas de elevada precisão (11,36,44). O futuro passa pela combinação das características morfológicas e genéticas das CTC com as mutações detetadas no ctDNA e com biomarcadores proteicos urinários, como o score PancRISK, integrados em modelos de decisão baseados em inteligência artificial, com o objetivo de identificar os doentes elegíveis para uma abordagem cirúrgica precoce (19,31,34,44).

3.6 Plaquetas educadas pelo tumor

3.6.1 Origem biológica e definição

As plaquetas são pequenos fragmentos celulares anucleados, com um diâmetro de aproximadamente 2 a 4 μm , derivados dos megacariócitos da medula óssea e que circulam no compartimento vascular durante cerca de 7 a 10 dias (32,41,62,63). Embora a sua função fisiológica primária esteja relacionada com a hemostase e a trombose, são atualmente reconhecidas como intervenientes

dinâmicos na biologia tumoral devido à sua complexa comunicação bidirecional com a neoplasia (32,41,63). O conceito de TEP, refere-se a plaquetas cuja composição molecular foi alterada após uma interação direta ou indireta com células malignas ou com o microambiente tumoral (32,41,62). Este processo de educação biológica ocorre através de dois mecanismos principais: a sequestração ativa de biomoléculas libertadas pelo tumor, como mRNA, proteínas ou VE, e a modificação específica do seu próprio transcriptoma e do splicing do pré-RNA mensageiro, em resposta a sinais provenientes do ambiente tumoral (32,63,64).

3.6.2 Papel no organismo e na fisiopatologia tumoral

No PDAC, as plaquetas participam em todas as fases da doença, começando pela proteção das CTC contra as forças de cisalhamento mecânico e a vigilância do sistema imunitário (32,41,63). Através do mecanismo de agregação plaquetária induzida por células tumorais, formam um escudo físico em torno das células tumorais circulantes, protegendo-as das forças de cisalhamento da circulação sanguínea e da vigilância imunológica exercida pelas células *Natural Killer* e pelos linfócitos T (32,63,64). Além disso, as plaquetas ativadas libertam numerosos fatores de crescimento e citocinas pró-angiogénicas armazenados nos seus grânulos, incluindo o VEGF, o PDGF e o TGF- β , que promovem a neovascularização tumoral e a formação de nichos pré-metastáticos (41,62,63). Estas interações favorecem igualmente a EMT e contribuem para um estado de imunossupressão sistémica, facilitando a invasão tecidular e a disseminação metastática (41,62–64).

3.6.3 Interesse específico no cancro do pâncreas e na deteção precoce

O interesse das TEP como ferramenta de biópsia líquida baseia-se na sua elevada abundância na circulação e na estabilidade da sua carga molecular, naturalmente protegida da degradação por nucleases graças à membrana plaquetária (32,41,63). Funcionando como verdadeiros « biossensores » circulantes, as TEP são capazes de captar sinais moleculares muito precoces, refletindo a presença de uma neoplasia pancreática antes de esta ser detetável pelos métodos imagiológicos convencionais (32,41). A análise do transcriptoma plaquetário através de NGS permitiu distinguir doentes oncológicos de indivíduos

saudáveis com uma precisão diagnóstica de 96% (32,41,62,63). Especificamente no PDAC, foram identificadas assinaturas de mRNA, como a de *RSL24D1*, fortemente associadas aos estádios iniciais da doença. Além disso, as TEP apresentam uma importante utilidade preditiva ao permitirem identificar precocemente o estado mutacional do oncogene *KRAS*, informação fundamental para a estratificação terapêutica dos doentes (32,41).

3.6.4 Métodos de análise disponíveis

A exploração metodológica das TEP combina abordagens hematológicas convencionais com tecnologias ómicas de elevada dimensão (41,42,62). Na prática clínica, a avaliação pode iniciar-se pela análise de índices automatizados, como o volume plaquetário médio, cujas variações refletem o estado de ativação das plaquetas em função do estágio da doença (32). Contudo, uma caracterização mais aprofundada exige um protocolo rigoroso de isolamento das plaquetas a partir de sangue total através de centrifugação diferencial, com o objetivo de eliminar qualquer contaminação por leucócitos ou eritrócitos (41,42,63,64). Após a extração do RNA, a realização de sequenciação de RNA permite obter perfis transcriptómicos complexos compostos por múltiplos genes, cuja interpretação requer o recurso a algoritmos de aprendizagem automática e inteligência artificial (32,41,42,62). Estas ferramentas bioinformáticas são essenciais para identificar padrões diagnósticos relevantes a partir da enorme quantidade de dados transcriptómicos produzidos (41,42,62).

3.6.5 Interpretação clínica dos resultados

Do ponto de vista clínico, a utilização de rácios plaquetários permite melhorar significativamente o diagnóstico diferencial e a avaliação prognóstica. O rácio entre o volume plaquetário médio e a contagem plaquetária revelou-se particularmente útil para distinguir um PDAC de uma pancreatite crónica pseudotumoral, sobretudo quando associado ao marcador CA19-9 (32,41). Em termos prognósticos, um rácio plaquetas/linfócitos elevado no período pré-operatório é reconhecido como um fator independente associado a uma menor sobrevivência global (32,42,63). No período pós-operatório, a evolução do rácio de contagem plaquetária pode ser utilizada como indicador do sucesso da

resseção cirúrgica e permitir a deteção precoce de uma eventual recidiva antes da sua confirmação imagiológica (32,41).

3.6.6 Limitações atuais, constrangimentos técnicos, biológicos e clínicos

Apesar do seu potencial, vários desafios continuam a limitar a implementação generalizada das TEP na prática clínica. Entre os principais obstáculos encontra-se a ausência de protocolos pré-analíticos totalmente padronizados. Variações nos procedimentos de colheita ou centrifugação podem induzir uma ativação plaquetária artificial, alterando significativamente os resultados das análises transcriptómicas (32,41,63). Do ponto de vista biológico, a especificidade das TEP é limitada pela sua elevada sensibilidade a estímulos sistémicos. Diversas comorbilidades frequentes, como a diabetes mellitus ou a inflamação crónica, podem modificar o perfil de RNA plaquetário e mascarar o sinal associado à presença tumoral (32,41,42). Além disso, o custo elevado das tecnologias de NGS e a complexidade dos pipelines bioinformáticos restringem atualmente a sua utilização a centros especializados de investigação e medicina de precisão (41,42).

As plaquetas educadas pelo tumor constituem uma fonte biológica dinâmica de enorme valor para a biópsia líquida multidimensional. Embora ainda não possam ser utilizadas isoladamente para fins de rastreio, o seu futuro passa pela integração das assinaturas transcriptómicas plaquetárias com as mutações do ctDNA e com biomarcadores proteicos circulantes (32,36,41). A utilização de algoritmos de inteligência artificial para integrar estes diferentes componentes do « circuloma » representa atualmente uma das abordagens mais promissoras para alcançar os níveis de especificidade necessários a uma vigilância eficaz e personalizada das populações de alto risco (32,41,42).

3.7 Inteligência Artificial e abordagens « Omics » : rumo a uma integração multidimensional dos biomarcadores

As limitações observadas para cada um dos biomarcadores estudados individualmente, incluindo o ctDNA, os exossomas, os ncRNA, as proteínas circulantes, as CTC e as TEP, conduziram ao surgimento de abordagens integrativas que visam combinar múltiplas fontes de informação biológica. Esta evolução favoreceu o desenvolvimento das tecnologias « omics » e da

inteligência artificial, capazes de explorar simultaneamente um elevado número de variáveis moleculares com o objetivo de melhorar a deteção precoce do PDAC.

3.7.1 Da informação biológica isolada à assinatura integrada

O diagnóstico precoce do PDAC tem sido historicamente limitado pela insuficiência dos biomarcadores isolados. Com o CA19-9, único marcador utilizado rotineiramente na prática clínica (41,49–51). Perante esta limitação, o paradigma atual evolui para o conceito de « circuloma », definido como a análise integrada de todos os componentes tumorais libertados nos biofluidos (células, ácidos nucleicos, proteínas, metabolitos e vesículas) (34). As diferentes fontes concordam que a combinação de múltiplos analitos permite compensar as limitações intrínsecas de cada biomarcador considerado isoladamente (34,36,65). Por exemplo, a integração de mutações do ctDNA com marcadores proteicos aumenta significativamente a precisão diagnóstica em comparação com a deteção baseada apenas em alterações genómicas, cuja sensibilidade permanece reduzida nos estádios iniciais da doença (19,44). Esta transição para assinaturas compostas multidimensionais marca a entrada da biópsia líquida na era da medicina de precisão (34).

3.7.2 As abordagens « Omics » aplicadas à biópsia líquida

A abordagem « omics » representa uma mudança de escala metodológica, passando do estudo de um único gene ou proteína para a caracterização global de um sistema biológico (11,41). No contexto do PDAC, esta abordagem divide-se em várias camadas complementares: a genómica e a epigenómica, que exploram as mutações somáticas (como as de *KRAS*) e os perfis de metilação do cfDNA; a transcriptómica, que inclui assinaturas de microRNA e de lncRNA; bem como a proteómica e a metabolómica (34,36,41). A epigenómica, em particular a análise da hipermetilação dos promotores de genes supressores tumorais (*ADAMTS1*, *BNC1*, *BMP3*), revela-se especialmente promissora, uma vez que oferece uma especificidade tecidular superior à das mutações genéticas, que podem ser partilhadas por diferentes tipos de tumores (31,37). Paralelamente, a metabolómica permite identificar padrões de desregulação

sistémica induzidos pelo tumor, como alterações nos níveis de aminoácidos ou lípidos, enriquecendo o perfil biológico do doente (36,41,44).

3.7.3 Contributo do *Machine Learning* na seleção de biomarcadores

O volume e a complexidade dos dados gerados pelas abordagens ómicas (*Big Data*) exigem a utilização de algoritmos de aprendizagem automática (*Machine Learning* - ML) para extrair padrões diagnósticos relevantes (41,58). O ML desempenha um papel crucial na fase de seleção de características (*feature selection*), permitindo identificar os biomarcadores mais discriminativos entre milhares de candidatos (55,58). Um estudo multicêntrico demonstrou que, através da aplicação de algoritmos rigorosos de seleção em onze bases de dados, foi possível identificar uma assinatura reduzida composta por três miRNA (hsa-miR-1246, hsa-miR-205-5p e hsa-miR-191-5p), capaz de distinguir o PDAC da pancreatite com uma precisão de 91,5% (66). Da mesma forma, modelos baseados em *Random Forest* ou em redes neuronais convolucionais foram treinados para validar assinaturas compostas por 20 miRNA em grandes coortes de mais de 700 doentes, alcançando valores de AUC entre 0,78 e 0,87 (58). Estas ferramentas computacionais permitem transformar grandes volumes de dados ómicos em modelos preditivos robustos (41,58).

3.7.4 IA explicável e interpretação dos modelos

Um dos principais obstáculos à adoção clínica da inteligência artificial reside na sua natureza de « caixa negra », em que o processo de decisão do algoritmo permanece pouco transparente (41,58). Para garantir a confiança dos profissionais de saúde e a segurança das decisões clínicas, surgiu o conceito de IA explicável (*explainable artificial intelligence* - XAI), que integra ferramentas como o algoritmo SHAP (*Shapley additive explanations*). O SHAP permite quantificar de forma precisa a importância de cada biomarcador na predição final (58). No desenvolvimento de painéis de miRNA, a análise SHAP demonstrou que as decisões dos modelos se baseavam em moléculas biologicamente coerentes, envolvidas em vias de sinalização oncogénicas bem estabelecidas, como as vias MAPK ou PI3K-Akt. Esta transparência é fundamental para assegurar que o desempenho da IA não resulta de artefactos estatísticos, mas

sim de fundamentos biológicos plausíveis, favorecendo a aceitação clínica e regulamentar dos futuros testes diagnósticos (41,58).

3.7.5 Limitações metodológicas e clínicas das abordagens IA/Omics

Apesar do seu potencial transformador, estas abordagens multidimensionais enfrentam desafios significativos. Do ponto de vista técnico, a heterogeneidade dos algoritmos, dos protocolos pré-analíticos e das plataformas de análise (NGS vs RT-qPCR) dificulta a padronização internacional (41,44,58). O risco de sobreajuste (*overfitting*), no qual um modelo apresenta excelente desempenho nos dados de treino mas falha na generalização para uma coorte externa, continua a ser uma preocupação constante (41,58). Do ponto de vista biológico, o ruído de fundo gerado pelos tecidos saudáveis ou por comorbilidades sistêmicas (diabetes, icterícia, inflamação crónica) pode alterar as assinaturas ómicas e reduzir a especificidade dos testes (34,36,41). Além disso, a raridade do ctDNA ou das CTC nos estádios ultra-precoces impõe limiares de deteção extremamente baixos, tornando as tecnologias atuais dispendiosas e difíceis de implementar em larga escala fora de centros especializados (31,41).

Em conclusão, a inteligência artificial e as abordagens ómicas representam uma evolução importante da biópsia líquida no cancro do pâncreas, marcando a transição de uma lógica baseada num biomarcador isolado para uma abordagem assente numa assinatura integrada e multimodal (11,34,41). O combinar dados heterogêneos provenientes do circuloma com o poder analítico do ML, estas abordagens demonstram um potencial sem precedentes para identificar a doença numa fase ainda curável (11,31,44). Contudo, a sua integração na prática hospitalar continua dependente de uma validação rigorosa em grandes ensaios prospetivos, da padronização dos processos analíticos e do desenvolvimento de ferramentas de IA interpretáveis que garantam transparência na tomada de decisão clínica (11,36,41,58).

Para sintetizar os principais elementos apresentados nesta secção, a Tabela 1 resume as principais características dos biomarcadores estudados no âmbito da biópsia líquida aplicada ao cancro do pâncreas.

Tabela 1 Principais biomarcadores da biópsia líquida investigados para a deteção precoce do adenocarcinoma ductal pancreático: métodos de análise, vantagens, limitações e aplicações clínicas

Biomarcador	Método de análise	Vantagens	Limitações	Aplicação clínica	Referências
DNA tumoral circulante (ctDNA)	ddPCR, NGS (com UMI)	Reflete a heterogeneidade clonal tumoral e permite a deteção precoce de mutações <i>KRAS</i> (>90 % dos casos de PDAC).	Baixa concentração (frequentemente <0,1 % do ADN livre circulante); semivida muito curta (15 min a 2,5 h).	Deteção precoce e monitorização da doença residual mínima (MRD).	(19,33,36,38,61)
Perfis de metilação do DNA (<i>BNC1</i> , <i>ADAMTS1</i>)	Sequenciação por tratamento com bissulfito (WGBS, RRBS), TELQAS	Sensibilidade e especificidade superiores a 90 % nos estádios precoces; assinatura específica do tecido de origem.	Elevada complexidade bioinformática; custo elevado da sequenciação genómica completa.	Diagnóstico diferencial e deteção precoce (estádios I/II).	(19,30,31,36,37)
Exossomas / Vesículas extracelulares (GPC1)	Ultracentrifugação, SEC, MALDI-TOF MS, ICP-MS e biochip nanoparticulad	Elevada estabilidade biológica; reflete o estado das células tumorais viáveis.	Contaminação por lipoproteínas; ausência de protocolos de isolamento padronizados.	Rastreio e avaliação da carga tumoral; biomarcador preditivo de resposta terapêutica (radioresistência).	(19,46,49–52)
MicroRNA (ex.: rácio miR-95-3p/miR-26b-5p)	RT-qPCR, NGS (NovaSeq), FirePlex™	Elevada estabilidade nos fluidos biológicos; os rácios compensam as variações interindividuais e pré-analíticas.	Especificidade de órgão limitada; variabilidade associada ao sexo e a comorbilidades (diabetes).	Diagnóstico diferencial (cancro vs pancreatite crónica).	(19,56,57,59,66,67)
Células tumorais circulantes (CTC)	CellSearch (EpCAM), Filtração por tamanho (CellSieve) e microfluídica (SMART-CHIP)	Elevada especificidade; permitem uma análise funcional e genómica abrangente.	Raridade extrema (1 célula/mL); perda de marcadores epiteliais durante a transição EMT.	Valor prognóstico (sobrevivência global) e deteção precoce da recidiva antes da imagiologia.	(19,35,36,44,65)
Plaquetas educadas pelo tumor (TEP)	Sequenciação de ARN e algoritmos de Machine Learning.	Elevada abundância; proteção do conteúdo molecular pela membrana plaquetária.	Sensibilidade a estímulos sistémicos (inflamação); risco de ativação artificial durante a colheita.	Biossensores para deteção precoce e identificação do estado mutacional de <i>KRAS</i> .	(32,41,62,63)
Proteínas urinárias (score PancRISK: LYVE-1, REG1B, TFF1)	ELISA, ECLIA, Espectrometria de massa	Colheita totalmente não invasiva; sinal detetável até um ano antes do diagnóstico.	Influência de comorbilidades (insuficiência renal); ruído biológico de fundo associado a proteínas abundantes.	Rastreio de populações de alto risco.	(30,36,41,43)

4 Integração clínica dos biomarcadores e papel do farmacêutico

4.1 Da investigação translacional à validação clínica

A transição dos biomarcadores circulantes da fase de investigação fundamental para uma aplicação na prática clínica de rotina constitui um desafio importante, exigindo uma demonstração rigorosa do seu valor acrescentado em comparação com os atuais ferramentas diagnósticas atuais (68,69). Embora os avanços tecnológicos permitam atualmente detetar sinais moleculares ténues, a integração da biópsia líquida na abordagem do PDAC continua dependente de uma validação metodológica em várias etapas (69–71).

4.1.1 Do biomarcador experimental ao teste clínico

Um biomarcador identificado em laboratório não pode ser utilizado na prática médica sem uma validação analítica e clínica aprofundada (69,71). A validação analítica deve, em primeiro lugar, garantir a precisão, a reprodutibilidade interlaboratorial e a robustez da medição, nomeadamente através da definição rigorosa dos limites de deteção (LoD) e do limite do branco (LoB) para analitos frequentemente presentes em quantidades ínfimas no plasma (69,71–73). Uma vez estabelecida esta fiabilidade técnica, a validação clínica deve demonstrar, através de estudos de desempenho, a capacidade do teste para identificar corretamente a patologia (sensibilidade diagnóstica) e excluir indivíduos saudáveis ou portadores de patologias benignas (especificidade diagnóstica) (71,73). Por fim, a utilidade clínica constitui o critério último: o teste deve demonstrar que proporciona um benefício real ao doente, quer permitindo um diagnóstico mais precoce, quer otimizando a escolha terapêutica de forma a melhorar a sobrevivência global (68,73–75). Até à data, nenhum teste usando a biópsia líquida atingiu ainda este nível de evidência para o rastreio sistemático do cancro do pâncreas (68,70).

4.1.2 Validação em populações de risco

A avaliação da biópsia líquida deve concentrar-se obrigatoriamente em populações-alvo nas quais a prevalência da doença é mais elevada, de forma a otimizar o valor preditivo positivo do teste (76,77). Os grupos prioritários incluem indivíduos com predisposição genética, nomeadamente portadores de mutações

germinativas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CDKN2A* ou *ATM*, bem como doentes pertencentes a famílias com cancro pancreático familiar (76,78,79). A diabetes de início recente em indivíduos com mais de 50 anos constitui igualmente uma janela de oportunidade crucial, uma vez que este grupo apresenta um risco de diagnóstico de cancro do pâncreas seis a oito vezes superior ao da população geral nos três anos subsequentes ao diagnóstico da diabetes (76,80).

Nesta perspetiva, o projeto nacional francês PANLIPSY representa o atual esforço de investigação translacional ao procurar validar uma assinatura biológica combinada (6,68). Este estudo prospetivo multicêntrico utiliza a inteligência artificial para integrar uma ampla variedade de biomarcadores (CTC, ctDNA, VE, nucleossomas, proteínas e microbiota) provenientes de doentes em fases precoces da doença e de indivíduos com lesões benignas (6). O objetivo é demonstrar que uma abordagem multi-analítica pode superar o desempenho do CA19-9 e das técnicas de imagiologia convencionais no diagnóstico de precisão de tumores ressecáveis (6,81).

4.1.3 Limitações atuais da translação clínica

Apesar do seu potencial revolucionário, a implementação clínica da biópsia líquida enfrenta barreiras biológicas e epidemiológicas substanciais (70). A principal dificuldade reside na reduzida carga tumoral das lesões precoces (PanIN, IPMN), que libertam quantidades muito limitadas de material genético para a circulação sistémica, frequentemente abaixo dos limiares atuais de deteção (70,77). Além disso, a anatomia do pâncreas, com uma drenagem venosa portal que passa inicialmente pelo fígado, pode conduzir a uma filtração hepática dos biomarcadores antes de estes atingirem a circulação periférica (70). Do ponto de vista epidemiológico, a baixa incidência do cancro do pâncreas na população geral torna o rastreio em massa ineficaz e potencialmente problemático: é necessária uma especificidade superior a 99% para evitar um número excessivo de falsos positivos, que conduziriam à realização de exames invasivos e geradores de ansiedade sem benefício real para os doentes (77,78). Por último, a integração clínica exige a definição de um percurso assistencial claro após um resultado positivo, incluindo protocolos de imagiologia especializados e uma abordagem multidisciplinar, de forma a evitar o sobrediagnóstico de lesões com baixo potencial de malignidade (70,79). O futuro

desta tecnologia reside, assim, na sua utilização complementar, e não substitutiva, relativamente aos meios de diagnóstico atualmente disponíveis, em contextos clínicos bem definidos (70,77).

4.2 Padronização, qualidade e enquadramento regulamentar dos testes de biópsia líquida

A fiabilidade dos testes de biópsia líquida em oncologia pancreática assenta num controlo rigoroso de toda a cadeia de produção do resultado biológico. A ausência de protocolos padronizados constitui atualmente um dos principais obstáculos à sua utilização na prática clínica de rotina, uma vez que limita a reprodutibilidade das medições e a comparabilidade dos dados entre diferentes centros de saúde (68–70).

4.2.1 Padronização pré-analítica

A fase pré-analítica é considerada a etapa mais crítica, uma vez que afeta diretamente a integridade e a quantidade de material biológico recuperado. O plasma é sistematicamente preferido ao soro, porque a coagulação sanguínea induz a lise dos leucócitos, libertando uma quantidade significativa de DNA genómico que dilui o sinal do ctDNA. A escolha dos tubos de colheita é determinante : embora os tubos clássicos com EDTA apresentem vantagens económicas, exigem o processamento da amostra num prazo de duas a quatro horas para evitar qualquer contaminação por DNA constitucional. Em contrapartida, a utilização de tubos estabilizadores especializados permite preservar o perfil molecular até catorze dias, facilitando assim a logística do transporte. A padronização estende-se igualmente aos protocolos de centrifugação, sendo recomendado um método em duas etapas para separar eficazmente o plasma dos componentes celulares e dos detritos residuais. Por fim, o armazenamento imediato a -80 °C após a centrifugação é indispensável para prevenir a degradação dos ácidos nucleicos, evitando simultaneamente os ciclos de congelação-descongelação que comprometem a qualidade dos biomarcadores, em particular dos microRNA, que são muito sensíveis à hemólise (68–70,74).

4.2.2 Padronização analítica e interpretação dos resultados

Do ponto de vista analítico, a variabilidade começa logo na etapa de extração, na qual o desempenho dos kits comerciais pode diferir significativamente em termos de rendimento e pureza. Os métodos de deteção devem apresentar uma elevada sensibilidade, como a PCR digital em gotículas (ddPCR) para a identificação de mutações hotspot ou o NGS para painéis multigénicos, de modo a captar frações tumorais frequentemente inferiores a 0,1% nos estádios precoces do cancro do pâncreas. A validação dos testes exige a definição rigorosa de parâmetros de desempenho, como o LoD, o LoB para quantificar o ruído de fundo, e o limite de quantificação (LoQ). A utilização de materiais de referência certificados e a participação em programas de avaliação externa da qualidade (EQA) são indispensáveis para garantir a reprodutibilidade interlaboratorial. O relatório biológico deve igualmente ser padronizado, integrando não apenas a frequência alélica das variantes, mas também uma interpretação clínica clara que distinga as mutações tumorais das variantes associadas à CHIP ou de origem germinativa (69,71,74,82).

4.2.3 Qualidade, sociedades científicas e enquadramento regulamentar

A padronização das práticas é promovida ativamente por organismos especializados, como a European Liquid Biopsy Society (ELBS) e a International Society of Liquid Biopsy (ISLB), que elaboram recomendações baseadas em consensos de especialistas para assegurar uma implementação clínica segura (69,71,82). Na Europa, este processo enquadra-se no Regulamento (UE) 2017/746 relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro* (IVDR), que impõe requisitos reforçados em matéria de demonstração de desempenho, segurança e rastreabilidade, incluindo para os testes desenvolvidos internamente pelos laboratórios (6,69,73). A conformidade com a norma ISO 15189:2022 reforça esta garantia da qualidade, certificando a competência técnica dos laboratórios de patologia clínica e análises clínicas (69,71,72). Este enquadramento regulamentar e normativo constitui uma condição indispensável para transformar a biópsia líquida de uma ferramenta de investigação translacional num dispositivo médico fiável, capaz de orientar decisões terapêuticas no contexto da oncologia de precisão (69,70,73).

4.3 O papel do farmacêutico na integração clínica da biópsia líquida

O farmacêutico, pela sua formação científica multidisciplinar e pela sua posição central no sistema de saúde, ocupa um papel estratégico na integração clínica da biópsia líquida e da medicina de precisão. A sua competência permite assegurar e otimizar a utilização de ferramentas de diagnóstico inovadoras num percurso assistencial cada vez mais complexo.

4.3.1 O farmacêutico e a interpretação dos testes diagnósticos inovadores

Graças aos seus conhecimentos aprofundados em biologia molecular e farmacologia, o farmacêutico está apto a compreender os princípios biológicos complexos da biópsia líquida, como a análise do DNA tumoral circulante ou das vesículas extracelulares. Desempenha um papel pedagógico fundamental junto do doente, atuando como um verdadeiro « tradutor » da informação genómica, capaz de explicar o significado funcional das mutações detetadas, como as alterações da via MAPK associadas a *KRAS* ou *BRAF* (83). Para além da divulgação e explicação da informação, o farmacêutico contribui para a compreensão das limitações técnicas dos testes, nomeadamente dos riscos de falsos negativos inerentes à reduzida fração tumoral presente nos estádios precoces do cancro do pâncreas (68,74). Ao assegurar uma monitorização científica e regulada contínua, acompanha a evolução dos painéis de sequenciação e das recomendações emitidas por sociedades científicas como a ELBS, garantindo assim que a inovação seja integrada de forma racional e ética (74,82).

4.3.2 Identificação, prevenção e orientação dos doentes em risco

O farmacêutico comunitário encontra-se numa posição privilegiada para identificar sinais de alerta clínicos que justifiquem uma avaliação médica rápida. Um dos principais indicadores é o aparecimento de diabetes de início recente em indivíduos com mais de 50 anos sem antecedentes de perturbações metabólicas, uma vez que este grupo apresenta um risco de cancro do pâncreas seis a oito vezes superior ao da população geral nos três anos subsequentes ao diagnóstico da diabetes. O farmacêutico deve igualmente estar atento a sintomas inespecíficos, mas sugestivos, como perda de peso inexplicada, dor abdominal persistente ou aparecimento de icterícia. Através da avaliação de

fatores de risco modificáveis, como o tabagismo ou a obesidade, participa ativamente na prevenção primária e pode encaminhar indivíduos pertencentes a famílias de risco para consultas especializadas de gastroenterologia ou oncogenética. É fundamental salientar que, embora o farmacêutico nunca estabeleça o diagnóstico de cancro, a sua intervenção ao nível da triagem e da orientação do doente é essencial para favorecer um diagnóstico precoce numa fase em que o tumor ainda pode ser ressecável (68,69,76,80).

5 Conclusão

No termo deste estudo, verifica-se que o PDAC representa um dos desafios mais preocupantes da oncologia contemporânea, caracterizado por uma elevada malignidade e um número, demasiado, elevado de diagnósticos tardios. Este trabalho permitiu analisar de forma estruturada os avanços recentes da biópsia líquida, avaliando o seu potencial como ferramenta disruptiva para transformar a abordagem desta patologia.

A síntese dos biomarcadores mais promissores para um futuro rastreio evidencia a emergência do conceito de « circuloma », que ultrapassa a procura de um marcador único para se orientar para assinaturas moleculares integradas. Entre estes analitos, os perfis de metilação do DNA, nomeadamente dos genes *BNC1* e *ADAMTS1*, destacam-se pela sua capacidade de detetar a doença em estádios precoces com elevada especificidade. Paralelamente, a análise das vesículas extracelulares, impulsionada pela deteção da GPC1 e de assinaturas de microRNA, como o rácio miR-95-3p/miR-26b-5p, oferece perspetivas relevantes para o diagnóstico diferencial. Por fim, o score proteómico urinário PancRISK, que inclui as proteínas LYVE-1, REG1B e TFF1, afirma-se como uma inovação particularmente pertinente devido ao seu carácter totalmente não invasivo e à sua capacidade de sinalizar a presença de um tumor até um ano antes do diagnóstico clínico.

A importância da validação clínica em larga escala constitui o elemento central para transformar efetivamente o tratamento e resolução do cancro do pâncreas. Se a sobrevivência aos cinco anos diminui drasticamente no estágio metastático, pode ultrapassar os 80% quando o tumor é ressecado no estágio I. Para atingir este objetivo, projetos de grande dimensão, como o estudo francês PANLIPSY, são indispensáveis para demonstrar a utilidade clínica das assinaturas multianalíticas e validar a sua integração nas recomendações de prática clínica.

Uma síntese crítica do conhecimento atual permite distinguir os progressos alcançados dos desafios que persistem. Por um lado, tecnologias avançadas como a ddPCR e o NGS permitem atualmente captar sinais tumorais mínimos e monitorizar a doença residual mínima muito antes da sua deteção pela imagiologia convencional. Por outro lado, subsistem diversos obstáculos,

nomeadamente a reduzida libertação de material tumoral por alguns doentes em estádios ultra-precoces, designados por *low shedders*, bem como o ruído biológico de fundo gerado pela CHIP. Além disso, a ausência de SOP à escala internacional e o elevado custo das plataformas analíticas continuam a limitar a generalização destes testes na prática hospitalar.

As perspetivas futuras orientam-se para um rastreio direcionado das populações de risco, em detrimento de um rastreio de massa considerado ineficaz. O esforço de vigilância deverá concentrar-se nos indivíduos com predisposição genética hereditária, nomeadamente portadores de mutações nos genes *BRCA1/2* ou *CDKN2A*, bem como nos doentes com lesões quísticas do tipo IPMN. Uma importante janela de oportunidade reside igualmente no acompanhamento de indivíduos com diabetes de início recente após os 50 anos de idade, uma vez que este grupo apresenta um risco significativamente superior de desenvolver PDAC nos anos subsequentes ao diagnóstico metabólico.

A futura integração clínica da biópsia líquida dependerá do desenvolvimento de modelos de inteligência artificial explicável (XAI), capazes de integrar os dados do circuloma com parâmetros clínicos e imagiológicos, de modo a estabelecer um score de risco personalizado e transparente.

Neste ecossistema em transformação, a farmácia clínica e a investigação farmacêutica ocupam uma posição estratégica. O farmacêutico, graças à sua competência em biologia molecular e à sua proximidade com o doente, assume-se como um ator central na identificação de sinais de alerta e na orientação para circuitos de cuidados especializados. No contexto dos *Molecular Tumor Boards*, o farmacêutico clínico contribui para a interpretação dos perfis genómicos com o objetivo de otimizar as terapêuticas dirigidas, enquanto a investigação farmacêutica continua a impulsionar a inovação rumo ao desenvolvimento de testes multibiomarcadores mais acessíveis. Em suma, a revolução da biópsia líquida traz a esperança de transformar uma patologia historicamente fatal numa doença detetável e potencialmente curável, colocando a biologia de precisão no centro do futuro exercício farmacêutico comunitário e hospitalar.

6 Bibliografia

1. Zhao J, Wang J, Gu Y, Huang X, Wang L. Diagnostic methods for pancreatic cancer and their clinical applications (Review). *Oncol Lett*. 2025 Jul 1;30(1). doi:10.3892/OL.2025.15116
2. Hu JX, Lin YY, Zhao CF, Chen WB, Liu QC, Li QW, et al. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol*. 2021 Jul 21;27(27):4298–321. doi:10.3748/WJG.V27.I27.4298
3. Sun J, Awad MA, Hwang J, Villano AM. Molecular Biomarkers for the Diagnosis and Prognostication of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Pers Med*. 2025 Jun 1;15(6). doi:10.3390/JPM15060236
4. Pavlidis ET, Galanis IN, Pavlidis TE. Updates in the diagnosis and management of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *World J Clin Oncol*. 2025 Jun 24;16(6). doi:10.5306/WJCO.V16.I6.105601
5. Stoffel EM, Brand RE, Goggins M. Pancreatic Cancer: Changing Epidemiology and New Approaches to Risk Assessment, Early Detection, and Prevention. *Gastroenterology*. 2023 Apr 1;164(5):752–65. doi:10.1053/J.GASTRO.2023.02.012
6. Bardol T, Dujon AM, Taly V, Dunyach-Remy C, Lavigne JP, Costa-Silva B, et al. Early detection of pancreatic cancer by liquid biopsy “PANLIPSY”: a french nation-wide study project. *BMC Cancer*. 2024 Dec 1;24(1). doi:10.1186/S12885-024-12463-8
7. Conroy T, Pfeiffer P, Vilgrain V, Lamarca A, Seufferlein T, O'Reilly EM, et al. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2023 Nov 1;34(11):987–1002. doi:10.1016/J.ANNONC.2023.08.009
8. Zhou JD, Shen HZ. Advances in pancreatic cancer epigenetics: From the mechanism to the clinic. *World J Gastrointest Oncol*. 2025;17(7). doi:10.4251/WJGO.V17.I7.106238

9. Hu JX, Lin YY, Zhao CF, Chen WB, Liu QC, Li QW, et al. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol*. 2021 Jul 21;27(27):4298–321. doi:10.3748/WJG.V27.I27.4298
10. Zhou JD, Shen HZ. Advances in pancreatic cancer epigenetics: From the mechanism to the clinic. *World J Gastrointest Oncol*. 2025;17(7). doi:10.4251/WJGO.V17.I7.106238
11. Jamal MH, Porel P, Aran KR. Emerging biomarkers for pancreatic cancer: from early detection to personalized therapy. *Clinical and Translational Oncology*. 2025. doi:10.1007/S12094-025-03947-5
12. Gocht A, Schumacher U. Description and nomenclature of organ subdivisions in the Terminologia Anatomica and in anatomical education: Comparison with cancer classifications. *Clinical Anatomy*. 2023 Mar 1;36(2):315–9. doi:10.1002/CA.23992
13. Truong E, Pandol S, Jeon C. Uniting Epidemiology and Experimental Models: Pancreatic Steatosis and Pancreatic Cancer. *EBioMedicine*. 2022 May 1;79. doi:10.1016/J.EBIOM.2022.103996
14. Dai S, Zhang W, Gao H, Wang Y, Xu J, Xu X, et al. Recent advances in the management of pancreatic neuroendocrine tumors: From diagnosis, treatment to biology. *Cancer Lett*. 2026 Mar 31;641. doi:10.1016/J.CANLET.2026.218285
15. Blackford AL, Canto MI, Dbouk M, Hruban RH, Katona BW, Chak A, et al. Pancreatic Cancer Surveillance and Survival of High-Risk Individuals. *JAMA Oncol*. 2024 Aug 15;10(8):1087–96. doi:10.1001/JAMAONCOL.2024.1930
16. Raufi AG, May MS, Hadfield MJ, Seyhan AA, El-Deiry WS. Advances in Liquid Biopsy Technology and Implications for Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 1;24(4). doi:10.3390/ijms24044238
17. Boukvala M, Westphalen CB, Probst V. Liquid biopsy into the clinics: Current evidence and future perspectives. *The Journal of Liquid Biopsy*. 2024 Jun;4:100146. doi:10.1016/J.JLB.2024.100146

18. Zhang W, Xia W, Lv Z, Ni C, Xin Y, Yang L. Liquid Biopsy for Cancer: Circulating Tumor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes? *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017 May 4;41(2):755–68. doi:10.1159/000458736
19. Wang K, Wang X, Pan Q, Zhao B. Liquid biopsy techniques and pancreatic cancer: diagnosis, monitoring, and evaluation. *Mol Cancer*. 2023 Dec 1;22(1). doi:10.1186/s12943-023-01870-3
20. Adebayo Bamodu O, Chung CC, Pisanic li TR. Harnessing liquid biopsies: Exosomes and ctDNA as minimally invasive biomarkers for precision cancer medicine. *The Journal of Liquid Biopsy*. 2023;2:100126. doi:10.1016/j.jlb.2023.100126
21. Zhang Q, Zhang X, Xie P, Zhang W. Liquid biopsy: An arsenal for tumour screening and early diagnosis. *Cancer Treat Rev*. 2024 Sep 1;129. doi:10.1016/J.CTRV.2024.102774
22. Lianidou E, Pantel K. Liquid biopsies [Internet]. 2018. doi:10.1002/gcc.22695
23. Bendari A, Vele O, Baskovich B, Bendari A, Sebika M, Gomez Marti JL, et al. Liquid Biopsy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Clinical Utility, Trials, and Future Directions. *Gastroenterology Insights* 2025, Vol 16, Page 39. 2025 Oct 19;16(4):39. doi:10.3390/GASTROENT16040039
24. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*. 2022 Dec 1;15(1). doi:10.1186/S13045-022-01351-Y
25. Ma L, Guo H, Zhao Y, Liu Z, Wang C, Bu J, et al. Liquid biopsy in cancer current: status, challenges and future prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Dec 1;9(1). doi:10.1038/S41392-024-02021-W
26. Yin H, Zhang M, Zhang Y, Zhang X, Zhang X, Zhang B. Liquid biopsies in cancer. *Molecular Biomedicine* 2025 6:1. 2025 Mar 20;6(1):1–21. doi:10.1186/S43556-025-00257-8

27. Chen X, Hu X, Liu T. Development of liquid biopsy in detection and screening of pancreatic cancer. *Front Oncol.* 2024;14:1415260. doi:10.3389/fonc.2024.1415260
28. Pantel K, Alix-Panabières C, Hofman P, Stoecklein NH, Lu YJ, Lianidou E, et al. Fostering the implementation of liquid biopsy in clinical practice: meeting report 2024 of the European Liquid Biopsy Society (ELBS). *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* 2025 Dec 1;44(1). doi:10.1186/S13046-025-03398-4
29. Zhao Y, Tang J, Jiang K, Liu SY, Aicher A, Heeschen C. Liquid biopsy in pancreatic cancer – Current perspective and future outlook. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2023 May 1;1878(3). doi:10.1016/j.bbcan.2023.188868
30. Bararia A, Chakraborty P, Roy P, Chattopadhyay BK, Das A, Chatterjee A, et al. Emerging role of non-invasive and liquid biopsy biomarkers in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2023 Apr 21;29(15):2241–60. doi:10.3748/WJG.V29.I15.2241
31. Ito T, Iwasawa T, Sakuraba S, Tanaka K. Plasma and Urine Circulating Tumor DNA Methylation Profiles for Non-Invasive Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Detection: Significant Findings in Plasma Only. *Int J Mol Sci.* 2025 Jun 1;26(11). doi:10.3390/IJMS26114972
32. Zaki-Dizaji M, Taheri Z, Heiat M, Hushmandi K. Tumor-educated platelet, a potential liquid biopsy biosource in pancreatic cancer: A review. *Pathol Res Pract.* 2025 Jun 1;270:155986. doi:10.1016/J.PRP.2025.155986
33. Dang DK, Park BH. Circulating tumor DNA: current challenges for clinical utility. *J Clin Invest.* 2022 Jun 15;132(12). doi:10.1172/JCI154941
34. Hou J, Li XT, Xie KP. Coupled liquid biopsy and bioinformatics for pancreatic cancer early detection and precision prognostication. *Mol Cancer.* 2021 Dec 1;20(1). doi:10.1186/s12943-021-01309-7
35. Sun J, Awad MA, Hwang J, Villano AM. Molecular Biomarkers for the Diagnosis and Prognostication of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Pers Med.* 2025 Jun 1;15(6). doi:10.3390/JPM15060236

36. Yousefli Z, Rafiee N, Nourollahian T, Alipour A, Haghshenas Z, Islampanah M, et al. Recent advances of circulating biomarkers with potential diagnostic, prognostic, and therapeutic value in pancreatic cancer: Limitations of clinical application. *Pathol Res Pract*. 2025 Aug 1;272:156045. doi:10.1016/J.PRP.2025.156045
37. Ben-Ami R, Wang QL, Zhang J, Supplee JG, Fahrman JF, Lehmann-Werman R, et al. Protein biomarkers and alternatively methylated cell-free DNA detect early stage pancreatic cancer. *Gut*. 2023 Dec 13;73(4):639–48. doi:10.1136/GUTJNL-2023-331074
38. Takai E, Yachida S. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy target for detection of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2016 Oct 14;22(38):8480–8. doi:10.3748/WJG.V22.I38.8480
39. Fujiyoshi K, Sugihara R, Miyamoto N, Watanabe Y, Sudo T, Numata S, et al. Comprehensive genetic profiling using tissue and blood in locally advanced tumors. *Oncol Rep*. 2025 Oct 1;54(4). doi:10.3892/or.2025.8967
40. Sadeghi H, Kohkalani M, Seyyed Rezaei SA, Kargarmonhaser S, Mahd Gharebagh F, Nikdouz A, et al. microRNAs in pancreatic cancer: Key modulators of tumor progression and therapeutic resistance. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2026 Mar 1;196. doi:10.1016/J.BIOPHA.2026.119100
41. Murray K, Oldfield L, Stefanova I, Gentiluomo M, Aretini P, O’Sullivan R, et al. Biomarkers, omics and artificial intelligence for early detection of pancreatic cancer. *Semin Cancer Biol*. 2025 Jun 1;111:76–88. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2025.02.009
42. Kjær MB, Jørgensen AG, Fjelstrup S, Dupont DM, Bus C, Oversøe SK, et al. Biomarker-directed aptamer panels for diagnosis and differentiation of neuroendocrine tumors. *J Neuroendocrinol*. 2026 Mar 1;38(3). doi:10.1111/JNE.70146
43. Zheng Z, Lu Z, Yan F, Song Y. The role of novel biomarkers in the early diagnosis of pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2025 May 1;20(5 May). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0322720

44. Balaraman AK, Moglad E, Afzal M, Babu MA, Goyal K, Roopashree R, et al. Liquid biopsies and exosomal ncRNA: Transforming pancreatic cancer diagnostics and therapeutics. *Clinica Chimica Acta*. 2025 Feb 1;567. doi:10.1016/J.CCA.2024.120105
45. He J, Long J, Zhai C, Xu J, Bao K, Su W, et al. Codetection of Proteins and RNAs on Extracellular Vesicles for Pancreatic Cancer Early Diagnosis. *Anal Chem*. 2024 Apr 30;96(17):6618–27. doi:10.1021/acs.analchem.3c05858
46. Liu J, Ren L, Li S, Li W, Zheng X, Yang Y, et al. The biology, function, and applications of exosomes in cancer. *Acta Pharm Sin B*. 2021 Sep 1;11(9):2783–97. doi:10.1016/j.apsb.2021.01.001
47. Gao J, Li A, Hu J, Feng L, Liu L, Shen Z. Recent developments in isolating methods for exosomes. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023 Jan 13;10. doi:10.3389/FBIOE.2022.1100892
48. Qiao Z, Wang E, Bao B, Tan X, Chen H, Wang D, et al. Diagnostic and prognostic value of circulating exosomal glypican-1 in pancreatic cancer: a meta-analysis. *Lab Medicine*. 2024 Sep 1;55(5):543–52. doi:10.1093/labmed/lmae013
49. Li H, Chiang CL, Kwak KJ, Wang X, Doddi S, Ramanathan L V., et al. Extracellular Vesicular Analysis of Glypican 1 mRNA and Protein for Pancreatic Cancer Diagnosis and Prognosis. *Advanced Science*. 2024 Mar 20;11(11). doi:10.1002/advs.202306373
50. Jia E, Ren N, Shi X, Zhang R, Yu H, Yu F, et al. Extracellular vesicle biomarkers for pancreatic cancer diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2022 Dec 1;22(1). doi:10.1186/s12885-022-09463-x
51. Yu Z, Yang Y, Fang W, Hu P, Liu Y, Shi J. Dual Tumor Exosome Biomarker Co-recognitions Based Nanoliquid Biopsy for the Accurate Early Diagnosis of Pancreatic Cancer. *ACS Nano*. 2023 Jun 27;17(12):11384–95. doi:10.1021/acsnano.3c00674

52. Yan S, Zheng H, Zhao J, Gao M, Zhang X. Quantification of GPC1(+) Exosomes Based on MALDI-TOF MS In Situ Signal Amplification for Pancreatic Cancer Discrimination and Evaluation. *Anal Chem*. 2023 Jul 11;95(27):10196–203. doi:10.1021/acs.analchem.3c00193
53. Jafari S, Motedayyen H, Javadi P, Jamali K, Moradi Hasan-Abad A, Atapour A, et al. The roles of lncRNAs and miRNAs in pancreatic cancer: a focus on cancer development and progression and their roles as potential biomarkers. *Front Oncol*. 2024;14:1355064. doi:10.3389/fonc.2024.1355064
54. Güzel Tanoğlu E, Adigüzel S, Tanoğlu A, Aydın ZB, Hocaoglu G, Ebinç S. Long noncoding RNAs in pancreas cancer: from biomarkers to therapeutic targets. *Turk J Med Sci*. 2023;53(6):1552–64. doi:10.55730/1300-0144.5724
55. Madadjim R, An T, Cui J. MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Advances in Biomarker Discovery and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2024 Apr 1;25(7). doi:10.3390/ijms25073914
56. Guo S, Qin H, Liu K, Wang H, Bai S, Liu S, et al. Blood small extracellular vesicles derived miRNAs to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Clin Transl Med*. 2021 Sep 1;11(9). doi:10.1002/CTM2.520
57. Saha B, Ghosal S, Chakravarty S, Ray S, Saha H, Das K, et al. Identification of circulating microRNA signature in pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis patients from Indian population. *Gene*. 2026 May 5;989. doi:10.1016/J.GENE.2026.150061
58. Zhu Y, Zhu L, Liu Y, Ji Y, Zhu J, Zhao H. Interpretable miRNA-based prediction model for early detection of pancreatic cancer: Development and cross-platform validation. *PLoS One*. 2026 May 1;21(5):e0348699. doi:10.1371/journal.pone.0348699
59. Tomeva E, Krammer UDB, Switzeny OJ, Haslberger AG, Hippe B. Sex-Specific miRNA Differences in Liquid Biopsies from Subjects with Solid Tumors and Healthy Controls. *Epigenomes*. 2023 Jan 10;7(1). doi:10.3390/epigenomes7010002

60. Derakhshani A, Di Fonte R, Porcelli L, Orang FN, Shadbad MA, Feriz AM, et al. Integrated single cell RNA sequencing and flow cytometry analysis identifies elevated S100A6+ and S100A8+ myeloid subsets in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical Immunology*. 2026 Apr 1;284. doi:10.1016/J.CLIM.2026.110665
61. Aaquist T, Henriksen TV, Mariager Jakobsen LL, Fristrup CW, Pfeiffer P, de Stricker K, et al. Circulating tumour DNA as a prognostic tool for surgically treated pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2026 Feb 1;168. doi:10.1016/j.humpath.2025.106024
62. Morales-Pacheco M, Valenzuela-Mayen M, Gonzalez-Alatriste AM, Mendoza-Almanza G, Cortés-Ramírez SA, Losada-García A, et al. The role of platelets in cancer: from their influence on tumor progression to their potential use in liquid biopsy. *Biomarker Research* 2025 13:1. 2025 Feb 11;13(1):27-. doi:10.1186/S40364-025-00742-W
63. Ding S, Dong X, Song X. Tumor educated platelet: the novel BioSource for cancer detection. *Cancer Cell Int*. 2023 Dec 1;23(1):91. doi:10.1186/S12935-023-02927-5
64. Hu H, Song H, Han B, Zhao H, He J. Tumor-Educated Platelet RNA and Circulating Free RNA: Emerging Liquid Biopsy Markers for Different Tumor Types. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2024;29(2). doi:10.31083/J.FBL2902080
65. Reese KL, Pantel K, Smit DJ. Multibiomarker panels in liquid biopsy for early detection of pancreatic cancer - a comprehensive review. *J Exp Clin Cancer Res*. 2024 Dec 1;43(1). doi:10.1186/S13046-024-03166-W
66. Shi W, Wartmann T, Accuffi S, Al-Madhi S, Perrakis A, Kahlert C, et al. Integrating a microRNA signature as a liquid biopsy-based tool for the early diagnosis and prediction of potential therapeutic targets in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2024 Jan 31;130(1):125–34. doi:10.1038/S41416-023-02488-4
67. Dittmar RL, Liu S, Tai MC, Rajapakshe K, Huang Y, Longton G, et al. Plasma miRNA Biomarkers in Limited Volume Samples for Detection of

- Early-stage Pancreatic Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2021 Jul 1;14(7):729–40. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-20-0303
68. Carrara S, Bevere M, Delle Cave D, Gentiluomo M, Esposito I, Luchini C. Liquid biopsy in pancreatic cancer: current advances, limitations, and future perspectives. *Dig Liver Dis*. 2026;58(6). doi:10.1016/J.DLD.2026.03.002
 69. Fusco N, Venetis K, Pepe F, Shetty O, Farinas SC, Heeke S, et al. International society of liquid biopsy (ISLB) perspective on minimal requirements for ctDNA testing in solid tumors. *The journal of liquid biopsy*. 2025 Jun 1;8. doi:10.1016/J.JLB.2025.100301
 70. Takahashi K, Ono Y, Taniue K, Patra KC, Yamamoto T, Fujiya M, et al. Liquid Biopsy for Early Pancreatic Cancer Detection: Why Has It Not Yet Worked? *Cancers (Basel)*. 2026 Feb 1;18(3). doi:10.3390/CANCERS18030525
 71. Deans ZC, Fairley J, Patton SJ, Koch C, Toledo RA, Pantel K, et al. Reference materials and external quality assessment for liquid biopsy assays: Expert opinions from the European Liquid Biopsy Society ctDNA workshop. *Cancer Treat Res Commun*. 2026 Jan 1;47:101151. doi:10.1016/J.CTARC.2026.101151
 72. Iso. Medical laboratories-Requirements for quality and competence. 2022.
 73. Regulation - 2017/746 - EN - IVD - EUR-Lex [Internet]. [cited 2026 May 29]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2017/746/oj>
 74. Lockwood CM, Borsu L, Cankovic M, Earle JSL, Gocke CD, Hameed M, et al. Recommendations for Cell-Free DNA Assay Validations: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2023 Dec 1;25(12):876–97. doi:10.1016/J.JMOLDX.2023.09.004
 75. C. Moore, PharmD, BCPS, BCOP, DPLA, FCCP D, S. Guinigundo, MSN, RN, CNP, ANP-BC A. The Advanced Practitioner's Role in the Rapidly Evolving Landscape of Precision Medicine. *J Adv Pract Oncol*. 2023 Apr 1;14(Suppl 1):39. doi:10.6004/JADPRO.2023.14.3.18

76. Gallo M, Adinolfi V, Morviducci L, Acquati S, Tuveri E, Ferrari P, et al. Early prediction of pancreatic cancer from new-onset diabetes: an Associazione Italiana Oncologia Medica (AIOM)/Associazione Medici Diabetologi (AMD)/Società Italiana Endocrinologia (SIE)/Società Italiana Farmacologia (SIF) multidisciplinary consensus position paper. *ESMO Open*. 2021 Jun 1;6(3). doi:10.1016/J.ESMOOP.2021.100155
77. Hussain MM, Qammar S, Wang JM, Zhai AQ, Li FY, Hu HJ. Toward Timely Diagnosis of Pancreatic Cancer: Revolutionizing Early Detection Through Genomics, Artificial Intelligence, and Noninvasive Biomarkers. *Journal of Gastroenterology and Hepatology REVIEW ARTICLE OPEN ACCESS*. 2026;41:895–913. doi:10.1111/jgh.70281
78. Sawhney MS, Calderwood AH, Thosani NC, Rebbeck TR, Wani S, Canto MI, et al. ASGE guideline on screening for pancreatic cancer in individuals with genetic susceptibility: summary and recommendations. *Gastrointest Endosc*. 2022;95:817–26. doi:10.1016/j.gie.2021.12.001
79. Goggins M, Overbeek KA, Brand R, Syngal S, Del Chiaro M, Bartsch DK, et al. Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. *Gut*. 2020 Jan 1;69(1):7–17. doi:10.1136/GUTJNL-2019-319352
80. Mannucci A, Goel A. Advances in pancreatic cancer early diagnosis, prevention, and treatment: The past, the present, and the future. *CA Cancer J Clin*. 2026 Jan;76(1). doi:10.3322/CAAC.70035
81. Engels MML, Berger CK, Mahoney DW, Hoogenboom SA, Sarwal D, Klatte DCF, et al. Multimodal Pancreatic Cancer Detection Using Methylated DNA Biomarkers in Pancreatic Juice and Plasma CA 19-9: A Prospective Multicenter Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2025 Apr 1;23(5):766–75. doi:10.1016/J.CGH.2024.07.048
82. de Jager VD, Giacomini P, Fairley JA, Toledo RA, Patton SJ, Joosse SA, et al. Reporting of molecular test results from cell-free DNA analyses: expert consensus recommendations from the 2023 European Liquid

- Biopsy Society ctDNA Workshop. EBioMedicine. 2025 Apr 1;114.
doi:10.1016/J.EBIOM.2025.105636
83. Raheem F, Kim P, Grove M, Kiel PJ. Precision Genomic Practice in
Oncology: Pharmacist Role and Experience in an Ambulatory Care Clinic.
Pharmacy: Journal of Pharmacy Education and Practice. 2020 Mar
8;8(1):32. doi:10.3390/PHARMACY8010032