

La biopsia líquida: una nueva herramienta en el manejo del cáncer oral

Ana María Rodríguez-Ces, DDS, PhD^{1,2,3}, Óscar Rapado-González, DDS, PhD^{1,2,3,4},
María Mercedes Suárez-Cunqueiro, DDS, PhD^{1,2,4,5}

RESUMEN

Actualmente las biopsias líquidas han emergido como una potencial herramienta para el manejo del cáncer oral. Su aplicación ha demostrado ser clave en el desarrollo de una oncología de precisión gracias a su capacidad de proporcionar información molecular de una manera mínimamente invasiva, a diferencia de la biopsia de tumor sólido. Además, ofrecen una visión global de la heterogeneidad tumoral que se produce en la carcinogénesis oral, tanto en el momento diagnóstico como durante la evolución de la enfermedad, lo cual tiene un impacto importante en la respuesta al tratamiento, así como, en la progresión de la enfermedad. El ADN libre circulante, las células tumorales circulantes, los micro-ARN, y los exosomas, constituyen los biomarcadores tumorales más comúnmente estudiados en biopsias líquidas de sangre. Aunque es necesario aumentar el número de estudios y la sensibilidad de las herramientas de análisis molecular, la aparición de la inteligencia artificial y el desarrollo de tecnologías cada vez más precisas permitirá, en los próximos años, la implementación clínica de la biopsia líquida en el manejo del cáncer oral, revolucionando el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de esta patología.

PALABRAS CLAVE: biopsia líquida, cáncer oral, biomarcadores, ADN tumoral circulante, células tumorales circulantes, microARNs, exosomas.

ABSTRACT

Currently, liquid biopsies have emerged as a potential tool for the management of oral cancer. Their application has proven to be crucial in the development of precision oncology due to their ability to provide molecular information in a minimally invasive manner, in contrast with solid tumor biopsies. Additionally, they offer a comprehensive view of the tumor heterogeneity that occurs in oral carcinogenesis, both at the time of diagnosis and during the disease, which has a significant impact on treatment response and disease progression. Circulating free DNA, circulating tumor cells, microRNAs, and exosomes are the most studied tumor biomarkers in blood liquid biopsies. Although there is a need to increase the number of studies and the sensitivity of molecular analysis tools, the emergence of artificial intelligence and the development of increasingly precise technologies will allow for the clinical implementation of liquid biopsies in the management of oral cancer in the coming years, revolutionizing the diagnosis, prognosis, and treatment of this condition.

KEY WORDS: liquid biopsy, oral cancer, biomarkers, circulating tumor DNA, circulating tumor cells, microRNAs, exosomes.

INTRODUCCIÓN

Las biopsias líquidas han emergido como una novedosa estrategia en la detección temprana de enfermedades, así como en el manejo de éstas durante el tratamiento y su curso evolutivo. Durante la última década, de entre todas las disciplinas médicas, es particularmente en el campo de la oncología donde se produjo su mayor desarrollo, transformando el

enfoque diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento de múltiples tipos de cáncer. La biopsia líquida se basa en el análisis de diferentes moléculas tales como los ácidos nucleicos (ADN y ARN), las células tumorales circulantes (CTCs), las proteínas o los metabolitos, entre otras. Su estudio puede llevarse a cabo en diferentes fluidos corporales, como sangre¹, saliva², líquido cefalorraquídeo³, leche materna⁴ ➤➤➤

¹Department of Surgery and Medical-Surgical Specialties, Medicine and Dentistry School, Universidade de Santiago de Compostela (USC), 15782 Santiago de Compostela, Spain; anamaria.rodriguez.ces@rai.usc.es (A.M.R.-C.); oscar.rapado@rai.usc.es (O.R.-G.); mariamercedes.suarez@usc.es (M.M.S.-C.).

²Galician Precision Oncology Research Group (ONCOGAL), Medicine and Dentistry School, Universidade de Santiago de Compostela (USC), 15782 Santiago de Compostela, Spain.

³Liquid Biopsy Analysis Unit, Translational Medical Oncology Group (ONCOMET), Health Research Institute of Santiago (IDIS), Santiago de Compostela, 15706, Spain.

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red en Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain.

⁵Translational Medical Oncology Group (ONCOMET), Health Research Institute of Santiago (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS, SERGAS), 15706 Santiago de Compostela, Spain.

CORRESPONDENCIA: Dra. María Mercedes Suárez Cunqueiro

CORREO ELECTRÓNICO: mariamercedes.suarez@usc.es

La biopsia líquida a través del tiempo:

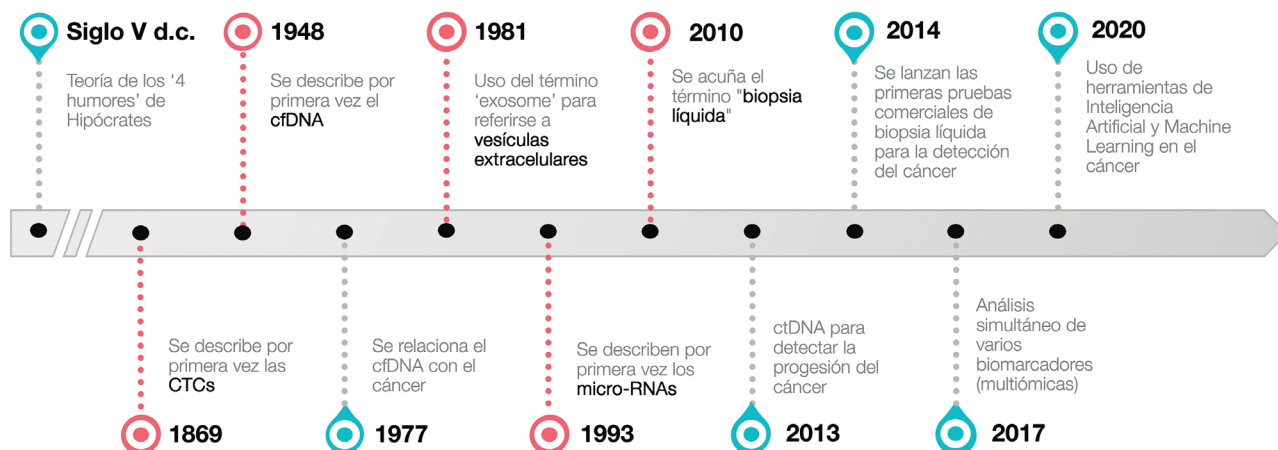


FIGURA 1. Cronología de los principales hallazgos relacionados con la biopsia líquida.

u orina⁵. La posibilidad de detectar y caracterizar estas moléculas en diferentes biofluidos representa una alternativa más rápida y menos invasiva de detección y manejo del cáncer, en comparación con otras técnicas, lo que supone un avance significativo para la oncología moderna. Su capacidad para identificar alteraciones genéticas y genómicas, así como para obtener gran cantidad de información sobre el perfil molecular cambiante del tumor, es clave en la implementación de tratamientos personalizados en la clínica diaria, dando un impulso al desarrollo de la oncología de precisión⁶.

En la actualidad, el cáncer oral sigue siendo uno de los cánceres más prevalentes⁷, representando un grave problema a nivel global, siendo su incidencia mayor en los países menos desarrollados. La Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) estima que el presente año 2023, el cáncer oral será uno de los diez cánceres más diagnosticados en España, con más de 7.000 casos nuevos previstos⁸. Cuenta con una etiología multifactorial y, en la mayoría de los casos, su desarrollo está relacionado con diversos factores de riesgo tales como el tabaco, el consumo de alcohol⁹, la infección del virus del papiloma humano (VPH)¹⁰ o la presencia de desórdenes orales potencialmente malignos¹¹, entre otros. Aunque su pronóstico es bueno cuando es diagnosticado en estadios tempranos la realidad es que, a día de hoy, a pesar de las mejoras en el sistema sanitario, la mayoría de los casos de

carcinoma oral de células escamosas (COCE), el tipo histológico más común, siguen siendo diagnosticados en estadios avanzados en los que las posibilidades terapéuticas, de calidad de vida y de supervivencia disminuyen considerablemente¹². Cabe destacar que, en los últimos años, se ha detectado un incremento en la incidencia de cáncer oral principalmente en mujeres sin factores de riesgo clásicos conocidos¹³⁻¹⁵, lo que evidencia la existencia de otros factores etiológicos fuera de los comúnmente descritos implicados en la carcinogénesis oral lo cual complica el entendimiento y la prevención de la enfermedad.

En la práctica clínica diaria, la biopsia de tejido tumoral junto con su posterior diagnóstico histopatológico sigue siendo el gold standard para el diagnóstico del cáncer oral, sin embargo, solo ofrece información puntual y relativa a la zona biopsiada por lo que, no se obtiene un perfil molecular (información genética y genómica) completo del tumor. En contraposición, la biopsia líquida ofrece una visión global de la heterogeneidad tumoral en el momento del diagnóstico y además, también permite conocer cómo varía ésta a través del tiempo, durante el tratamiento y el seguimiento posterior del paciente (*figura 2*).

En esta revisión introduciremos los conceptos generales relacionados con la biopsia líquida y definiremos algunos de los biomarcadores que podemos estudiar en ella, así como su aplicación actual en el manejo del cáncer oral.

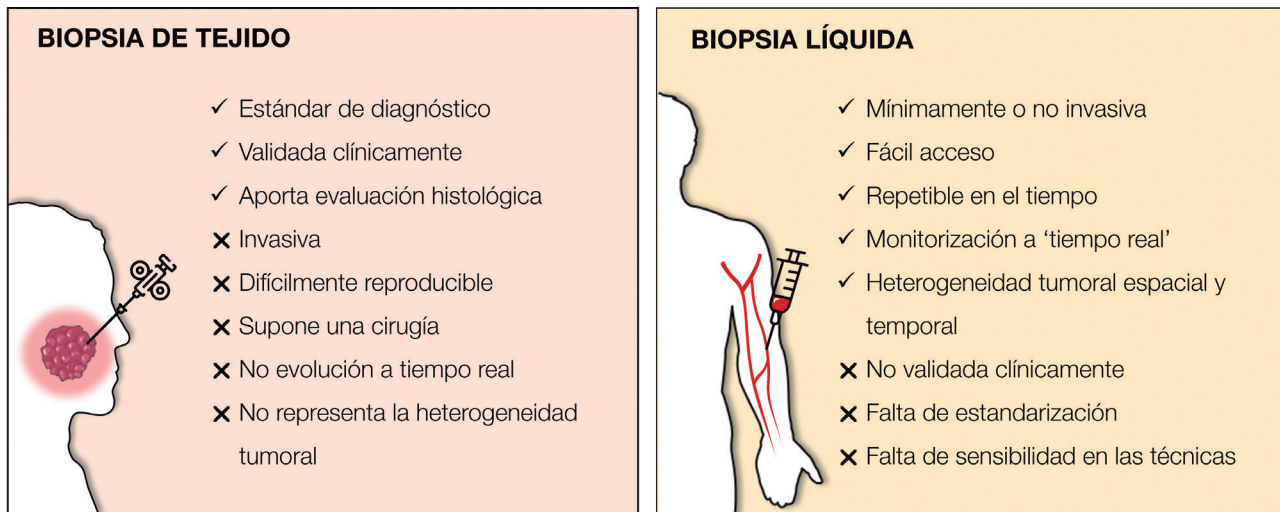


FIGURA 2. Comparación entre la biopsia sólida de tejido y la biopsia líquida. Se describen las ventajas e inconvenientes de ambas técnicas.

BIOMARCADORES EN CÁNCER ORAL

En los últimos años, numerosos estudios han destacado el gran potencial de la aplicación de la biopsia líquida en el cáncer. Respecto al cáncer oral, aunque la evidencia científica ha evidenciado que el uso de biomarcadores en biopsia líquida tiene aplicabilidad directa en esta patología tumoral, la realidad es que

su desarrollo sigue estando en su infancia. A continuación, se describen los biomarcadores más comúnmente usados en investigación (figura 3).

ADN libre celular circulante y ADN tumoral circulante

El ADN libre celular circulante, conocido como cfDNA (por sus siglas en inglés, *cell-free DNA*), representa el biomarcador más estudiado en la biopsia líquida. Su utilidad clínica fue descrita por primera vez por Mandel y Métais en 1948¹⁶, sin embargo, no fue hasta 1977 cuando se relacionó por primera vez con el cáncer¹⁷. El cfDNA se compone principalmente de ADN de doble cadena de diferentes tamaños y es liberado en distintas cantidades a los diferentes biofluidos corporales, mediante procesos celulares como la muerte celular (apoptosis), la degradación celular (necrosis) o la secreción activa (figura 4)¹⁸. Aunque en condiciones normales, la mayor proporción de cfDNA proviene del sistema hematopoyético, en los pacientes con cáncer, aparte del cfDNA proveniente de células sanas, existe un pequeño porcentaje variable de origen tumoral conocido como ADN tumoral circulante (ctDNA, del inglés *circulating tumoral DNA*). El ctDNA se caracteriza por presentar mutaciones somáticas, cambios genéticos en las células del cuerpo que no han sido heredados, que proceden del tumor. La información que aporta el ctDNA es muy importante para entender cómo se desarrolla y se propaga la enfermedad tumoral, así como para identificar dianas terapéuticas dirigidas a las mutaciones específicas presentes en las células tumorales. La concentración de este ctDNA varía dependiendo del tipo de cáncer y el estadio en el que se encuentra, así como de otras características relativas al tumor como el grado de vascularización, la localización o la respuesta al tratamiento¹⁹.

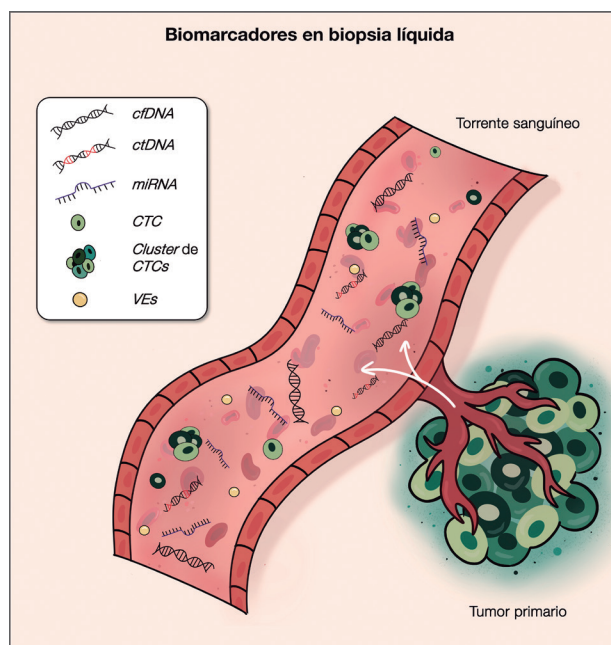


FIGURA 3. Principales biomarcadores en biopsia líquida en sangre. Estos biomarcadores son liberados al torrente sanguíneo por parte de las células tumorales en diferentes cantidades.
Abreviaturas: cfDNA: ADN libre celular circulante; ctDNA: ADN tumoral circulante; miRNAs: micro-ARNs; CTCs: células tumorales circulantes; VEs: vesículas extracelulares.

Mecanismos de secreción del cfDNA



A) Apoptosis

B) Necrosis

C) Secreción activa

FIGURA 4. Principales orígenes del ADN libre celular circulante: Apoptosis, Necrosis y Secreción Activa. **A)** La apoptosis representa un proceso de muerte celular programada que ocurre de manera controlada y ordenada. Durante la apoptosis, las células se encogen, la cromatina se condensa y terminan fragmentándose en pequeñas vesículas, que posteriormente son fagocitadas por células vecinas o del sistema inmunológico. **B)** La necrosis supone una muerte celular no programada y arbitraria. Durante la necrosis, las células se hinchan y estallan, liberando su contenido al entorno circundante. **C)** En la secreción activa se produce una liberación controlada y regulada de cfDNA y puede ser parte de procesos fisiológicos o patológicos sin tener que estar necesariamente relacionado con la muerte celular.

Abreviaturas: cfDNA: ADN libre celular circulante.

»» En los últimos años este biomarcador está siendo muy estudiado debido a la gran variedad de información que otorga de forma mínimamente invasiva sobre el tumor primario y/o las metástasis²⁰. El ctDNA no solo aporta conocimiento sobre las alteraciones genéticas presentes, como las mutaciones y los cambios en el número de copias de genes, sino también sobre las alteraciones epigenéticas como la metilación (adición de grupos metilo, CH₃, al ADN que puede afectar a la regulación de los genes)²¹.

Desde el punto de vista del cfDNA como biomarcador, tanto su concentración como su caracterización genética (mutaciones) y epigenética (metilación, entre otros) han demostrado su aplicabilidad clínica en el manejo del cáncer. En el COCE, se ha observado un incremento de la concentración de cfDNA respecto a los individuos sanos, detectándose niveles más elevados en pacientes con estadios más avanzados^{22,23}. El análisis del cfDNA permite definir el perfil molecular de los tumores orales, representando una oportunidad de futuro para identificar las mutaciones más prevalentes en esta patología²⁴. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, en particular, el ctDNA se encuentra en unas cantidades muy bajas en los estadios tempranos, lo que hace necesario el desarrollo

de técnicas de alta sensibilidad que permitan su detección y análisis²⁵.

Células tumorales circulantes

Durante el desarrollo tumoral, las células adquieren una serie de cambios genéticos y epigenéticos que les permiten adaptarse al entorno cambiante del cáncer, de esta forma se crea un ambiente tumoral en el que conviven células tumorales de diferentes fenotipos²⁶. Las células cancerígenas comienzan con una transición epitelio-mesenquimal (EMT, del inglés *Epithelial Mesenchymal Transition*) que les permite abandonar el tumor primario a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático para posteriormente desplazarse de forma individual, aisladas, o en grupo formando *clusters*, constituyendo lo que conocemos como CTCs (del inglés, *circulating tumor cells*). Los *clusters* sobreviven en circulación con mayor facilidad evadiendo con frecuencia la acción del sistema inmune. Aquellas células que logran sobrevivir en circulación tienen que revertir el proceso de EMT para volver a adquirir rasgos epiteliales, lo cual les permite abandonar el torrente sanguíneo, anidar en otras localizaciones corporales y comenzar a proliferar²⁷, originando un nuevo ambiente tumoral »»

»» que conocemos como metástasis^{26,28}. Este crecimiento a distancia de las células tumorales es la principal causa de muerte de los pacientes con cáncer debido a que al ser una entidad diferente a la del tumor primario, las terapias aplicadas al paciente no son tan efectivas (figura 5)²⁹.

Uno de los problemas que presenta el estudio de las CTCs, es que tienen una alta degradabilidad y se encuentran en una cantidad muy baja (3 10 células por mililitro de sangre) en medio de otros componentes sanguíneos, lo que complica su detección y posterior análisis^{26,30,31}. Para detectar esta pequeña proporción de células, el único sistema aprobado por la FDA es el CellSearch (Menarini Silicon Biosystems, Italy), cuya tecnología se basa en el estudio de los antígenos que se expresan en las CTCs, pero no en el resto de las células circulantes. Aunque este dispositivo se utiliza diariamente y está aprobado para monitorizar a los pacientes que padecen distintos tipos de cáncer como mama, colorrectal o próstata, en cáncer de cabeza y cuello no existen muchos estudios relacionados con su uso y aplicación³².

Micro-ARNs

Los *miRNAs* (derivados del inglés, *microRNAs*), constituyen una familia de pequeños ARNs monocatenarios no codificantes, es decir, que no se traducen en proteínas, y están compuestos por una serie de entre 18-25 nucleótidos de longitud. Fueron descritos por primera vez en 1993³³ y están encargados de la regulación de la expresión genética a nivel postranscripcional, justo antes de que las moléculas de ARN se traduzcan en proteínas³⁴. Este proceso implica su unión a secuencias complementarias presentes en la región no transcrita del ARN mensajero, lo que conduce a la inhibición de la traducción, y por tanto la supresión o la degradación del gen³⁵.

En la actualidad, se han identificado más de 2,000 *miRNAs* capaces de regular la expresión de aproximadamente un tercio de los genes en el genoma humano³⁶, teniendo un impacto directo en el metabolismo, la apoptosis y la proliferación celular^{37,38}. En el contexto del cáncer, desempeñan un papel relevante en la regulación del microambiente tumoral, la angiogénesis, la migración celular o el proceso de metástasis^{38,39}, actuando como promotores o supresores tumorales dependiendo de su nivel de expresión⁴⁰.

Una característica importante de los *miRNAs* es su estabilidad en condiciones adversas, ya que no son susceptibles a la acción de la RNasa endógena, una enzima que los degradaría en condiciones normales, lo que haría que no pudieran cumplir su función reguladora en la expresión. Se encuentran en diferentes biofluidos como la sangre, la saliva o la orina y,

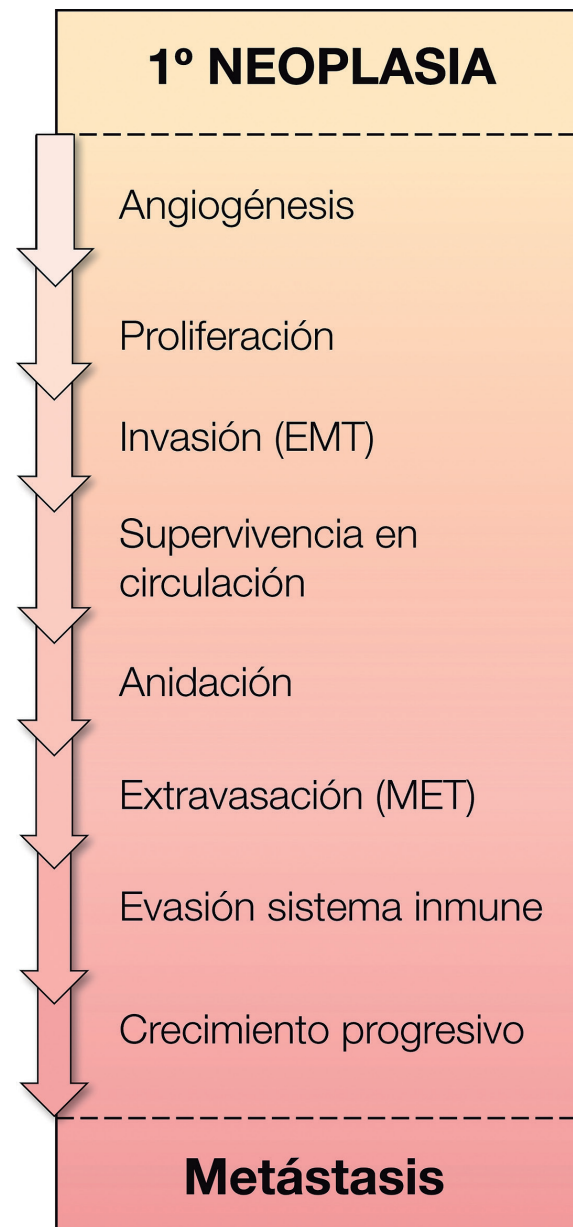


FIGURA 5 Etapas secuenciales del proceso de formación de la metástasis llevado a cabo por las células tumorales que se encuentran en el tumor primario (1º neoplasia). **Abreviaturas:** EMT: Transición Epitelio-Mesénquima; MET: Transición Mesénquima-Epitelial.

cuando son detectados en circulación, se denominan *miRNAs* circulantes^{41,42}. La presencia de los *miRNAs* en las biopsias líquidas es debida mayoritariamente a tres procesos: (1) la liberación pasiva de *miRNAs* celulares debido a la apoptosis celular y el daño tisular, (2) la secreción activa selectiva como *miRNAs* libres y (3) la secreción activa en microvesículas y exosomas⁴³. En este contexto, el perfil de expresión »»

de los *miRNAs* circulantes puede reflejar el perfil del tumor primario o las lesiones metastásicas, lo que facilita la detección del cáncer en sus diferentes etapas de manera no invasiva.

Numerosos estudios se han centrado en el análisis de los *miRNAs* circulantes en el cáncer oral, demostrando su potencial aplicación clínica en el diagnóstico, pronóstico, y tratamiento^{44,45}. A pesar de que se han identificado múltiples *miRNAs* desregulados en biopsias líquidas de pacientes con cáncer oral, son necesarios más estudios para dilucidar su papel en el desarrollo y la progresión del cáncer oral⁴¹.

Vesículas extracelulares (exosomas)

Las vesículas extracelulares (VEs) fueron descritas por primera vez en 1983⁴⁶ y representan unas moléculas bioactivas que intervienen en numerosos procesos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos⁴⁷⁻⁴⁹. Las VEs pueden ser secretadas por las distintas células corporales, incluyendo aquellas de origen tumoral, y comprende un grupo heterogéneo de estructuras, generalmente de forma esférica y con tamaño diferente, recubiertas por una membrana entre las cuales se encuentran las microvesículas, los exosomas y los cuerpos apoptóticos⁵⁰.

Los exosomas representan una subpoblación de VEs de tamaño reducido, con diámetros inferiores a 150 nm, y cuya presencia ha sido identificada en el microambiente tumoral. Estas vesículas actúan como mensajeros intercelulares debido a que en su interior contienen biomarcadores específicos de la célula de la que provienen tales como proteínas, lípidos, *miRNAs* y demás material genético, pudiendo ser captados por las células adyacentes o distantes, desencadenando cambios en su funcionamiento. En el contexto del cáncer, las VEs desempeñan un papel fundamental en los procesos de carcinogénesis⁵¹, invasión tumoral y metástasis, pudiendo tener un efecto tanto promotor como inhibidor tumoral⁵².

Concretamente, en el COCE, se ha demostrado la importancia que tiene el contenido de los exosomas en la migración e invasión de células cancerígenas⁵³, en la formación de la metástasis⁵⁴, así como otros procesos moleculares claves en la carcinogénesis oral⁵⁵. Además, ya se han identificado *miRNAs* oncogénicos en exosomas de pacientes con cáncer oral, lo que resalta el interés de estudiar el contenido de los exosomas para identificar potenciales biomarcadores para el cribado del cáncer oral⁵⁶, así como posibles dianas terapéuticas. Es por ello por lo que, la secreción y composición de los exosomas tiene un gran interés biológico en la identificación de nuevos biomarcadores tumorales no invasivos⁵⁷.

LA BIOPSIA LÍQUIDA Y SU FUTURO EN EL CÁNCER ORAL

Aunque el término “biopsia líquida” es relativamente reciente, acuñado por Pantel y Panabières en el 2010⁵⁸, ya en el siglo V d.C, Hipócrates exponía la teoría que defendía la importancia del equilibrio de los 4 líquidos o “humores” (sangre, flema, bilis negra y bilis amarilla) que componían el cuerpo humano⁵⁹. Desde ese momento se han hecho muchos avances que han contribuido a que la biopsia líquida hoy en día sea una herramienta clave en el desarrollo de una oncología de precisión, la cual ya es una realidad clínica en el diagnóstico y tratamiento de algunos tumores en nuestro sistema sanitario.

Sin embargo, a pesar de los continuos avances científicos y el aumento del número de estudios, todavía queda un largo camino por recorrer antes de lograr la implementación clínica de la biopsia líquida en el manejo del cáncer oral. Por un lado, es necesario estandarizar los métodos de aislamiento, procesado y análisis de los diferentes biomarcadores, lo que permitirá trasladar los resultados obtenidos entre los diferentes estudios a la clínica²⁵. Por otro lado, es imprescindible avanzar en el desarrollo de técnicas más sensibles y precisas, que permitan detectar y seguir el comportamiento de los marcadores tumorales durante la evolución de la enfermedad.

La biopsia líquida tiene un gran potencial para la identificación mínimamente invasiva de diferentes biomarcadores tumorales (proteínas, *miRNAs*, metabolitos, mutaciones o metilación) involucrados en el cáncer oral. El desarrollo de estudios multicéntricos prospectivos y de modelos predictivos robustos, que integren diferentes biomarcadores, será clave en el manejo personalizado del cáncer oral, facilitando su implementación clínica, desde el diagnóstico, al tratamiento y evolución de la enfermedad. Además, la implementación de nuevas tecnologías avanzadas como la Inteligencia Artificial (IA) y el *Machine Learning* (ML) permitirá el análisis de una gran cantidad de datos que ayudará a la integración clínica de la biopsia líquida en el cáncer oral, lo que representará un importante avance en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de este tumor mejorando las probabilidades de supervivencia y curación de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ma F, Guan Y, Yi Z, Chang L, Li Q, Chen S, et al. Assessing tumor heterogeneity using ctDNA to predict and monitor therapeutic response in metastatic breast cancer. *Int J Cancer*. 2020 Mar 1;146(5):1359–68.

2. Rapado-González Ó, Majem B, Muínelo-Romay L, Álvarez-Castro A, Santamaría A, Gil-Moreno A, et al. Human salivary microRNAs in Cancer. *J Cancer*. 2018;9(4):638-49.
3. Miller AM, Shah RH, Pentsova EI, Pourmaleki M, Briggs S, Distefano N, et al. Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies of cerebrospinal fluid. *Nature*. 2019 Jan;565(7741):654-8.
4. Saura C, Ortiz C, Matito J, Arenas EJ, Suñol A, Martín Á, et al. Early-Stage Breast Cancer Detection in Breast Milk. *Cancer Discov*. 2023 Oct 5;13(10):2180-91.
5. Chen X, Zhang J, Ruan W, Huang M, Wang C, Wang H, et al. Urine DNA methylation assay enables early detection and recurrence monitoring for bladder cancer. *J Clin Invest*. 2020 Dec 1;130(12):6278-89.
6. Kumar-Sinha C, Chinnaiyan AM. Precision oncology in the age of integrative genomics. *Nat Biotechnol*. 2018 Jan 10;36(1):46-60.
7. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
8. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del cáncer en España 2023. p. 9-10.
9. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst*. 2007 May 16;99(10):777-89.
10. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000 May 3;92(9):709-20.
11. Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 Jun;125(6):612-27.
12. Zanoni DK, Montero PH, Migliacci JC, Shah JP, Wong RJ, Ganly I, et al. Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015). *Oral Oncol*. 2019 Mar;90:115-21.
13. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, et al. Increasing Incidence of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma in Young White Women, Age 18 to 44 Years. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Apr 10;29(11):1488-94.
14. DeAngelis A, Breik O, Koo K, Iseli T, Nastri A, Fua T, et al. Non-smoking, non-drinking elderly females, a 5 year follow-up of a clinically distinct cohort of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol*. 2018 Nov;86:113-20.
15. Foy JP, Bertolus C, Boutolleau D, Agut H, Gessain A, Herceg Z, et al. Arguments to Support a Viral Origin of Oral Squamous Cell Carcinoma in Non-Smoker and Non-Drinker Patients. *Front Oncol*. 2020 May 21;10.
16. Mandel P, Metais P. [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948 Feb;142(3-4):241-3.
17. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977 Mar;37(3):646-50.
18. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2016 Sep;35(3):347-76.
19. Fan Y, Shi M, Chen S, Ju G, Chen L, Lu H, et al. Analysis of serum cfDNA concentration and integrity before and after surgery in patients with lung cancer. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2019 Jul 31;65(6):56-63.
20. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DWY, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013 May 2;497(7447):108-12.
21. Salvi S, Gurioli G, De Giorgi U, Conteduca V, Tedaldi G, Calistri D, et al. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *Onco Targets Ther*. 2016;9:6549-59.
22. Lin LH, Cheng HW, Liu CJ. Droplet digital polymerase chain reaction for detection and quantification of cell-free DNA TP53 target somatic mutations in oral cancer. *Cancer Biomark*. 2022;33(1):29-41.
23. Shukla D, Kale AD, Hallikerimath S, Yerramalla V, Subbiah V. Can Quantifying Free-Circulating DNA Be a Diagnostic and Prognostic Marker in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013 Feb;71(2):414-8.
24. Shafana ARF, Uwanthika GAI, Kartheeswaran T. Exploring the molecular subclasses and stage-specific genes of oral cancer: A bioinformatics analysis. *Cancer Treat Res Commun*. 2021;27:100320.
25. Rodda AE, Parker BJ, Spencer A, Corrie SR. Extending Circulating Tumor DNA Analysis to Ultralow Abundance Mutations: Techniques and Challenges. *ACS Sens*. 2018 Mar 23;3(3):540-60.
26. Chen L, Bode AM, Dong Z. Circulating Tumor Cells: Moving Biological Insights into Detection. *Theranostics*. 2017;7(10):2606-19.
27. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013 Nov;19(11):1423-37.
28. de Wit S, van Dalum G, Terstappen LWMM. Detection of circulating tumor cells. *Scientifica (Cairo)*. 2014;2014:819362.
29. Aleckovic M, McAllister SS, Polyak K. Metastasis as a systemic disease: molecular insights and clinical implications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019 Aug;1872(1):89-102.
30. Diamantopoulou Z, Castro-Giner F, Aceto N. Circulating tumor cells: Ready for translation? *J Exp Med*. 2020 Aug 3;217(8).
31. Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, Yu M, Miyamoto DT, Ulkus L, et al. Isolation and characterization of circulating tumor

- cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Sci Transl Med*. 2010 Mar 31;2(25):25ra23.
32. Jatana KR, Lang JC, Chalmers JJ. Identification of circulating tumor cells: a prognostic marker in squamous cell carcinoma of the head and neck? *Future Oncol*. 2011 Apr;7(4):481-4.
 33. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):855-62.
 34. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res*. 2011 Dec 1;717(1-2):1-8.
 35. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Mar;11(3):145-56.
 36. Norouzi M, Yasamineh S, Montazeri M, Dadashpour M, Sheervaililou R, Abasi M, et al. Recent advances on nanomaterials-based fluorimetric approaches for microRNAs detection. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Nov;104:110007.
 37. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jun;15(6):321-33.
 38. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215-33.
 39. Detassis S, Grasso M, Del Vescovo V, Denti MA. microRNAs Make the Call in Cancer Personalized Medicine. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:86.
 40. Suzuki HI, Katsura A, Matsuyama H, Miyazono K. MicroRNA regulons in tumor microenvironment. *Oncogene*. 2015 Jun 11;34(24):3085-94.
 41. Rapado-González Ó, López-López R, López-Cedrún JL, Triana-Martínez G, Muínelo-Romay L, Suárez-Cunqueiro MM. Cell-Free microRNAs as Potential Oral Cancer Biomarkers: From Diagnosis to Therapy. *Cells*. 2019 Dec 17;8(12).
 42. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010 Nov;56(11):1733-41.
 43. Zen K, Zhang CY. Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev*. 2012 Mar;32(2):326-48.
 44. Wu YY, Chen YL, Jao YC, Hsieh IS, Chang KC, Hong TM. miR-320 regulates tumor angiogenesis driven by vascular endothelial cells in oral cancer by silencing neuropilin 1. *Angiogenesis*. 2014 Jan;17(1):247-60.
 45. Siano M, Espeli V, Mach N, Bossi P, Licitra L, Ghilmini M, et al. Gene signatures and expression of miRNAs associated with efficacy of panitumumab in a head and neck cancer phase II trial. *Oral Oncol*. 2018 Jul;82:144-51.
 46. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983 Jul;33(3):967-78.
 47. Ruivo CF, Adem B, Silva M, Melo SA. The Biology of Cancer Exosomes: Insights and New Perspectives. *Cancer Res*. 2017 Dec 1;77(23):6480-8.
 48. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.
 49. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest*. 2016 Apr 1;126(4):1208-15.
 50. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol*. 2017 Mar;27(3):172-88.
 51. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 2016 Apr;36(3):301-12.
 52. Zhang W, Xia W, Lv Z, Ni C, Xin Y, Yang L. Liquid Biopsy for Cancer: Circulating Tumor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes? *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(2):755-68.
 53. Xiao M, Zhang J, Chen W, Chen W. M1-like tumor-associated macrophages activated by exosome-transferred THBS1 promote malignant migration in oral squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Jul 9;37(1):143.
 54. He S, Zhang W, Li X, Wang J, Chen X, Chen Y, et al. Oral squamous cell carcinoma (OSCC)-derived exosomal MiR-221 targets and regulates phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1) to promote human umbilical vein endothelial cells migration and tube formation. *Bioengineered*. 2021 Dec;12(1):2164-74.
 55. Pang X, Wang SS, Zhang M, Jiang J, Fan HY, Wu JS, et al. OSCC cell-secreted exosomal CMTM6 induced M2-like macrophages polarization via ERK1/2 signaling pathway. *Cancer Immunol Immunother*. 2021 Apr;70(4):1015-29.
 56. Sakha S, Muramatsu T, Ueda K, Inazawa J. Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2016 Dec 8;6:38750.
 57. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci*. 2019;9:19.
 58. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*. 2010 Sep;16(9):398-406.
 59. Marketos SG, Skiadas PK. The modern hippocratic tradition. Some messages for contemporary medicine. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999 Jun 1;24(11):1159-63.