



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

RAQUEL SOARES PARECE

# **BIÓPSIA LÍQUIDA: UM MÉTODO MULTIDIMENSIONAL DE AVALIAÇÃO DO CANCRO DA MAMA PRECOCE**

**ARTIGO DE REVISÃO**

ÁREA CIENTÍFICA DE GINECOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

DR. RICARDO JOÃO ROQUE

PROFESSORA DOUTORA MARIA MARGARIDA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO DIAS

JANEIRO/2023

# Índice

Lista de abreviaturas .....	2
Resumo .....	3
<i>Abstract</i> .....	4
Introdução.....	5
Materiais e Métodos .....	7
Cancro da mama: da célula à molécula .....	8
Biópsia líquida: uma ferramenta no estudo do cancro da mama.....	12
Células em circulação .....	14
Ácidos nucleicos circulantes .....	16
Plaquetas.....	20
Vesículas extracelulares.....	21
Conclusão.....	22
Agradecimentos.....	24
Referências bibliográficas .....	25
Anexos.....	32

## Lista de abreviaturas

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ARN:** ácido ribonucleico

**BRCA:** *breast cancer gene*

**CA 15.3:** *cancer antigen 15.3*

**CD:** *cluster de diferenciação*

**CEA:** *carcinoembryonic antigen*

**CTCs:** células tumorais circulantes

**cfADN:** *cell free* ácido desoxirribonucleico

**ctADN:** *cell tumor* ácido desoxirribonucleico

**ESR1:** recetor de estrogénio 1

**EpCAM:** *epithelial cellular adhesion molecule*

**exo-miARN:** microARN exossomal

**HER:** *human epidermal growth factor receptor*

**ncARN:** ARN longo não codificante

**MRP:** *multidrug resistance protein*

**mARN:** ácido ribonucleico mensageiro

**miARN:** micro ácido ribonucleico

**MUC:** mucina

**PD-L:** *programmed death-ligand*

**PAI-1:** *plasminogen activator inhibitor-1*

**PIK3CA:** fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase

**RE:** recetor de estrogénio

**RP:** recetor de progesterona

**uPA:** *urokinase-type plasminogen activator*

## Resumo

O cancro da mama é a neoplasia mais comum e com maior mortalidade em mulheres a nível mundial. Esta entidade engloba um conjunto de alterações histológicas e moleculares complexas dos ductos e lóbulos mamários, cujo diagnóstico definitivo se baseia na classificação histopatológica, imunohistoquímica e molecular. Contudo, as estratégias de diagnóstico atualmente estabelecidas não são capazes de estudar o tumor em toda a sua extensão e, com isso, refletir a sua heterogeneidade.

Com o surgimento de terapêuticas cada vez mais dirigidas, a necessidade de instrumentos para diagnóstico, caracterização e monitorização terapêutica destes doentes é progressivamente maior. Por isso, novas combinações de biomarcadores são a base de algoritmos de diagnóstico e seguimento cada vez mais complexos. Neste contexto, a biópsia líquida posiciona-se como uma importante ferramenta na classificação do tipo tumoral, das suas características moleculares e da sua evolução temporal. Esta permite identificar e estudar o tipo e a quantidade de células tumorais circulantes, ácidos nucleicos tumorais, vesículas extracelulares e outros marcadores tumorais em circulação, fornecendo uma visão dinâmica da doença, fora do seu microambiente tumoral, de forma minimamente invasiva e com a possibilidade de obtenção de amostras seriadas.

Apesar de permitir acompanhar a resposta terapêutica e detetar o desenvolvimento de resistências de forma rápida e precoce, esta tecnologia ainda não dispensa os métodos de diagnóstico atualmente vigentes. Mesmo não tendo validade clínica completamente reconhecida, nem ser recomendado o seu uso na maioria das *guidelines* internacionais, a expectativa é de que a biópsia líquida seja usada para deteção de doença em fase precoce ou metastática, monitorização em tempo real e seleção das doentes para os protocolos terapêuticos mais adequados e personalizados.

**Palavras-chave:** *biópsia líquida; cancro da mama; biomarcadores tumorais; células tumorais circulantes; ADN tumoral circulante; vesículas extracelulares.*

## Abstract

Breast cancer is the most common neoplasm and has the highest mortality rate in women worldwide. This entity includes a set of complex histological and molecular alterations of the breast ducts and lobules, whose definitive diagnosis is based on histopathological, immunohistochemical and molecular classification. However, the diagnostic strategies currently established are not able to study the tumor to its full extent and thereby reflect its heterogeneity.

With the emergence of increasingly targeted therapies, the need for tools that allow diagnosis, characterization and therapeutic monitoring of these patients is increasing. Therefore, new combinations of biomarkers are the basis for increasingly complex diagnostic and follow-up algorithms. In this context, liquid biopsy is positioned as an important tool in classifying the tumor type, its molecular characteristics and its temporal evolution. It allows the identification and study of the type and quantity of circulating tumor cells, tumor nucleic acids, extracellular vesicles and other tumor markers, providing a dynamic perspective of the disease, outside its tumor microenvironment, in a minimally invasive way and with the possibility of obtaining serial samples.

Although this technology allows monitoring the therapeutic response and detecting the development of resistance quickly and early, it still is not capable to dismiss the diagnostic methods currently used. Even though its clinical validity is not fully recognized and its use is not recommended in most international guidelines, the expectation is that liquid biopsy will be a method for detection of early-stage or metastatic disease, real-time monitoring, and selection of patients for the most appropriate and personalized therapeutic protocols.

**Keywords:** *liquid biopsy; breast cancer; tumor biomarkers; circulating tumor cells; circulating tumor DNA; extracellular vesicles.*

# Introdução

O cancro da mama é a neoplasia mais comum e com maior mortalidade no sexo feminino a nível mundial, estimando-se que, só na União Europeia, seja responsável por 99 000 óbitos anuais. (1,2) A sua incidência tem aumentado, particularmente nas idades mais avançadas, um possível reflexo de uma população cada vez mais envelhecida e da implementação de programas de rastreio em idades mais precoces. O mesmo pode ser afirmado quanto à sua prevalência, devido à melhoria e à diversificação dos tratamentos disponíveis.(1)

O cancro da mama corresponde a um espectro de entidades que, no momento do diagnóstico, podem variar desde lesões *in situ*, até doença metastática, englobando um conjunto de alterações histológicas e moleculares complexas dos ductos e lóbulos mamários.(3) O diagnóstico assenta em três pilares: avaliação clínica, estudo imagiológico e estudo anatomopatológico. Não obstante, o diagnóstico definitivo baseia-se na classificação histopatológica e molecular, através da descrição do tipo e grau histológicos e da caracterização por um painel imunohistoquímico e molecular.(2) Esta categorização é fundamental para a estratificação do risco e definição de um plano terapêutico, traduzindo-se, juntamente com outros dados clínicos, num prognóstico individual.

Com uma caracterização molecular cada vez mais complexa, surgem também terapêuticas cada vez mais dirigidas. O advento desta medicina de precisão, explica a necessidade que urge para encontrar instrumentos de diagnóstico, seguimento e monitorização terapêutica cada vez mais personalizados. Neste contexto, a biópsia líquida posiciona-se como uma importante ferramenta na classificação do tipo tumoral, da sua heterogeneidade e da sua evolução. Este método baseia-se na colheita, de forma minimamente invasiva, e análise de virtualmente qualquer fluido, fisiológico ou patológico: sangue, urina, derrames serosos, entre outros.(4,5) Partindo de fluidos biológicos, cuja colheita é mais simples e menos invasiva que uma biópsia de agulha oca ou excisional, este tipo de amostragem permite de igual modo analisar o microambiente tumoral e encontrar analitos e metabolitos muito mais variados do que os estudados numa amostra anatomopatológica.(4)

Esta técnica baseia-se em pressupostos transversais a qualquer processo neoplásico: aumento do índice mitótico, perda de adesão celular e libertação para a corrente sanguínea (ou outros fluidos) de fragmentos celulares e moleculares, embora com uma semivida bastante curta, variando entre uma a duas horas.(6) Os compostos que podem ser alvo de estudo são extremamente diversos, agrupando-se em cinco categorias major: células tumorais circulantes (CTCs), ácidos nucleicos tumorais livres, proteínas tumorais em circulação, vesículas extracelulares (sobretudo exossomas) e plaquetas.(5)

No cancro da mama, as células tumorais em circulação, fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) e ácido ribonucleico (ARN), os exossomas e as plaquetas transformadas pelo tumor são os alvos de maior interesse nos estudos científicos publicados até à data. A informação fornecida por estes compostos prende-se com a sua identificação em circulação, a sua quantificação e a caracterização molecular. Assim, estes dados contribuem para o diagnóstico, mas sobretudo para uma avaliação do prognóstico e da resposta terapêutica, nomeadamente a existência de resistências

terapêuticas, de forma mais precoce, quando comparado com as tecnologias atualmente disponíveis. Ter acesso a amostras de todos os locais onde possa existir lesão, detetar alterações que possam ser intervencionadas, permitir a amostragem em doentes cuja biópsia não seja possível ou seja muito complexa, são outras vantagens que a biópsia líquida inclui.(7)

O estabelecimento de critérios para a aplicação da biópsia líquida, como algo verdadeiramente útil na prática clínica, tem-se demonstrado um objetivo complexo. Estabelecer um limiar a partir do qual as células tumorais em circulação têm valor diagnóstico e/ou prognóstico, identificar mutações genéticas particulares e acionáveis (como alterações nos níveis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase [*PIK3CA*] e do recetor de estrogénio 1 [*ESR1*]) e estudar padrões de expressão génica e alterações epigenéticas, correlacionando essas informações com o prognóstico, a evolução clínica e utilidade terapêutica, fazem parte do caminho a percorrer, a fim de estabelecer que informação fornecida pela biópsia líquida é, de facto, útil na prática clínica.(8)

Através desta revisão bibliográfica propõe-se interpretar, com base nas evidências atuais, o interesse da biópsia líquida no cancro da mama, sobretudo no cancro da mama precoce. Pretende-se compilar a evidência mais recente sobre o papel da biópsia líquida no diagnóstico, prognóstico, monitorização e terapêutica do cancro da mama. Analisar-se-á a aplicabilidade clínica atual e o potencial futuro da biópsia líquida no manejo desta doença e tentar-se-á expor potenciais oportunidades de investigação na área dos biomarcadores tumorais circulantes. Esta compilação permitirá o conflito e a complementação entre diferentes literaturas e culminará numa visão geral, atual e encadeada deste tema, expondo as necessidades de investigação do mesmo e permitindo a criação e exploração de novas hipóteses e ideias, capazes de conduzir a uma melhor compreensão desta tecnologia e da sua aplicabilidade.

## Materiais e Métodos

Para a concretização deste projeto foi realizada uma pesquisa nas bases de dados *PubMed* e *ClinicalKey*, entre maio e outubro de 2022, recorrendo principalmente às palavras-chave: *biópsia líquida*, *cancro da mama* e *biomarcadores tumorais*. Foram selecionados artigos de revisão ou investigação, escritos em língua inglesa, publicados entre os anos de 2018 e 2022. Adicionalmente, alguns artigos foram obtidos a partir das sugestões dos próprios motores de busca. Paralelamente, procedeu-se à análise dos artigos relevantes para o tema deste trabalho, bem como as referências mais pertinentes dos mesmos.

O trabalho está estruturado de modo a abordar o cancro da mama, os marcadores moleculares mais relevantes e o que pode ou não ser estudado pela biópsia líquida, tentando esclarecer que dados existem para a aplicação clínica: desde o diagnóstico ao prognóstico e resposta terapêutica.

Deste modo, na primeira secção, o trabalho começa por expor o modo como se estuda o cancro da mama, os marcadores validados e algoritmos de abordagem do doente, passando pela caracterização das tecnologias disponíveis e painéis moleculares e a sua utilidade em obter informação relevante. Nas secções seguintes, é abordado o papel da biópsia líquida e a panóplia de novos marcadores que têm surgido em função do tipo de molécula ou célula.

## Cancro da mama: da célula à molécula

O cancro da mama não é uma só entidade, mas representa um espectro de subtipos moleculares. A compreensão desta heterogeneidade é fundamental para o desenvolvimento de intervenções preventivas, diagnósticas e terapêuticas, que expressam resultados clínicos distintos.(9) Os vários modelos explicativos exploram a célula estaminal como unidade promotora da diversidade inter e intratumoral e mecanismos de evolução clonal, estabelecendo que a iniciação e a progressão tumorais são predominantemente impulsionadas por alterações genéticas. Dados mais recentes também atribuem importância a alterações epigenéticas e ao microambiente tumoral.(1,10,11) Assim, o estudo da lesão assenta em três pilares: estudo clínico, estudo anatomopatológico e estudo molecular e estes podem ser mais ou menos explorados consoante a natureza benigna ou maligna da lesão.(11)

O diagnóstico do cancro da mama pode iniciar-se num programa de rastreio ou através de sinais e sintomas mais ou menos específicos que motivem um estudo. Constatada a suspeita, é necessário uma detalhada anamnese e um exame objetivo completo que integre exame físico mamário, estudo de cadeias ganglionares e avaliação neurológica sumária. Segue-se o estudo imagiológico. Este pode ser orientado de forma concomitante para diagnóstico e estadiamento, em função das características de cada doente: mamografia e/ou ecografia mamária e/ou ressonância magnética. Localizada a lesão, é necessário uma amostra histológica, que preferencialmente é uma biópsia.(1)

O estudo anatomopatológico é efetuado de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde.(1,12) Os dois tipos histológicos mais comuns são o carcinoma invasivo sem outra especificação (anteriormente denominado carcinoma ductal invasivo), representando 70 a 75% dos casos, e o carcinoma lobular invasivo que representa 12 a 15%. Todos os outros subtipos são considerados raros e o seu somatório representa 5% dos tipos histológicos.(1,11)

A confirmação e a caracterização da lesão advêm do estudo anatomopatológico. O relatório deve descrever o tipo histológico, o grau, o perfil imunohistoquímico de biomarcadores como os recetores de estrogénio (RE), os recetores de progesterona (RP), os recetores do *human epidermal growth factor receptor* (HER) 2 e o Ki67 (marcador do índice proliferativo celular). Deste estudo resulta a classificação do carcinoma invasivo em quatro subtipos: luminal A-like, luminal B-like, HER2 puro e o triplo negativo.(1,13) A *Tabela 1* mostra uma versão mais detalhada desta classificação.

Em casos selecionados é necessário o estudo da amplificação do gene *HER2* por hibridização *in situ*. Note-se que, caso o estudo imunohistoquímico seja negativo para RE, RP e HER2 este deverá ser repetido na peça operatória para esclarecer se é um falso negativo (questões técnicas relacionadas com a colheita e processamento da amostra), ou se este perfil é o de um tumor verdadeiramente triplo negativo ou uma situação de heterogeneidade intratumoral. Nestes casos, a avaliação da peça é a que prevalece. Caso a biópsia seja HER2 positiva é obrigatório repetir o estudo na peça operatória nos carcinomas de grau I sem outra especificação que sejam RE e RP positivos ou nos triplos negativos.(1) Também podem ser estudados marcadores genómicos [*breast cancer gene* (BRCA) 1, BRCA2 e PIK3CA], imunomarcadores (linfócitos infiltrantes no tumor e *programmed death-ligand* [PD-L] 1) e

marcadores de angiogénese.(10) O padrão dos linfócitos tumorais infiltrantes permite antecipar o padrão de resposta (completa, incompleta ou ausente) à quimioterapia e tem valor prognóstico nos tumores triplo negativo e nos tumores HER2 positivos: por cada 10% de aumento no *score* de linfócitos verifica-se um aumento da sobrevivência de 15% a 20%.(1,14,15) Também é possível estudar os níveis de *urokinase-type plasminogen activator (uPA)* e *plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)* através do imunoensaio enzimático uPA/PAI-1 (*FEMTELLE™ uPA/PAI-1 ELISA; Sekisui Diagnostics*), que avalia o potencial metastático de um tumor. Apesar do seu nível de valor prognóstico em doentes com cancro da mama, este teste não é amplamente utilizado. Isto provavelmente decorre da exigência de uma quantidade muito substancial de tecido ultracongelado, nem sempre compatível com a quantidade de amostra disponível ou com o seu método de fixação inicial.(1,16) Todos os marcadores anteriormente referidos são estudos *in situ* e atualmente utiliza-se apenas uma parte da amostra para estes estudos.

Havendo indicação cirúrgica, após a excisão da lesão o estudo anatomopatológico deve contemplar o número, a localização e o diâmetro máximo do tumor, bem como as suas margens; o número total de gânglios positivos em relação aos colhidos e a extensão do envolvimento ganglionar, bem como todo o estudo histológico e molecular anteriormente descrito.(1)

Com a necessidade de proceder a uma estratificação mais detalhada do risco de recorrência e uma determinação mais precisa do prognóstico utilizam-se ensaios multigénicos como o *Oncotype DX™ Recurrence Score* que permite o estudo de vinte e um genes (*Genomic Health*), *Prosigna PAM50™ (NanoString Technologies)*, o *MammaPrint™* que permite o estudo de setenta genes (*Agendia*), *Endopredict™ (Myriad Genetics)* e o *Breast Cancer Index™ (Biotheranostics, Inc)*. Estes ensaios, exceto o *MammaPrint™ (17)*, são aplicados em doentes com tumores RE positivos e com doença em fase precoce para distinguir os grupos onde o risco de recorrência é maior e quais os que irão beneficiar de determinado protocolo de quimioterapia.(11)

O sistema de estadiamento para o cancro da mama deve ser feito de acordo com a 8ª edição da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, utilizando o sistema de classificação *Tumor primário, Gânglio linfático e Metástase*, comumente designado por *TNM*.(18) O estadiamento dá uma visão anatómica da doença e acaba por informar sobre o prognóstico e a evolução expectável. No cancro da mama precoce o estadiamento é sobretudo dirigido para a doença locoregional.(1) O estágio da doença no momento do diagnóstico tem uma relação importante com o prognóstico: deteção de doença localizada no momento do diagnóstico associa-se a 99% de probabilidade de sobrevivência a 5 anos quando comparado aos 27% nas doentes com metastização.(19,20)

Cerca de 10% de todos os casos de cancro da mama têm uma predisposição genética e história familiar positiva, com importantes variações geográficas. As mutações da linha germinativa mais comuns são os genes *BRCA1* e *BRCA2*, com risco cumulativo de 70%.(10) Estes doentes têm um seguimento clínico distinto.(1)

A compreensão do padrão molecular tem sido determinante na criação de novas terapias, mas a realidade é que os mecanismos de resistência são ainda desconhecidos.(21) Os marcadores validados que permitem a seleção de doentes para terapias endócrinas e anti-HER2 são os

imunohistoquímicos, respetivamente, os RE e RP e o HER2.(17) A evolução tumoral e o facto disto se traduzir num perfil molecular dinâmico durante a terapêutica sistémica, revela um grande desafio em obter o controlo da doença.(1,22) O ideal seria identificar a resistência terapêutica numa fase precoce e poder, com base na mesma, modificar o algoritmo terapêutico de modo a otimizar o mesmo.(21)

Para além destes marcadores moleculares que permitem classificar e orientar a terapêutica (*Tabela 1*), do ponto de vista genético, importa também estudar as mutações do *ESR1*, *PIK3CA*, amplificação e mutações do *HER2* e mutações reversas do *BRCA*, pois estas podem também ser alvos terapêuticos, quando encontradas e utilizadas no momento correto.(1,17)

Os marcadores de prognóstico no cancro da mama são usados como indicadores de agressividade, da capacidade invasiva e da extensão da propagação do tumor. Assim, permitem correlacionar a sobrevivência independentemente da terapêutica sistémica e podem ser utilizados para seleccionar doentes de elevado risco.(23)

O prognóstico para o cancro da mama depende de vários fatores, nomeadamente do seu estágio no momento do diagnóstico. (18,23) No carcinoma da mama precoce os fatores prognósticos mais relevantes são: o tamanho do tumor, o tipo e o grau histológicos, o grau e o padrão de expressão de RE e RP, o status HER2 e o marcador de proliferação Ki67. Também o número de gânglios linfáticos envolvidos, e invasão tumoral perivascular são relevantes.(1,18) Importa referir que há parâmetros clínicos como a idade, que aliados à informação anterior, dão uma estimativa da recorrência e da probabilidade da sobrevivência nestes doentes.(18) O tipo e o grau histológico têm cada vez menor valor prognóstico. Mas um fator mantém-se: quanto maior o grau histológico, menor a diferenciação tumoral e pior o prognóstico.(9)

A progressão da doença vai depender dos processos de regulação da transição epitélio-mesênquima, hipóxia, desmoplasia e o processo de angiogénese. São igualmente importantes as modificações moleculares que participam na proliferação e crescimento da célula, na regulação do seu ciclo, na ativação de oncogenes e perda de função de genes supressores de tumores, com desregulação da apoptose e da senescência.(24–26) Assim, os marcadores moleculares com maior valor prognóstico são marcadores moleculares clássicos como: RE, RP, Ki67, HER2 e novos: p53, p14<sup>ARF</sup>, ciclina D1, ciclina E, *T-box transcription factor2/3*, BRCA1 e 2 e fator vascular de crescimento endotelial. Estes novos marcadores moleculares foram escolhidos do ponto de vista do envolvimento no regulamento das vias de supressão tumoral p53 e do retinoblastoma, da reparação do ADN e nas vias envolvidas na angiogénese, que desempenham papéis críticos no desenvolvimento do cancro da mama.(1,17,23)

Para além dos marcadores moleculares há também os chamados marcadores tumorais, cujo estudo serológico é feito através de amostras de sangue.(27–29) Os marcadores mais utilizados no cancro da mama são o *cancer antigen (CA) 15.3* e o *carcinoembryonic antigen (CEA)*.(28) O CA 15.3 é um produto proteico do gene *mucina (MUC) 1* (30), que está envolvido na adesão celular, diminuindo a agregação célula a célula e a adesão à matriz extracelular e induz uma ação imunossupressora, facilitando a formação de metástases. Por outro lado, o CEA é uma glicoproteína oncofetal

normalmente expressa pelas células das mucosas.(31) Ambos os marcadores descritos apresentam sensibilidades e especificidades muito baixas. Isto invalida o seu uso no diagnóstico precoce do cancro da mama ou a sua utilização em doentes assintomáticos. Contudo, estes marcadores pareceram demonstrar bons resultados na deteção precoce de recorrências, em particular na doença metastática.(1)

Apesar de alguns estudos sugerirem que níveis séricos elevados de CA 15.3 e CEA facultam informações prognósticas significativas, a utilidade destes marcadores continua controversa.(29) O *European Group on Tumor Markers* recomenda o uso de CA 15.3 e CEA para determinar prognóstico, na deteção precoce da progressão da doença e na monitorização do tratamento.(28) Por outro lado, *The American Society of Clinical Oncology* não recomenda o seu uso para rastreio do cancro da mama, vigilância de rotina, nem para monitorização da resposta à terapêutica.(27,28)

## **Biópsia líquida: uma ferramenta no estudo do cancro da mama**

A biópsia líquida é o processo de obtenção, através de técnicas minimamente invasivas, de materiais circulantes em fluídos biológicos ou materiais passíveis de serem fluidificados.(5) Geralmente esta colheita é feita por punção ou aspiração. No caso dos estudos em cancro da mama, o fluido biológico mais utilizado é o sangue. Os compostos estudados podem ser células, vesículas celulares, plaquetas e produtos metabólicos ou biomoléculas como ADN e ARN (identificando-se vários subtipos) e proteínas. Virtualmente, qualquer célula ou molécula em circulação pode ser colhida através deste tipo de biópsia.(32)

A literatura sugere que a cascata de fenómenos de transformação tumoral que culminam com a metastização é composta por: perda de adesão entre as células da lesão primitiva devido a alterações genótípicas e fenotípicas; disrupção da membrana basal por fenómenos de degradação e invasão das estruturas adjacentes; circulação no sistema linfático e sanguíneo; evasão aos mecanismos locais e sistémicos de deteção e eliminação pelo sistema imune; formação de conglomerados celulares estáveis à distância e com capacidade de formação de micrometástases; adaptação e reprogramação genética e epigenética dos tecidos e do estroma com evolução para macrometástases. Importa referir que este processo pode ser mais ou menos sequencial, havendo etapas que ocorrem de forma paralela.(24,33)

A lesão neoplásica é uma entidade dinâmica. Todo este mecanismo de transformação está presente desde a formação da lesão primitiva e há alterações que se vão acumulando ao longo do tempo, nomeadamente nos elementos em circulação.(34) São estes os pressupostos utilizados para saber que fluídos biológicos colher e que analitos estudar. Exemplo disso, é o estudo de *Garcia-Murillas et al.* que demonstrou que a deteção de alterações genéticas no ADN de células tumorais em circulação se correlacionava positivamente com as alterações posteriormente detetadas em metástases, ao invés das identificadas na lesão primária.(35)

Esta modalidade de obtenção de material para análise na patologia oncológica tem-se tornado progressivamente mais atrativa para investigadores e clínicos. Ao comparar com os métodos de obtenção de material histológico (como a biópsia por agulha oca ou a biópsia excisional), verifica-se que possibilita uma amostragem seriada e hipoteticamente, sem restrição de quantidade de amostra. Este tipo de colheita também não é limitada pelo tamanho da lesão (5) e possibilita a identificação e caracterização célula a célula.(36,37) Todas estas características da biópsia líquida vão permitir identificar a variabilidade intratumoral e até intertumoral em qualquer momento da doença, algo que é inatingível com as tecnologias e metodologias atualmente disponíveis.(32) Assim, obtém-se uma visão holística da doença, longitudinalmente no tempo e transversalmente no espaço, de forma dirigida. É este tipo de estudo que, utilizando a informação genética e molecular específica de cada doente, vai possibilitar estabelecer níveis de estratificação de risco evolutivo e permitir o tratamento individualizado.(38)

Não obstante, reconhecem-se limitações: em cada amostra colhida os analitos podem não existir numa quantidade suficiente para serem detetados (apesar de atualmente já existirem estratégias de concentração de amostra). Também depende da identificação de alterações genéticas que tenham utilidade clínica e que acrescentem valor ao seguimento clínico, o que ainda não está totalmente caracterizado e compreendido. Neste momento não há dados validados que permitam a utilização da biópsia líquida no rastreio do cancro da mama, na sua deteção precoce e na avaliação da resposta a uma determinada terapêutica.(32) Até à data não existem ensaios clínicos prospetivos que validem a sua implementação na clínica.(20)

Através da biópsia líquida podem-se colher amostras para o diagnóstico e apoio ao estadiamento, para o seguimento da resposta terapêutica e avaliação após a terapêutica.(4) Quando comparada a outras tecnologias, a sua capacidade para detetar de forma mais precoce a recidiva é mais um elemento revelador do seu potencial. O perfil molecular de uma lesão que no momento do diagnóstico esteja em estágio I, II ou na presença de doença metastizada é distinto.(6) Ainda não estão identificados marcadores suficientes para otimizar o uso da biópsia líquida em cada uma destas etapas de forma isolada. Atualmente não há nenhum algoritmo ou tecnologia relacionada com a biópsia líquida autorizada pela Agência Europeia do Medicamento para utilização clínica para cancro da mama precoce.(39)

Ao longo da evolução normal da doença, o perfil molecular do tumor altera-se. Esta mudança torna-se ainda mais evidente e importante nos casos em que há algum tipo de pressão biológica sobre o tumor. É o que acontece com a terapêutica. É uma seleção natural e artificial, respetivamente, dos vários clones tumorais.(40)

Apesar do sucesso que inicialmente muitas terapias apresentam, verifica-se que o cancro da mama, tal como outras neoplasias, acaba por desenvolver mecanismos de resistência. O tratamento é uma forma de pressão biológica sobre o tumor que seleciona os clones a ele resistentes. Todo este processo pode levar ao insucesso do tratamento ou à recidiva. Por isso, urge a necessidade de criar ferramentas capazes de detetar e monitorizar em tempo real a evolução da doença.(20)

No âmbito da patologia mamária tem sido cada vez mais discutido a utilização de aspirados mamilares. Este tipo de aspirado é realizado em mulheres sem perda de fluido mamilar de origem aparentemente patológica. Isto corresponde à aspiração do líquido intraductal mamário produzido pelas células luminiais.(41)

Este tipo de amostra tem ganho protagonismo porque se assume que os fluidos intraductais têm uma maior proximidade ao tumor e, por isso, os biomarcadores neles contidos são mais representativos do processo patológico locoregional. Importa também referir que este tipo de amostra está mais protegida de contaminantes moleculares dado que não circula em todo o organismo.(41,42) Isto pode ser uma grande vantagem quando comparado com o sangue ou a linfa. Contudo, estes aspirados têm uma baixa densidade celular apesar de serem molecularmente mais ricos, sobretudo quando comparados com sangue. Além disso, este tipo de amostragem proporciona um controlo intra-paciente que permite comparar lesões unilaterais com a mama contralateral não afetada.(41,43)

Três estudos recentes sugeriram como os aspirados mamilares podem ser usados na detecção precoce do cancro da mama.(43,44) *Shaheed et al.* sugere a utilização destes aspirados como primeiro passo no rastreio do cancro da mama, seguido da análise de amostras por espectroscopia de massa ou a utilização de um *kit* de autocolheita.(44) *Zubor et al.* sugere, a utilização destas aspirados como coadjuvantes no estudo de mulheres com tecido mamário muito denso ou fatores de risco adicionais relacionados com o cancro da mama.(43)

Uma limitação importante é o pequeno volume deste tipo de amostra, geralmente entre 1 a 500  $\mu\text{L}$ . Isto também se associa a variações importantes na composição e viscosidade que podem inviabilizar a análise.(41,45) Outra limitação importante é o reconhecimento de que a lesão pode não estar representada no aspirado porque oclui os ductos com o seu efeito de massa.(41)

Esta forma de obter amostras ainda não apresenta validade no estudo de biomarcadores e, conseqüentemente, não tem utilidade clínica reconhecida até à data.(41)

## **Células em circulação**

As CTCs ou células tumorais livres em circulação são células tumorais que se destacam do tecido neoplásico de forma ativa ou passiva (32), permanecendo na corrente sanguínea por um curto período de tempo. Podem ser divididas em dois grupos *major*: células do tipo epitelial e do tipo mesenquimatoso. Para além da identificação destas células em circulação, podem-se identificar e quantificar biomarcadores celulares utilizáveis no estudo do cancro da mama.(7)

Os critérios analíticos para definir uma CTC baseiam-se nos fenómenos anteriormente descritos de evolução tumoral e são: estrutura compatível com morfologia celular; ter dimensões superiores a  $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ ; conter um núcleo, marcando positivamente com o 4',6'-diamino-2-fenil-indol (marcador nuclear); marcar positivamente para citoqueratinas (marcador pan-citoqueratina: clone C11 e citoqueratina 19: clones A53-B/A2); e não marcar para o *cluster* de diferenciação (CD) 45.(6)

Esta definição não é particular do cancro da mama. Nela podem-se enquadrar: células intactas, grandes células apoptóticas e aglomerados circulantes de CTCs. O seu surgimento em circulação resulta da libertação, de forma passiva, de células da massa tumoral primitiva e inibição da anoiquia.(25) No entanto, a libertação destas células pode ser o resultado de um mecanismo ativo, associado ao ganho de mobilidade celular. Todos estes fenómenos estão envolvidos no processo de formação de micrometástases.(6) As CTCs são o elemento de transição entre a massa tumoral primitiva e os focos metastáticos.(46) Esta transformação expressa uma alteração fenotípica por perda de características epiteliais e ganho de características mesenquimatosas ou até mesmo transformação em células estaminais.(33,46)

Existem muitas tecnologias disponíveis para colheita e estudo de CTCs. Não obstante, o *CellSearch™ Circulating Tumor Cell Kit (Veridex)* destina-se à contagem de células tumorais circulantes de origem epitelial (utilizando os marcadores: CD45 negativo, *epithelial cellular adhesion molecule* (EpCAM) positivo e citoqueratinas 8, 18, e/ou 19 positivas) em sangue total.(47–49) O *CellSearch™* é o equipamento mais utilizado no estudo de CTCs no cancro da mama. Existe também o *AdnaTest™ (AdnaGen AG)* para o cancro da mama que estuda em CTCs os genes *MUC-1*, *HER2* e *EpCAM* em doentes com cancro da mama metastático.(32,38) No caso do cancro da mama precoce, as CTCs também podem ser estudadas em amostra de linfa (50) e em aspirados mamilares.(41)

Segundo alguns autores, a utilização das CTCs na avaliação do cancro da mama precoce é discutível. Isto porque a sua quantidade em circulação é reduzida, por vezes impossibilitando mesmo a sua deteção, ao contrário do que se verifica na doença metastática.(32)

A caracterização molecular das CTCs assenta sobretudo no estudo de: EpCAM, *lysine-specific demethylase 1* (marcador da transição epitelial-mesenquimatosa) e PD-L1. Importa ainda referir que há outros marcadores que permitem distinguir entre doença precoce e doença metastática. No cancro da mama precoce, as CTCs não expressam CD47 nem PD-L1, mas expressam níveis mais elevados de *signal transducer and activator of transcription 3* e *toll-like receptor 4*. Para além das alterações estruturais encontradas nas células em circulação, nestas há uma maior expressão de genes associados a resistências à quimioterapia, como o *multidrug resistance protein (MRP) 1*, *MRP2*, *MRP4*, *MRP5*, *MRP7*, *multidrug resistance mutation 1*, *excision repair 1* e *endonuclease non-catalytic subunit 1*.(7)

Nos casos de cancro da mama precoce, a monitorização pós terapia pode ser uma forma de perceber e avaliar a doença residual mínima e o risco de recorrência ou recidiva. Verificou-se que não há aumento da expressão de *ESR1* (seja *wild type* ou mutado) nas células tumorais circulantes em doentes com resistências adquiridas à terapêutica endócrina.(32) A grande limitação do cancro da mama precoce é a quantidade necessária para validar um resultado e torná-lo reproduzível e o facto de ser técnica/ equipamento dependente. Assim, as células tumorais em circulação têm potencial para ser utilizadas para avaliação da resposta ao tratamento. Todavia, não têm utilidade na seleção do tipo dos fármacos a utilizar.(7)

A quantificação e a caracterização do tamanho, da forma e de marcadores de superfície celulares são os elementos atualmente mais estudados. Há uma relação inversa entre a contagem de CTCs e a progressão livre de doença. Nos estudos de *Janni et al.* e de *Bidard et al.*, demonstrou-se que nos doentes com doença entre estágio I e III, deteção de pelo menos uma CTC em circulação, se relacionava com um menor tempo livre de doença e, nas doentes com doença metastática, aquelas com cinco ou mais células por 7,5mL de sangue tinham um menor intervalo livre de doença, respetivamente.(51,52) Quanto maior a contagem celular em relação à amostra de referência ou entre amostras, menor é o tempo livre de doença e a sobrevivência em geral. Também se verifica que quanto maior a contagem de células do tipo mesenquimatoso (quando comparadas com as do tipo epitelial) maior o risco de progressão e desenvolvimento de doença metastática.(53) Estes resultados são

dependentes do tipo de algoritmo e técnica utilizados para identificar as CTCs. Se o sistema usado for *Cellsearch*<sup>™</sup> os resultados anteriormente descritos são verdadeiros, mas para o sistema *AdnaTest*<sup>™</sup> isto não se verifica.(54)

## Ácidos nucleicos circulantes

A presença de ácidos nucleicos em circulação, em particular no sangue, decorre de um processo fisiológico.(55) O ADN que é encontrado em circulação denomina-se *cell free* ADN (cfADN) e, no contexto da patologia neoplásica, é possível encontrar uma subpopulação, denominada de *cell tumor* ADN (ctADN). A maior fração de cfADN tem origem em processos de senescência celular. O ctADN em circulação depende principalmente do tipo de tumor, da carga tumoral, da taxa de crescimento da lesão e se o doente já realizou algum tipo de terapêutica. Assim, estas moléculas são diretamente libertadas pelas células da massa tumoral (por exocitose ou durante processos de necrose e apoptose) e, uma pequena percentagem destes fragmentos, pode ter origem nas CTCs.(6)

No cancro da mama, o cfADN é estudado com três grandes objetivos: a sua quantificação, a avaliação da sua integridade e o estudo de alterações genéticas e epigenéticas.(8,32) Este estudo pode ser realizado de duas formas: o estudo dirigido e o estudo não dirigido. No cancro da mama, o estudo dirigido é a identificação e a caracterização de variantes conhecidas e com interesse na intervenção do doente, geralmente utilizando marcadores com elevada sensibilidade e especificidade e já identificados, por exemplo, através da peça operatória. Por outro lado, a estratégia não dirigida envolve o estudo de todos os exões codificantes e sequenciação genómica completa de ADN. Isto não implica conhecimento prévio acerca do genoma tumoral.(56) A grande vantagem do estudo não dirigido é a possibilidade de identificar novas variantes e de criar um perfil de referência que possa ser utilizado ao longo do tempo, na monitorização de um doente. A desvantagem é que nem sempre se sabe o valor informativo destas variantes, associados a limiares de deteção superiores, conduzindo a uma menor especificidade e com custos mais elevados.(21)

Há uma grande variabilidade na quantidade de cfADN de doente para doente e entre amostras do mesmo doente. Isto pode comprometer a representatividade da amostra, limitando a imagem que o investigador obtém da heterogeneidade tumoral. Este fenómeno pode ser exacerbado por questões técnicas relacionadas com o processamento da amostra e contaminação por variantes não associadas ao tumor. Estudos demonstraram que há um número significativo de casos nos quais se verifica uma discordância entre o perfil tumoral e o perfil obtido através da biópsia líquida, o que pode colocar questões sobre a amostragem e a sensibilidade e especificidade dos biomarcadores utilizados.(8,57) Estas discrepâncias podem ser explicadas pelos baixos níveis de fragmentos mutados em circulação ou à ocorrência natural de variantes que não estão associadas ao tumor, nomeadamente as que surgem por hematopoiese clonal.(8,58)

Alguns estudos identificam o cfADN como um biomarcador capaz de detetar precocemente o cancro da mama. Isto baseia-se na sua quantificação, caracterização dos danos no ADN e em modificações do seu padrão de metilação. O estudo de *Kamel et al.* verificou que o índice de integridade de ADN é muito inferior em doentes com cancro da mama, quando comparados com doentes com lesões benignas ou até indivíduos saudáveis. Este estudo também conseguiu correlacionar o índice com o estágio da doença no momento do diagnóstico.(59) No estudo de *Cohen et al.*, utilizando o *CancerSEEK™*, (um teste sanguíneo concebido para identificar oito tipos de cancro, incluindo o cancro da mama) foi possível identificar os doentes com cancro da mama através da deteção de dezasseis mutações distintas em ctADN.(60) No estudo de *Beaver et al.* avaliou-se a presença de mutações no *PIK3CA* em ctADN de doentes com diagnóstico histológico prévio e demonstrou-se que esta estratégia apresentava uma sensibilidade de 93,3% e uma especificidade de 100% para a deteção da doença em fase precoce.(61) No entanto, como revelou o estudo de *Board et al.*, nas doentes com cancro da mama precoce a deteção de mutações no gene *PIK3CA* através do ctADN é dependente da técnica utilizada(62) e *Lee et al.*, mostrou que os testes disponíveis para avaliar os genes *P53*, *PIK3CA*, e o *ESR1* através do estudo de ácidos nucleicos circulantes não têm utilidade no diagnóstico da doença.(32,63)

O estudo da perda de heterozigotia em quatro marcadores importantes no cancro da mama - D13S159, D13S280, D13S282 na região 3q31-33 e D10S1765 no gene *PTEN* na região 10q23.31 - revelou que há diferenças entre indivíduos saudáveis e indivíduos com patologia mamária, contudo não consegue distinguir lesões benignas de lesões malignas.(64)

O estudo do padrão de metilação do ctADN tem ganho protagonismo como um biomarcador alternativo para a deteção do cancro da mama. Estudos têm demonstrado que é possível identificar alterações no padrão de metilação do ctADN, capazes de identificar qual a lesão primária, nos casos em que a sua localização não está determinada.(20) Atualmente decorre um ensaio clínico pela *GRAIL Inc.* para determinar o potencial do padrão de metilação num genoma completo, como ferramenta de deteção de doença precoce. Os resultados preliminares mostram que em 60% das doentes com tumores recetores hormonais negativos em fase precoce e 18% de tumores recetores hormonais positivos, em fase precoce, podem ser detetados com uma especificidade de 99%.(20,65) Até à data não existem dados que suportem a utilização do cfADN para rastreio e diagnóstico no cancro da mama precoce.(20,32)

A existência de alvos terapêuticos bem caracterizados é um dos fatores pelos quais a biópsia líquida é particularmente útil no cancro da mama, nomeadamente o uso de ctADN como marcador da eficácia terapêutica após quimioterapia neoadjuvante e/ou cirurgia. Através do estudo do ctADN podem-se reconhecer subclones celulares, que surgem ou são selecionados durante o tratamento.(21,66) Através da sequenciação do ctADN prevê-se o perfil molecular da recidiva de forma mais precisa, quando comparado com a sequenciação da lesão primária, podendo a concordância de perfis do ctADN atingir os 57%. Isto pode permitir orientar de forma mais adequada o tratamento. Um caso importante, é a quantificação e identificação de mutações no gene *ESR*. Mutações do *ESR1* são usadas como forma de se avaliar a aplicabilidade dos inibidores da aromatase, na terapia endócrina.

Há estudos que mostram que as mutações estão ausentes ou são mínimas na lesão primária e, por pressão exercida pelos inibidores da aromatase, podem ser adquiridas ao longo da terapia endócrina. Através da quantificação e identificação de mutações no gene *ESR1* em ctADN pode-se prever a resistência à terapêutica.(32)

Uma palavra para a avaliação do padrão de metilação no estudo da resposta terapêutica. Este padrão tem sido estudado no gene *ras association domain family member 1* no ctADN: ausência ou redução da metilação deste gene está relacionada com uma resposta à quimioterapia neoadjuvante, verificando-se o inverso quando há metilação ou hipermetilação. A ausência de metilação no ctADN relaciona-se com resposta terapêutica completa.(32)

O que também se tem revelado importante é o tamanho dos fragmentos em circulação. *Agostini et al.*, mostrou que, nos doentes com cancro da mama em estádios mais avançados, os fragmentos de ctADN em circulação são de grandes dimensões e que o seu tamanho tem uma relação positiva com estágio tumoral. São por isso marcadores que poderão ter interesse no estadiamento e prognóstico.(32)

Verifica-se que os níveis plasmáticos de ctADN têm melhor valor na identificação da progressão da doença, de forma mais precoce, que o CEA e o CA 15.3, e com melhor concordância imagiológica, conseguindo antecipar até 5 meses o diagnóstico em relação ao aparecimento dos primeiros achados imagiológicos.(21,52) O papel do ctADN como marcador de prognóstico é contraditório, pois, utilizando a mesma metodologia, há estudos com resultados discordantes. Todavia, verifica-se que para além da avaliação da sua quantidade, a quantificação e caracterização do tipo de mutações é um fator importante.(8,67)

Recentemente, a análise ctADN utilizando sequenciação de nova geração foi introduzida na prática clínica, para detetar alterações genómicas em tumores sólidos. Existem duas tecnologias que são utilizadas no estudo de ctADN através de biópsia líquida, em doentes com doença avançada: *Guardant360 CDx™* (*Guardant Health, Inc.*), que pode detetar alterações em mais de sessenta genes, e *FoundationOne® Liquid CDx*, que pode identificar mutações ou alterações em mais de trezentos genes, suportando o tratamento de uma forma individualizada, considerando as características únicas de cada tipo de cancro.(7)

Em 2020 a Agência Europeia do Medicamento aprovou o *Therascreen™ PIK3CA RGQ* como teste de apoio ao diagnóstico de mutações do gene *PIK3CA*. Este teste avalia onze mutações, de modo a identificar as doentes elegíveis para tratamento com alpelisib, no tratamento de mulheres pós-menopáusicas, e de homens, com cancro da mama localmente avançado ou metastático com mutação *PIK3CA*, com recetor hormonal positivo, HER2 negativo, depois de progressão da doença com terapêutica endócrina em monoterapia.(28)

O estudo do ARN pode ser feito a partir de fragmentos livres ou em células em circulação. Através da biópsia líquida é possível isolar CTCs e estudar o seu padrão de expressão de ARN. No cancro da mama destaca-se o estudo do ARN mensageiro (mARN) e do microARN (miARN). No

entanto, outros tipos de ARN como o microARN exossomal (exo-miARN) e o ARN longo não codificante (lncARN) já surgem referenciados em estudos atuais.(6)

O miARN é a molécula mais importante. O seu envolvimento na expressão de genes que regulam a angiogénese, aliado à sua pequena dimensão e a elevada quantidade circulante, tornam-no num marcador importante para prever o comportamento tumoral.(34) Há um aspeto diferenciador, quando comparado com o ctADN: nos doentes com cancro da mama precoce a quantidade de miARN circulante é muito superior ao de ctADN.(6,68)

A utilização do ARN em circulação tem mostrado potencial no rastreio e diagnóstico. Estes marcadores permitem fazer a distinção entre indivíduos saudáveis vs indivíduos doentes. Ao contrário de outros marcadores referidos neste trabalho, há vários estudos que utilizam amostras para além do sangue, destacando-se as amostras de urina. Também o ARN tem mostrado potencial na discriminação dos vários tipos de cancro da mama. Vários tipos de miARN podem ser utilizados no diagnóstico do cancro da mama precoce. No estudo de *Shimomura et al.* avaliou-se a expressão miARN, estabelecendo uma combinação de cinco miARNs (miR-1246, miR-1307-3p, miR-4634, miR-6861-5p, e miR-6875-5p) capaz de identificar os doentes com cancro da mama e ainda distinguir os que tinha doença *in situ* de formas mais avançadas.(69) O estudo de *Zhong et al.* analisou lncARN H19 (é o produto da expressão de um oncogene associado à proliferação celular, invasão, e apoptose) e observou que a sua expressão estava significativamente aumentada no sangue das doentes com cancro da mama, quando comparados com indivíduos saudáveis.(70)

Dois estudos revelaram o potencial do estudo da miARN em urina. *Erbes et al.* realizou um estudo para identificar perfis de miARN (miR-21, miR-125b, miR-451, e miR-155) no sangue e em urina, permitindo-lhes discriminar de forma reprodutível doentes com cancro da mama precoce e indivíduos saudáveis, em ambos os tipos de amostras.(71) Também *Hirschfeld et al.* identificou a expressão diferencial de quatro miARNs (miR-424, miR-423, miR-660, e let7-i) na urina de doentes com cancro da mama, distinguindo-os de controlos saudáveis.(72) A urina como potencial amostra relaciona-se com o facto do ARN ter um tempo médio em circulação de dezasseis minutos, com uma importante eliminação renal e com níveis em amostras de urina facilmente detetáveis.(7)

A aplicação do ARN para prever a resposta terapêutica também tem sido estudada. Em alguns casos, o aumento de miR-148<sup>a</sup>-3p e miR-374<sup>a</sup>-5p no sangue estão associados a uma resposta completa, após terapia neoadjuvante baseada em trastuzumab. No estudo de *Li et al.*, procedeu-se ao estudo da expressão de miARN como marcador passível de prever a resistência ao tratamento com trastuzumab, em doentes com lesões HER2 positivas metastizadas no momento do diagnóstico, e conclui-se que o miARN é importante marcador de resistência, em particular o miR-940.(6) Não obstante, ainda não existem dados que validem a aplicação do ARN na escolha e na monitorização terapêuticas.

O estudo do ARN também fornece dados acerca da forma como evolui a expressão génica durante a progressão tumoral. Estudo de *Rodríguez et al.* mostra que o aparecimento ou aumento da expressão de miR-21-5p, miR-222-3p, miR-221-3p, miR-155-5p, e miR-105-5p se relaciona com variantes mais

agressivas de cancro da mama e com uma progressão mais rápida da doença. Destacam-se o miR-21 e o miR-155, porque a sua expressão está associada a um aumento de células tumorais livres em circulação.(7,73)

A investigação do ARN permite perceber quais são as alterações genéticas somáticas em genes codificante, e, adicionalmente, como refletem a expressão dos genes, podem ser importantes informadores sobre alterações epigenéticas e alterações em vias de sinalização molecular.(6,74) Todavia, não foi possível encontrar evidência de que o ARN tenha valor para diagnóstico e prognóstico no cancro da mama precoce.(75)

## Plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos que se encontram na circulação sanguínea. São entidades dinâmicas, capazes de interagir com as CTCs e com os ácidos nucleicos tumorais circulantes.(6)

No cancro da mama destacam-se as plaquetas educadas pelo tumor. São plaquetas que após interação com CTCs, cfADN ou ctADN adquirem moléculas endémicas do tumor, ficando protegidas da degradação ou transformação por outros agentes biológicos.(76) Estas plaquetas ficam hiperativadas e há o aumento da sua contagem durante um processo de desenvolvimento tumoral. Há estudos que descrevem estes compostos como fundamentais para a metastização no cancro da mama, uma vez que o ARN tumoral altera o funcionamento plaquetar de modo a facilitá-la. As plaquetas têm uma capacidade de adesão muito particular e são capazes de transportar sinalizadores tumorais. Paralelamente, estas não são reconhecidas por células do sistema imune e, por isso, não são eliminadas. Estes fragmentos plaquetares vão guiar e estabilizar as lesões endoteliais secundárias, promovendo a criação de focos de novas lesões, pois são capazes de secretar fatores de crescimento e fatores promotores da angiogénese.(6,58,77)

A sequenciação do ARN das plaquetas educadas pelo tumor poderá ser usada para diagnóstico como demonstrado pelo estudo de *Best et al.* Neste estudo foi possível identificar o tipo de lesão primitiva, em aproximadamente 71% dos casos, e distinguir entre lesões HER2 positivas, lesões com mutações do gene *PIK3CA* ou identificar lesões do tipo triplo negativo. Atualmente não há protocolos ou algoritmos validados para aplicação clínica destes marcadores no rastreio, diagnóstico ou acompanhamento de doentes com cancro da mama.(6,78)

## Vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares são estruturas circulantes muito heterogêneas. Estas podem ter três origens distintas: fragmentos de membrana citoplasmática, exossomas de pequeno diâmetro com origem em endossomas multivesiculares e fragmentos membranares de plaquetas, após interação com CTCs ou ácidos nucleicos tumorais circulantes.(6) Estas vesículas, para além de ADN e ARN, também integram proteínas e lípidos que ficam protegidos da degradação enzimática e eliminação imunitária. São um reflexo da célula onde se formam.(32,79)

O seu papel no cancro da mama está relacionado com a capacidade de promover o crescimento tumoral, crescimento celular e a invasão dos tecidos adjacentes. Estas vesículas transportam moléculas capazes de criar um ambiente favorável à formação de nichos celulares à distância.(79) Entre as substâncias transportadas, estão também moléculas de adesão, como a EpCAM, ou fatores de crescimento. O trabalho de *Li et al.* mostra o estudo combinado do recetor do fator de crescimento epitelial, EpCAM e HER2 nos exossomas pode distinguir uma doente com cancro da mama de um indivíduo saudável.(80)

Atualmente não existe uma tecnologia padronizada para estudo destes compostos no cancro da mama. Estes biomarcadores não têm validade clínica, uma vez que não há metabolitos ou moléculas identificados com valor no diagnóstico, ou seguimento da terapêutica, ou prognóstico nos doentes com cancro da mama.(79)

## Conclusão

Uma lesão tumoral é um conjunto de componentes biológicos capazes de se influenciarem sinergicamente. A compreensão de que estas lesões e, em particular, o cancro da mama, são dinâmicas no tempo e no espaço, permite estabelecer vários alvos passíveis de serem estudados, com uma utilidade que se estende do diagnóstico até ao tratamento.(26)

Com este trabalho é possível entender que a biópsia líquida poderá ser usada em qualquer fase do desenvolvimento do cancro da mama, havendo analitos mais informativos e mais específicos do que outros.(38) Não obstante, ainda não existe um teste ou um painel de biomarcadores que possam ser aplicados e que tenham sensibilidade e especificidade suficientemente elevadas ou validade clínica, para substituírem os testes de diagnóstico e prognóstico em vigor.(7,38)

Apesar da biópsia líquida ser uma ferramenta com potencial no estudo evolutivo do cancro mama, várias são as limitações que se podem identificar.(38) Mesmo com amostragens seriadas, em cada amostra há compostos cuja concentração é muito reduzida, como as plaquetas ou os ácidos nucleicos. Por sua vez, os ácidos nucleicos encontram-se muito fragmentados e degradados para poderem ser analisados corretamente recorrendo às tecnologias atualmente disponíveis. No futuro, a otimização e generalização destas mesmas tecnologias criará novas formas de abordagem ao cancro da mama. Assim, a biópsia de tecido mantém-se como a referência para estudo anatomopatológico e molecular, com aplicação diária na clínica e com benefícios bem estabelecidos para o tratamento das doentes.(32)

Importa ainda salientar que, possivelmente num futuro não muito distante, a biópsia líquida terá um papel relevante em todas as doentes, em particular no subgrupo em que a biópsia do tecido tumoral não é possível ou está contraindicada. Oferece também a possibilidade de monitorizar a resposta à terapêutica e estimar o risco de progressão da doença, ainda antes de haver alterações clínicas e imagiológicas detetáveis. Nestes casos destacam-se as CTCs e o ctADN.(32)

As CTCs e o ctADN são indiscutivelmente os biomarcadores, de entre os que podem ser obtidos pela biópsia líquida, mais bem estudados no cancro da mama. Prova disso é a existência de sistemas de deteção comercializados e algoritmos com aplicabilidade clínica, nomeadamente o *Cellsearch*<sup>®</sup> e o *Therascreen*<sup>™</sup> *PIK3CA* *RGQ*. Estes podem determinar se há mutações com papel na resposta à terapêutica e ter uma visão mais personalizada do prognóstico.(32)

Uma vez que as atuais ferramentas de rastreio do cancro da mama são baseadas na imagem, este só pode ser detetado após formação de uma lesão. Assim, a biópsia líquida, particularmente os aspirados mamilares, pode ter valor acrescentado para a deteção do cancro da mama numa fase precoce.(41)

Independentemente do tipo de amostra colhida há um denominador comum no estudo dos biomarcadores: estes têm que estar em circulação nos fluídos biológicos, têm que ter tempos de semivida relativamente longos e quantidade e estabilidade que permitam a sua colheita e deteção. Ou

seja, a biópsia líquida tem pouca vantagem no estudo de marcadores *in situ*, como os padrões estudados por imunohistoquímica, os linfócitos infiltrantes do tumor ou os marcadores da angiogénese. (6) Assim, esta tecnologia promissora ainda necessita de mais estudos que identifiquem de forma mais robusta o seu potencial na Oncologia e, em particular, no cancro da mama precoce.

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Ricardo Roque, pela disponibilidade e orientação. Agradeço todo o seu apoio na partilha de conhecimento científico e clínico e toda a motivação e compreensão ao longo da realização deste trabalho.

À Professora Doutora Margarida Figueiredo Dias, por estimular a realização deste trabalho e pelo apoio à realização deste projeto.

À minha família.

A todos os que, mesmo não estando identificados de forma individual, se mostram sempre disponíveis para apoiar os meus projetos académicos e pessoais.

## Referências bibliográficas

1. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019;30(8):1194–220. Erratum in: *Ann Oncol.* 2019 Oct 1;30(10):1674. Erratum in: *Ann Oncol.* 2021 Feb;32(2):284.
2. Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC. Early breast cancer. *Lancet.* 2009;373(9673):1463–79.
3. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(1):27–35.
4. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):131.
5. Lone SN, Nisar S, Masoodi T, Singh M, Rizwan A, Hashem S, et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer.* 2022;21(1):79.
6. Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clin Genet.* 2019;95(6):643–60.
7. Freitas AJA de, Causin RL, Varuzza MB, Calfa S, Hidalgo Filho CMT, Komoto TT, et al. Liquid Biopsy as a Tool for the Diagnosis, Treatment, and Monitoring of Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17): 9952.
8. Duque G, Manterola C, Otzen T, Arias C, Galindo B, Mora M, et al. Clinical utility of liquid biopsy in breast cancer: A systematic review. *Clin Genet.* 2022;101(3):285–95.
9. Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H. Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers (Basel).* 2022;14(10): 2569.
10. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. *Lancet.* 2021;397(10286):1750–69.
11. Nascimento RG do, Otoni KM. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology.* 2020;30:1–8.
12. Sinn HP, Kreipe H. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. *Breast Care.* 2013;8(2):149–54.
13. Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(6):698–707.
14. Wein L, Savas P, Luen SJ, Virassamy B, Salgado R, Loi S. Clinical Validity and Utility of Tumor-

- Infiltrating Lymphocytes in Routine Clinical Practice for Breast Cancer Patients: Current and Future Directions. *Front Oncol.* 2017;7:156.
15. Dieci MV, Radošević-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Br. *Semin Cancer Biol.* 2018;52(Pt 2):16–25.
  16. Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: today and tomorrow. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(3):434–44.
  17. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Hayes DF. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Summary. *J Oncol Pract.* 2016;12(4):384–9.
  18. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer—Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(4):290–303.
  19. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7–30.
  20. Davidson BA, Croessmann S, Park BH. The breast is yet to come: current and future utility of circulating tumour DNA in breast cancer. *Br J Cancer.* 2021;125(6):780–8.
  21. Chan JCH, Chow JCH, Ho CHM, Tsui TYM, Cho WC. Clinical application of circulating tumor DNA in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2021;147(5):1431–42.
  22. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer.* 2017;75:284–98.
  23. Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, et al. Classical and novel prognostic markers for breast cancer and their clinical significance. *Clin Med Insights Oncol.* 2010;4:15–34.
  24. Wang Y, Zhou BP. Epithelial-mesenchymal Transition---A Hallmark of Breast Cancer Metastasis. *Cancer Hallm.* 2013;1(1):38–49.
  25. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3481–98.
  26. Martinez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(10):669–80.
  27. Lee JS, Park S, Park JM, Cho JH, Kim SI, Park B-W. Elevated levels of preoperative CA 15-3

- and CEA serum levels have independently poor prognostic significance in breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013;24(5):1225–31.
28. Shao Y, Sun X, He Y, Liu C, Liu H. Elevated Levels of Serum Tumor Markers CEA and CA15-3 Are Prognostic Parameters for Different Molecular Subtypes of Breast Cancer. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133830.
  29. Zhang J, Wei Q, Dong D, Ren L. The role of TPS, CA125, CA15-3 and CEA in prediction of distant metastasis of breast cancer. *Clin Chim Acta*. 2021;523:19–25.
  30. National Library of Medicine: Medline Plus. Function *MUC1* Gene [documento da Internet]. Definitions. 2020. p. 1–4. (atualizado a 1 de junho 2013; citado a 15 de janeiro de 2023). disponível em: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/muc1/31>.
  31. Uygur MM, Gümüş M. The utility of serum tumor markers CEA and CA 15-3 for breast cancer prognosis and their association with clinicopathological parameters. *Cancer Treat Res Commun*. 2021;28:100402.
  32. Tay TKY, Tan PH. Liquid biopsy in breast cancer: A focused review. *Arch Pathol Lab Med*. 2021;145(6):678–86.
  33. Silva ATF, Rodrigues CM, Ferreira ICC, Santos LLD, Santos DW, Araújo TG, et al. A Novel Detection Method of Breast Cancer through a Simple Panel of Biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19):11983
  34. Seale KN, Tkaczuk KHR. Circulating Biomarkers in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2022;22(3):e319–31.
  35. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015;7(302):302ra133.
  36. Martins I, Ribeiro IP, Jorge J, Gonçalves AC, Sarmiento-Ribeiro AB, Melo JB, et al. Liquid Biopsies: Applications for Cancer Diagnosis and Monitoring. Vol. 12, *Genes*. 2021;12(3):349.
  37. Alix-Panabieres C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov*. 2021;11(4):858–73.
  38. Markou A, Tzanikou E, Lianidou E. The potential of liquid biopsy in the management of cancer patients. *Semin Cancer Biol*. 2022;84:69–79.
  39. Autorizações e Pareces da Agência Europeia do Medicamento sobre tecnologias ou metodologias relacionadas com a biópsia líquida na espécie humana. Consultado em dezembro de 2022. Available from: <https://www.ema.europa.eu>
  40. De Mattos-Arruda L, Siravegna G. How to use liquid biopsies to treat patients with cancer. *ESMO*

open. 2021;6(2):100060.

41. Patuleia SIS, Suijkerbuijk KPM, van der Wall E, van Diest PJ, Moelans CB. Nipple Aspirate Fluid at a Glance. Vol. 14, *Cancers*. 2021;14(1):159.
42. Sauter ER. Analysis of nipple aspirate fluid for diagnosis of breast cancer: an alternative to invasive biopsy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005; 1;5(6):873–81.
43. Zubor P, Kubatka P, Kajo K, Dankova Z, Polacek H, Bielik T, et al. Why the Gold Standard Approach by Mammography Demands Extension by Multiomics? Application of Liquid Biopsy miRNA Profiles to Breast Cancer Disease Management. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12):2878
44. Shaheed S, Tait C, Kyriacou K, Linforth R, Salhab M, Sutton C. Evaluation of nipple aspirate fluid as a diagnostic tool for early detection of breast cancer. *Clin Proteomics*. 2018;15(1):3.
45. Mannello F, Medda V, Tonti GA. Protein profile analysis of the breast microenvironment to differentiate healthy women from breast cancer patients. *Expert Rev Proteomics*. 2009;6(1):43–60.
46. Ellsworth RE, Blackburn HL, Shriver CD, Soon-Shiong P, Ellsworth DL. Molecular heterogeneity in breast cancer: State of the science and implications for patient care. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;64:65–72.
47. Liang DH, Hall C, Lucci A. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2020;215:127–45.
48. Bidard F-C, Fehm T, Ignatiadis M, Smerage JB, Alix-Panabières C, Janni W, et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32(1):179–88.
49. Bidard F-C, Michiels S, Riethdorf S, Mueller V, Esserman LJ, Lucci A, et al. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(6):560–7.
50. Han M, Watts JA, Jamshidi-Parsian A, Nadeem U, Siegel ER, Zharov VP, et al. Lymph Liquid Biopsy for Detection of Cancer Stem Cells. *Cytom Part A*. 2021;99(5):496–502.
51. Janni WJ, Rack B, Terstappen LWMM, Pierga J-Y, Taran F-A, Fehm T, et al. Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(10):2583–93.
52. Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):406–14.
53. Cayrefourcq L, Alix-Panabieres C. Clinical relevance of liquid biopsy in breast cancer: update in

2020. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20(9):913–9.
54. Müller V, Riethdorf S, Rack B, Janni W, Fasching PA, Solomayer E, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System™ and AdnaTest Breast™ in metastatic breast cancer patients: the DETECT study. *Breast Cancer Res.* 2012;14(4):R118.
  55. Poulet G, Massias J, Taly V. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytol.* 2019;63(6):449–55.
  56. Ellsworth RE, Blackburn HL, Shriver CD, Soon-Shiong P, Ellsworth DL. Molecular heterogeneity in breast cancer: State of the science and implications for patient care. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;64:65–72.
  57. Mueller C, Haymond A, Davis JB, Williams A, Espina V. Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research. *Expert Rev Proteomics.* 2018;15(2):131–52.
  58. Heidrich I, Ačkar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K. Liquid biopsies: Potential and challenges. *Int J Cancer.* 2021;148(3):528–45.
  59. Kamel AM, Teama S, Fawzy A, El Deftar M. Plasma DNA integrity index as a potential molecular diagnostic marker for breast cancer. *Tumour Biol.* 2016;37(6):7565–72.
  60. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science.* 2018;359(6378):926–30.
  61. Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, Cochran R, Croessmann S, Zabransky DJ, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20(10):2643–50.
  62. Board RE, Wardley AM, Dixon JM, Armstrong AC, Howell S, Renshaw L, et al. Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120(2):461–7.
  63. Lee J-H, Jeong H, Choi J-W, Oh HE, Kim Y-S. Liquid biopsy prediction of axillary lymph node metastasis, cancer recurrence, and patient survival in breast cancer: A meta-analysis. *Medicine.* 2018;97(42):e12862.
  64. Schwarzenbach H, Müller V, Milde-Langosch K, Steinbach B, Pantel K. Evaluation of cell-free tumour DNA and RNA in patients with breast cancer and benign breast disease. *Mol Biosyst.* 2011;7(10):2848–54.
  65. Cohn AL, Seiden M, Kurtzman KN, Hubbell E, Gross S, Venn O, et al. The Circulating Cell-free Genome Atlas (CCGA) Study: Follow-up (F/U) on non-cancer participants with cancer-like cell-free DNA signals. *J Clin Oncol.* 2019;37(15\_suppl):5574. ClinicalTrials.gov registration number: NCT02889978.
  66. Turner NC, Reis-Filho JS. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol.*

- 2012;13(4):e178-85.
67. Freeland A, Brown LJ, Parker A, Segara D, Portman N, Lau B, et al. Molecular Biomarkers for Contemporary Therapies in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Genes*. 2021;12(2):285.
  68. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol*. 2012;6(6):590–610.
  69. Shimomura A, Shiino S, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Matsuzaki J, et al. Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci*. 2016;107(3):326–34.
  70. Zhong G, Wang K, Li J, Xiao S, Wei W, Liu J. Determination of Serum Exosomal H19 as a Noninvasive Biomarker for Breast Cancer Diagnosis. *Onco Targets Ther*. 2020;13:2563–71.
  71. Erbes T, Hirschfeld M, Rücker G, Jaeger M, Boas J, Iborra S, et al. Feasibility of urinary microRNA detection in breast cancer patients and its potential as an innovative non-invasive biomarker. *BMC Cancer*. 2015;15:193.
  72. Hirschfeld M, Rücker G, Weiß D, Berner K, Ritter A, Jäger M, et al. Urinary Exosomal MicroRNAs as Potential Non-invasive Biomarkers in Breast Cancer Detection. *Mol Diagn Ther*. 2020;24(2):215–32.
  73. Rodríguez-Martínez A, de Miguel-Pérez D, Ortega FG, García-Puche JL, Robles-Fernández I, Exposito J, et al. Exosomal miRNA profile as complementary tool in the diagnostic and prediction of treatment response in localized breast cancer under neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1):21.
  74. Gold B, Cankovic M, Furtado L V, Meier F, Gocke CD. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn*. 2015;17(3):209–24.
  75. Li J, Guan X, Fan Z, Ching L-M, Li Y, Wang X, et al. Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10).
  76. Risitano A, Beaulieu LM, Vitseva O, Freedman JE. Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood*. 2012;119(26):6288–95.
  77. Cayrefourcq L, Alix-Panabières C. Clinical relevance of liquid biopsy in breast cancer: update in 2020. *Expert Rev Mol Diagn*. 2020;20(9):913–9.
  78. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell*. 2015;28(5):666–76.
  79. Li D, Lai W, Fan D, Fang Q. Protein biomarkers in breast cancer-derived extracellular vesicles for use in liquid biopsies. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021;321(5):C779–97.

80. Li B, Liu C, Pan W, Shen J, Guo J, Luo T, et al. Facile fluorescent aptasensor using aggregation-induced emission luminogens for exosomal proteins profiling towards liquid biopsy. *Biosens Bioelectron.* 2020;168:112520.

## Anexos

**Tabela 1** - Classificação do cancro da mama

Subtipo molecular		Biomarcadores	Grau histológico	Prognóstico	Tratamento
Luminal A		RE positivo HER2 negativo Ki67 baixo RP elevado Se disponível: padrão molecular de baixo risco	Bem diferenciado (Grau I)	Bom	Endócrino
Luminal B	Luminal B-like (HER2 negativo)	RE positivo HER2 negativo Ki67 elevado ou RP baixo Se disponível: padrão molecular de alto risco	Moderadamente diferenciado (Grau II)	Intermédio	Endócrino Quimioterapia
	Luminal B-like (HER2 positivo)	RE positivo HER2 positivo			Endócrino Quimioterapia
HER2		HER2 positivo ER e RP ausentes	Pouco diferenciado (Grau III)	Mau	Quimioterapia Terapia dirigida
Basal – like (Triplo negativo)		RE e RP ausentes HER2 negativo	Pouco diferenciado (Grau III)	Mau	Quimioterapia Inibidores PARP

*Adaptado do Consenso de St Gallen, 2013. A) Índice mitótico: Ki-67 deve ser avaliado em função da mediana de referência do laboratório; b) cuttt-off sugerido é 20%; c) em 80% dos casos há uma sobreposição entre os tumores triplo negativos e basal like. Este último inclui outras variantes histológicas: carcinoma infiltrado por linfócitos, carcinoma secretor, carcinoma metaplásico de baixo-grau e carcinoma adenóide quístico (PARP: Poly (ADP-ribose) polymerases).*

