



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento de plataformas biotecnológicas para a biópsia líquida do câncer
de mama utilizando células tumorais circulantes e saliva**

Aluna: Alinne Tatiane Faria Silva

Orientadora: Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA - MG

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A
BIÓPSIA LÍQUIDA DO CÂNCER DE MAMA UTILIZANDO CÉLULAS
TUMORAIS CIRCULANTES E SALIVA**

Aluna: Alinne Tatiane Faria Silva

Orientadora: Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área Genética)**

UBERLÂNDIA - MG

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

| | |
|--------------|---|
| S586 2022 | <p>Silva, Alinne Tatiane Faria, 1992- Desenvolvimento de plataformas biotecnológicas para a biópsia líquida do câncer de mama utilizando células tumoriais circulantes e saliva [recurso eletrônico] / Alinne Tatiane Faria Silva. - 2022.</p> <p>Orientadora: Yara Cristina de Paiva Maia. Coorientador: Luiz Ricardo Goulart. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.13 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Genética. I. Maia, Yara Cristina de Paiva ,1975-, (Orient.). II. Goulart, Luiz Ricardo ,1962-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.</p> <p>CDU: 575</p> |
|--------------|---|

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS BIOTECNOLÓGICAS PARA A
BIÓPSIA LÍQUIDA DO CÂNCER DE MAMA UTILIZANDO CÉLULAS
TUMORAIS CIRCULANTES E SALIVA**

ALUNA: ALINNE TATIANE FARIA SILVA

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia (Orientadora)

Examinadores: Dra. Emília Rezende Vaz (Membro Externo)
Dr. Rafael Malagoli Rocha (Membro Externo)
Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart (Membro Interno)
Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira (Membro Interno)
Dra. Mariana Alves Pereira Zóia (Suplente)
Dra. Ana Paula Carneiro Santos (Suplente)

Data da Defesa: 31 /01 /2022

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PPGGB para o formato da Tese foram contempladas

PROFA. DRA. YARA CRISTINA DE PAIVA MAIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

| | | | | | |
|------------------------------------|---|-----------------|--------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em: | Genética e Bioquímica | | | | |
| Defesa de: | Doutorado Acadêmico - Nº 03/2022 PPGGB. | | | | |
| Data: | Trinta e um de janeiro de dois mil e vinte e dois. | Hora de início: | 13:00h | Hora de encerramento: | 16:10 |
| Matrícula do Discente: | 11723GBI001 | | | | |
| Nome do Discente: | Alinne Tatiane Faria Silva | | | | |
| Título do Trabalho: | Desenvolvimento de plataformas biotecnológicas para a biópsia líquida do câncer de mama utilizando células tumorais circulantes e saliva. | | | | |
| Área de concentração: | Genética | | | | |
| Linha de pesquisa: | Biologia Molecular e Celular. | | | | |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | Biomarcadores para o prognóstico e efetividade do tratamento do câncer de mama: Isolamento de células tumorais circulantes e caracterização de marcadores de transição epitélio-mesênquima. | | | | |

Aos trinta e um dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e dois, às 13:00 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Cisco Webex*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha, Dr^a. Emília Rezende Vaz, Prof^a. Dr^a. Vivian Alonso Goulart, Prof. Dr. Carlos Ueira Veira e Prof.^a Dr.^a Yara Cristina de Paiva Maia, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, Prof.^a Dr.^a Yara Cristina de Paiva Maia apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADA

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram

encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Ueira Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/01/2022, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Malagoli Rocha, Usuário Externo**, em 31/01/2022, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/01/2022, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emília Rezende Vaz, Usuário Externo**, em 31/01/2022, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Yara Cristina de Paiva Maia, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/01/2022, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3339929** e o código CRC **0BB9C170**.

DEDICATÓRIA

*A todas as mulheres que
gentilmente doaram um pouco de si.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por iluminar meus passos e permitir a concretização dos meus sonhos.

Aos meus pais, Ana e Ilidio, e minha irmã, Viviane, pelo apoio e amor incondicional. A minha mãe por ser minha fortaleza e motivação diária para superar todos os desafios. Ao meu pai por me ensinar a importância de não deixar nada para depois. A minha irmã por me ensinar o poder da leitura, a importância de questionar e propor minhas próprias soluções.

A Talita pelas incessantes palavras de conforto e incentivo quando os projetos tomavam rumos inesperados.

A Profa. Dra. Yara, que acreditou no meu potencial, compartilhado ideias e por todo o suporte para realização dos projetos.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo, que confiou nas minhas ideias, pelos constantes ensinamentos e pelo incentivo para me tornar uma profissional de excelência. Será sempre meu exemplo de professor e cientista.

Ao Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Nutrição (BioNut), pelas discussões enriquecedoras.

Aos pesquisadores do Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, pela troca constante de conhecimentos.

Ao Dr. Donizeti, Dra. Paula, Dra. Juliana e a todos os profissionais do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia que de alguma forma colaboraram na coleta de amostras biológicas. Vocês foram essenciais para realização desse estudo.

Em especial gostaria de agradecer a todas as pacientes que aceitaram participar da pesquisa, por confiarem no nosso estudo e por me incentivarem a persistir. Vocês me ensinaram a importância da fé e do otimismo.

Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e UFU pelo suporte financeiro.

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (Instituto de Biotecnologia) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU-Uberlândia - MG) sob orientação da Professora Dra. Yara Cristina de Paiva Maia - Coordenadora do Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Nutrição na Universidade Federal de Uberlândia (BioNut - UFU) e coorientação do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| CAPÍTULO I — FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 3 |
| 1. FISIOLOGIA DA MAMA..... | 4 |
| 2. DOENÇAS DA MAMA | 7 |
| 2.1 Doença Benigna da Mama | 7 |
| 2.2 Câncer de Mama | 8 |
| 3. PROGRESSÃO TUMORAL | 13 |
| 4. BIÓPSIA LÍQUIDA | 15 |
| 4.1 Células Tumorais Circulantes..... | 17 |
| 4.2 Saliva | 18 |
| 5. TÉCNICAS MOLECULARES E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL | 19 |
| REFERÊNCIAS..... | 22 |
| CAPÍTULO II — “MÉTODO, PAINEL E KIT PARA O DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DO TRATAMENTO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA” | 33 |
| CAPÍTULO III — “USO DE ALGORITMOS DE APRENDIZADO DE MÁQUINA PARA A DETECÇÃO E TRIAGEM DO CÂNCER DE MAMA” | 35 |
| CONCLUSÕES..... | 37 |

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

| | |
|---|---|
| Figura 1. Anatomia da mama feminina | 3 |
| Figura 2. Histologia da mama..... | 5 |

RESUMO

O câncer de mama (CM) é um importante problema de saúde mundial e é o principal responsável pelas mortes em decorrência do câncer em mulheres. As mortes são, em sua maioria, consequência de metástases à distância e a forma mais efetiva de evitá-las é a detecção do CM em estádios iniciais. O teste padrão ouro para a triagem do câncer de mama é a mamografia e apresenta importantes limitações como restrição ao seu uso em uma faixa etária específica e a constituição física das mamas. Além disso, apresenta altas taxas de resultados falso positivos principalmente por falhar em diferenciar doenças benignas de malignas, ocasionando biópsias teciduais desnecessárias. A biópsia é a única ferramenta capaz de confirmar o diagnóstico de câncer de mama, mas tem a desvantagem de ser altamente invasiva. Diante desse cenário, é de suma importância o desenvolvimento de novas ferramentas ou plataformas que auxiliem na redução de biópsias e outros procedimentos desnecessários. Nesta tese, serão apresentados três capítulos. No capítulo I será abordada uma revisão da literatura sobre o tema da tese. Será descrita a anatomopatologia mamária, os biomarcadores e técnicas mais relevantes que podem solucionar o problema exposto acima. O objetivo é apresentar os conceitos e estudos necessários para a compreensão dos demais capítulos. No capítulo II será abordado um método, painel e kit desenvolvido visando detectar células tumorais circulantes no sangue periférico para diagnóstico do câncer de mama e monitoramento da terapia (Patente 1). Essa patente foi depositada sob o número BR1020200263951 em 22/12/2020 e em 20/12/2021 foi solicitado o PCT da mesma sob o número PCT/BR2021/050561. Encontra-se em fase de validação do protocolo desenvolvido, otimização e estudo prospectivo para confirmação dos parâmetros do monitoramento do tratamento. No capítulo III será apresentado o método desenvolvido de uso de algoritmos de aprendizado de máquina na análise de dados de espectroscopia do infravermelho médio com objetivo de triagem da população feminina pela saliva (Patente 2). Essa patente foi depositada sob o número BR1020210260386 em 22/12/2021 no INPI. Encontra-se em fase de validação do modelo com aumento do número amostral. Logo após o Capítulo III, será apresentada a conclusão da tese e as perspectivas.

Palavras-chave: Câncer de mama, biomarcadores, biópsia líquida

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is an important global health problem and is the main cause of cancer-related deaths in women. Most deaths are a consequence of distant metastases and the most effective way to avoid them is the detection of BC in the early stages. The gold standard test for breast cancer screening is mammography and it has important limitations such as restriction of its use in a specific age group and the physical constitution of the breasts. In addition, it has high rates of false-positive results, mainly because it fails to differentiate between benign and malignant diseases, causing unnecessary tissue biopsies. A biopsy is the only tool able to confirm the diagnosis of breast cancer, but it has the disadvantage of being highly invasive. Given this scenario, it is extremely important to develop new tools or platforms to help reduce biopsies and other unnecessary procedures. In this thesis, three chapters will be presented. In chapter I, a review of the literature on the theme of the thesis will be addressed. Breast anatomy pathology, the most relevant biomarkers, and techniques that can solve the problem exposed above will be described. The objective is to present the concepts and studies necessary to understand the other chapters. In chapter II, a method, panel, and kit developed to detect circulating tumor cells in peripheral blood for breast cancer diagnosis and therapy monitoring (Patent 1) will be discussed. This patent was filed under the number BR1020200263951 on 12/22/2020 and on 12/20/2021 the PCT of the same was requested under the number PCT/BR2021/050561. It is in the phase of validation of the protocol developed, optimization and prospective study to confirm the parameters of treatment monitoring chapter III, the developed method of using machine learning algorithms in the analysis of mid-infrared spectroscopy data to screen the female population by saliva (Patent 2) will be presented. This patent was deposited under the number BR1020210260386 on 12/22/2021 at the INPI. The model is currently being validated with an increase in the sample size. Soon after Chapter III, the conclusion of the thesis and perspectives will be presented.

Keywords: Breast cancer, biomarkers, liquid biopsy

CAPÍTULO I — FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. FISIOLOGIA DA MAMA

A mama é um órgão exclusivo da classe Mammalia, por esse motivo a classe recebe esse nome, tem como função principal sintetizar e secretar leite para a prole (HASSIOTOU; GEDDES, 2013). A mama feminina localiza-se na parede torácica anterior com sua base estendendo-se da segunda a sexta costela. Cerca de dois terços da mama revestem o músculo peitoral maior e um terço restante o músculo serrátil anterior e a porção superior do músculo oblíquo abdominal. Este tecido ainda se estende, quase sempre, para a axila, como a cauda axilar de Spence (FIGURA 1) (PANDYA; MOORE, 2011).

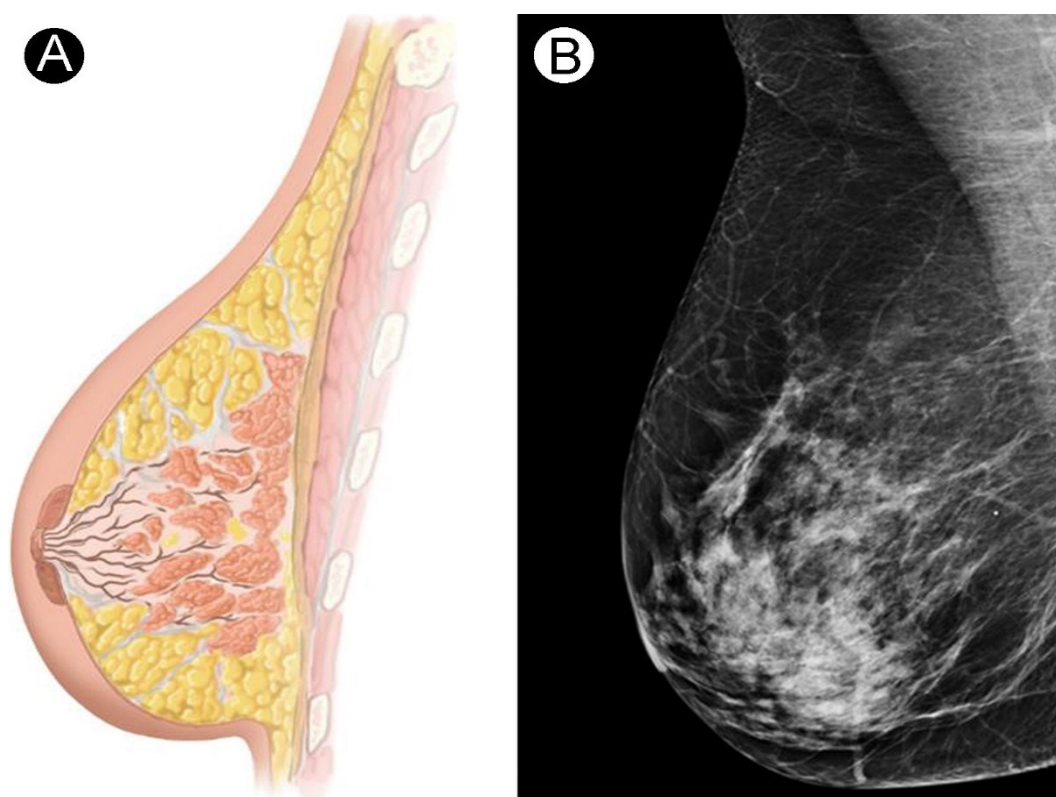


Figura 1. Anatomia da mama feminina: (A) ilustração do seio feminino em corte transversal vertical e (B) visão por mamografia médio-lateral oblíqua (MLO) da mama feminina normal. Figura de JESINGER (2014) com uso autorizado pela RightsLink/Elsevier.

O início do desenvolvimento da mama ocorre durante a quarta semana de vida embrionária, sob influência genética e hormonal, a partir de células precursoras da pele (ectoderma). Ainda no período gestacional, há a formação de ductos que vão conectar o mamilo aos lóbulos em crescimento. Após o nascimento,

a ação de hormônios maternos no desenvolvimento da mama cessa e ela se torna quiescente até a puberdade (JESINGER, 2014).

Na puberdade ocorre o aumento do volume das mamas, com um efeito proliferativo sobre os ductos e sobre o estroma circundante (tecido adiposo e do conjuntivo periductal) além de alongamento e espessamento do sistema ductal. Porém, a glândula mamária atinge o seu estado funcional maduro apenas durante a gravidez/lactação. Nesse período, as células lobulares diferenciam-se para produzir e secretar o leite. Cerca de 25% da ingestão diária de energia é requerida para a produção do leite, caracterizando uma alta demanda metabólica. Com a suspensão da amamentação, as células lobulares retornam ao seu estado de repouso (HARTMANN, 2007; JESINGER, 2014).

Próximo à fase da menopausa, ocorre a involução dos lóbulos e ductos com a atrofia do tecido fibroso adjacente e substituição por tecido conjuntivo e adiposo, resultando em diminuição do tamanho da mama (C. BRUCKER; SCHARBO-DEHAAN, 1991).

A mama é um tecido altamente dinâmico e este processo é controlado pelos hormônios produzidos na hipófise e ovários. O hormônio folículo estimulante e o luteinizante, liberados pela hipófise, estimulam o ovário a liberar estrógeno e progesterona. O estrógeno e progesterona estimulam as mudanças da mama. A prolactina também é liberada pela hipófise e atua em conjunto com o estrógeno e progesterona para a promoção das alterações que ocorrem durante a gravidez/lactação (MCCOOL; STONE-CONDY; BRADFORD, 1998).

A mama é ainda uma glândula cutânea exócrina modificada, composta de pele e tecido subcutâneo, parênquima mamário (ductos e lóbulos) e estroma de suporte, incluindo gordura interposta em uma complexa rede de ligamentos, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (JESINGER, 2014).

Os lóbulos e ductos são formados por duas camadas de células: uma camada interna de células epiteliais luminais e uma camada externa composta de células mioepiteliais (VIDI; BISSELL; LELIÈVRE, 2013). Estes dois tipos celulares podem ser diferenciados pela composição de seu citoesqueleto, ou seja, pelas citoqueratinas (Cks). As células mioepiteliais (compartimento de proliferação) expressam Ck5, Ck6 e Ck14, enquanto as células luminais (compartimento

diferenciado) expressam Ck8 e Ck18 (FIGURA 2) (IYER *et al.*, 2013; MOLL; DIVO; LANGBEIN, 2008) .

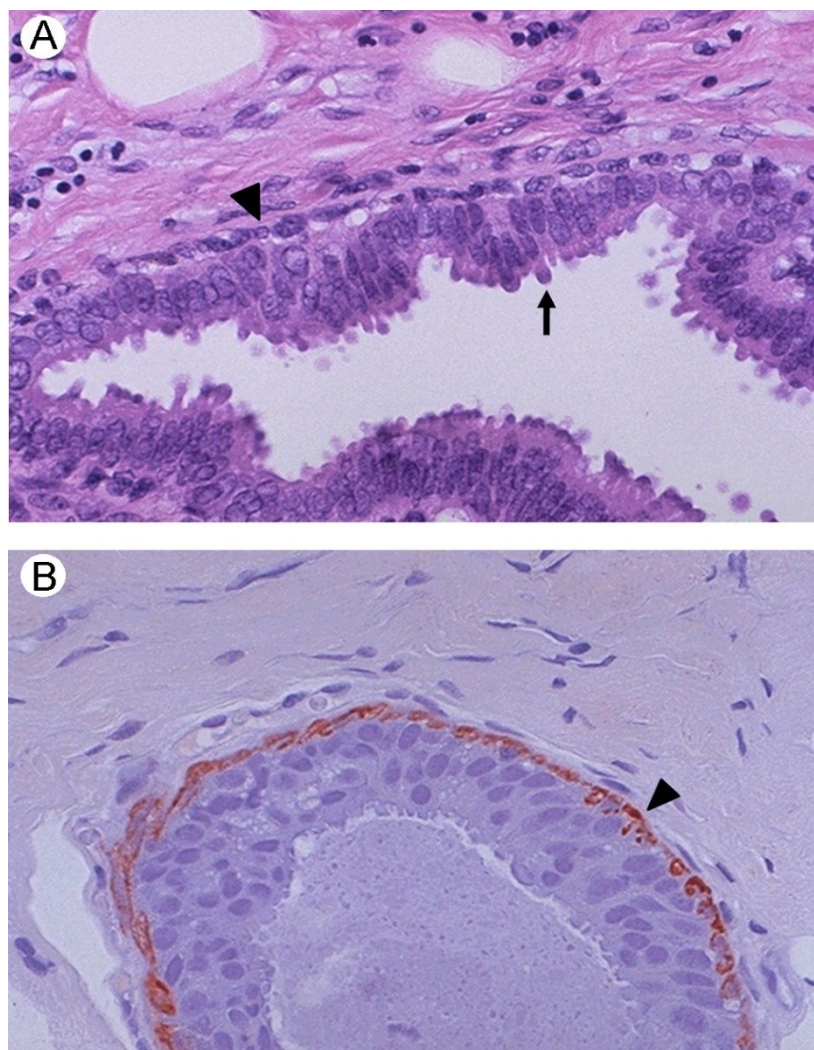


Figura 2. Histologia da mama. (A) Fotomicrografia (ampliação original, 100x; coloração com hematoxilina e eosina (H-E)) de lóbulos mamários normais. As células epiteliais revestem o lúmen e demonstram secreção apócrina com extrusões citoplasmáticas (seta). Uma camada de células mioepiteliais (ponta de seta), algumas das quais ligeiramente vacuoladas, é vista adjacente às células epiteliais. (B) Fotomicrografia (aumento original, 100x; coloração de imunoperoxidase com anticorpos para marcação da actina) da camada de células mioepiteliais (ponta de seta), que tem função contrátil e é sensível à ocitocina. Figura de JESINGER (2014) com uso autorizado pela RightsLink/Elsevier.

Uma característica importante do epitélio luminal, incluindo o da mama, é que eles possuem uma polaridade basoapical. Essa polaridade possibilita a integração dos sinais hormonais e mecânicos exercidos pelo microambiente, além de ser crítica para a manutenção da diferenciação e sobrevivência celular (BISSELL *et al.*, 2002).

A membrana basal conecta o tecido epitelial ao conjuntivo e estroma adjacente, essa intrincada rede mantém vários tipos de fatores solúveis, formando o microambiente do epitélio (GUSTERSON *et al.*, 1982). Assim, as células luminais e mioepiteliais estão em contato direto com a membrana basal, fazendo com que a última interfira diretamente na função e especificidade do tecido, através do armazenamento de fatores de crescimento e citocinas que irá influenciar várias vias de sinalização (BASHKIN *et al.*, 1989; VIDI; BISSELL; LELIÈVRE, 2013).

A compreensão do desenvolvimento, da anatomia, fisiologia e regulação mamária é essencial para entender a biologia e a função desse órgão e de suas doenças benignas ou malignas.

2. DOENÇAS DA MAMA

2.1 Doença Benigna da Mama

As doenças benignas da mama (DBM) são frequentes em mulheres, correspondendo cerca de 80% de todas as lesões mamárias (AJAO, 1979; GURAY; SAHIN, 2006). DBM engloba um conjunto de lesões heterogêneas e o tecido mamário pode apresentar, simultaneamente, várias destas alterações (SHERMAN *et al.*, 2020). Em sua maioria, a detecção destas lesões ocorre por exames de rotina (clínicos e/ou de imagem) ou pela própria paciente por meio do autoexame, ou devido à mastalgia (ORR; KELLEY, 2016).

No início da puberdade, as alterações no tecido glandular e ductal raramente ocorrem, entretanto pode haver hiperplasia estromal (PEARLMAN; GRIFFIN, 2010). Em resposta aos aumentos cíclicos de estrógeno e progesterona, o tecido glandular pode sofrer mudanças levando à adenose, assim como pode ocorrer alterações estromais com áreas irregulares. No período reprodutivo tardio, o tecido glandular e/ou ductal pode se tornar hiperplásico (SANTEN, 2000). Dessa forma, as DBMs são mais comuns na segunda década de vida e atingem o pico entre as idades de 40 e 50 anos (COLE; MARK ELWOOD; KAPLAN, 1978).

Na rotina clínica convencionou-se classificar as DBMs em não proliferativas, proliferativas sem atipias e proliferativas com atipias, que apresentam graus crescentes de risco relativo de desenvolver CM (DUPONT; PAGE, 1985). Não há risco elevado para a ocorrência de CM em mulheres com lesões não proliferativas (MILTENBURG; SPEIGHTS, 2008). Mulheres com doenças proliferativas sem

atipias estão associadas a um risco relativo de 1.2 a 2.0, enquanto alterações proliferativas com atipias estão associadas a um risco relativo de 3.7 a 5.3 de desenvolver CM, quando comparadas com a população em geral (ONSTAD; STUCKEY, 2013).

As lesões não proliferativas da mama abrangem cistos, alteração apócrina papilar, ectasia ductal, calcificações relacionadas ao epitélio, adenose não esclerosante e fibrose periductal. Os cistos, presentes nesse grupo de lesões, são os mais frequentes, com 20 a 25% apresentando massas palpáveis (MILLET; DIRBAS, 2002; STACHS *et al.*, 2019). A ultrassonografia é um exame por imagem particularmente útil na identificação e classificação dos cistos. Na prática clínica, caso o diagnóstico seja um cisto simples ou microcistos agrupados, o protocolo a seguir é feito por acompanhamento de rotina (MILLET; DIRBAS, 2002).

As lesões de mama proliferativas sem atipias incluem hiperplasia ductal, adenose esclerosante, cicatrizes radiais, papiloma intraductal e fibroadenoma. A hiperplasia ductal sem atipias é, dentre todas as lesões proliferativas sem atipias, a mais comum e a sua detecção ocorre quase sempre em decorrência de achados acidentais de biópsia, solicitadas em decorrência de anormalidades mamográficas e/ou massa mamária. Se a arquitetura tecidual for mantida, sem alteração da morfologia das células ductais, nenhum tratamento é indicado (KOERNER, 2004).

As lesões de mama proliferativas com atipias podem incluir hiperplasia ductal, hiperplasia lobular, papiloma e papilomatose. Como nas lesões sem atipias, a identificação dessas lesões atípicas ocorre na biópsia de achados mamográficos. Parte das células perdem a orientação basoapical e podem preencher parte do ducto ou lóbulo envolvido. Mulheres com hiperplasia atípica são usualmente orientadas apenas sobre estratégias de modificações comportamentais e de estilo de vida (ORR; KELLEY, 2016).

A detecção de DBM é muito mais comum do que o diagnóstico do câncer de mama. Portanto, saber diferenciar esses dois grupos é de suma importância para que não ocorra a excisão cirúrgica e/ou outros tratamentos desnecessários.

2.2 Câncer de Mama

Em 2020, ocorreram cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer e quase 10 milhões de mortes, sendo que o câncer de mama foi o tipo mais diagnosticado no mundo, com cerca de 2,3 milhões de novos casos (SUNG *et al.*,

2021). Em 2020, no Brasil, estimou-se a ocorrência de 66.280 novos casos de câncer de mama (INCA, 2019).

O câncer de mama pode ser causado por vários fatores, sendo os principais a predisposição genética, idade, densidade mamária, agentes ambientais e estilo de vida (FENG *et al.*, 2018; SUNG *et al.*, 2021). Esses fatores podem gerar um desbalanço no status redox, com aumento das espécies reativas de oxigênio, induzindo alterações nas concentrações hormonais de estrógeno e progesterona, aumentando a agressividade do tumor (CHAJÈS; ROMIEU, 2014). Ressalta-se ainda que a obesidade pode gerar dois pontos-chave para a progressão do tumor, por meio da promoção da inflamação e a produção de estrógeno pelos adipócitos (LEE *et al.*, 2019).

A triagem do CM visa detectar com precisão tumores em estadiamento inicial, possibilitando o incremento do acesso aos serviços de diagnóstico e fornecendo tratamento oportuno para o câncer e, dessa forma, reduzindo a mortalidade por CM (LOKUHETTY; WATANABE; WHO, 2019).

Os métodos mais utilizados na rotina clínica para a triagem do câncer de mama são: exame físico, mamografia, ultrassonografia e ressonância magnética, todos eles variam entre si quanto a utilidade, sensibilidade e especificidade (BARBA *et al.*, 2021).

O exame físico refere-se à análise das mamas, mamilo e axilas em busca de alterações notáveis ao toque, pode ser realizado pelo médico ou pela própria paciente. As anormalidades detectadas por esse método incluem nódulos mamários e axilares, espessamento, inchaço, assimetria e ulceração ou secreção do mamilo. A principal desvantagem, é que se confirmado por biópsia, o CM apresenta estadiamentos avançados (HASSAN *et al.*, 2015; SULTANIA *et al.*, 2017). Ao ser executado pelo médico, o método possui uma sensibilidade que varia entre 40 a 69% e uma especificidade entre 88 a 99%. Caso seja um autoexame, a sensibilidade cai para a faixa de 12 a 41% (US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE, 2009).

A mamografia é o exame padrão ouro para a triagem de pacientes em busca da detecção do câncer de mama. Utiliza raios-X para visualizar possíveis anormalidades na mama, mas caso sejam detectadas no exame não se pode confirmar ser câncer. Dessa forma, se houver achados mamográficos indicativos

de câncer da mama recomenda-se a realização de biópsia e análises histopatológicas e moleculares do tecido (WELCH *et al.*, 2016).

Porém, a mamografia apresenta algumas desvantagens como o sobrediagnóstico, em que achados benignos ou tumores não agressivos podem ser confundidos com tumores invasivos, levando a procedimentos e tratamentos desnecessários (LØBERG *et al.*, 2015). Além disso, a sensibilidade da mamografia é influenciada pela constituição do tecido. Neste cenário, mamas densas, maior quantidade de tecido fibroglandular em relação ao adiposo, encontrada em maior porcentagem em mulheres mais jovens, limitam a detecção de tumores (MANDELSON, 2000). Em nosso melhor conhecimento, a literatura ainda não apresentou um consenso em relação à idade adequada para a realização da mamografia e ainda, a precisão do teste, pois as porcentagens de sensibilidade e especificidade variam bastante entre os estudos. A Organização Mundial de Saúde recomenda a realização da mamografia a cada dois anos para mulheres com idades entre 50 e 69 anos (SUNG *et al.*, 2021).

A ultrassonografia é um método de triagem por imagem que utiliza ondas sonoras de alta frequência para produzir imagens das estruturas internas da mama, permitindo a detecção das alterações nos tecidos (SMETHERMAN, 2013). A ultrassonografia pode ser utilizada para distinguir cistos contendo líquido de tumores sólidos e guiar alguns procedimentos cirúrgicos, como, por exemplo, biópsia por agulha. Essa técnica apresenta como vantagens a não utilização de radiação ionizante ou contraste intravenoso e o fato de poder ser realizada em mulheres com mamas densas. Porém, apresenta uma menor sensibilidade e especificidade do que a mamografia (GEISEL; RAGHU; HOOLEY, 2018).

A ressonância magnética utiliza campos magnéticos e ondas eletromagnéticas para produzir imagens detalhadas de processos fisiológicos, como, por exemplo, o fluxo sanguíneo. A ressonância magnética, para a triagem do câncer de mama, utiliza contraste e depende da neovascularização (formação de novos vasos) do tumor (MORRIS, 2002). Ela vem sendo empregada principalmente em complemento as informações obtidas por mamografia, pois apresenta alto custo e alta taxa de falsos-positivos (BARBA *et al.*, 2021).

Após a detecção de alterações indicativas de câncer de mama por técnicas de imagem, a biópsia é necessária para o diagnóstico preciso dos tumores. Existem

três principais tipos de biópsia, a saber: 1) aspiração por agulha fina, escolhido para avaliar o líquido de cistos e abscessos; 2) biópsia de fragmento com agulha (core biopsy), remove uma fração pequena do tecido; e 3) biópsia excisional, busca remover todo o tumor com uma margem de segurança (DODD; BUI, 2015).

Apesar de ser uma técnica altamente invasiva, a biópsia ainda é a ferramenta padrão ouro que confirma se um tumor é benigno ou maligno. A confirmação ocorre por meio das análises citológicas, histológicas e moleculares do tecido removido (BUONO *et al.*, 2019). A determinação da estrutura mamária acometida (subtipo) e a classificação dos tumores ocorre também por meio dessas análises, simultaneamente ao diagnóstico.

O câncer de mama possui mais de 21 subtipos, caracterizando assim uma doença altamente heterogênea com alta diversidade morfológica (WHO, 2012). Pode ser dividido, inicialmente, em CM *in situ* ou invasivo. O CM invasivo mais frequente é o tipo não especial (também denominado ductal invasivo) e compreende 70 a 80% dos casos, que não representa um subgrupo homogêneo, mas apresenta uma disparidade com relação à morfologia do tumor, biologia molecular subjacente e prognóstico (PROVENZANO; ULANER; CHIN, 2018; VUONG *et al.*, 2014).

Dentre os demais tipos tumorais, podemos citar como principais os seguintes: carcinoma lobular, tubular, mucinoso, metaplásico invasivo e carcinoma com características medulares, neuroendócrina ou apócrina. O diagnóstico de carcinoma ductal invasivo é por exclusão, ou seja, quando um tumor não preenche os critérios para um subtipo especial (VUONG *et al.*, 2014).

Além da classificação com base na localização do tumor (tipo histológico), os tumores também são classificados quanto ao grau. Um dos sistemas mais utilizados é baseado em Bloom e Richardson modificado por Elston e Ellis, onde são atribuídos pontos para formação de túbulos (1 a 3, com 3 sendo má formação), o grau de pleomorfismo nuclear (1 a 3, com 3 mostrando alto grau) e a contagem mitótica (1-3, sendo 3 uma alta contagem). As pontuações são combinadas para dar uma nota de 1 (total da soma entre 3 e 5), 2 (pontuação de 6 ou 7) ou 3 (pontuação de 8 ou 9). Em adição, os tumores grau 1 são os mais diferenciados (BLOOM; RICHARDSON, 1957; ELSTON; ELLIS, 1991).

O sistema TNM é utilizado para estadiamento dos tumores de mama e possui como base a extensão anatômica da doença. Este sistema avalia três componentes: i) T — a extensão (tamanho) do tumor primário; ii) N — a quantidade de linfonodos regionais com metástase; e iii) M — a ausência ou presença de metástase à distância (EDGE; COMPTON, 2010). Além disso, os biomarcadores ou alvos moleculares são utilizados como ferramentas auxiliares para a classificação dos tumores de mama. Os mais utilizados são o receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e a proteína Ki67.

O RE e RP são fatores transcricionais que atuam cooperativamente para induzir a sobrevivência, proliferação e influenciar a estabilidade genômica (GANGULY *et al.*, 2021). Os promotores que controlam a transcrição de RP contêm sítios de ligação ao estrógeno nas células do câncer de mama (KASTNER *et al.*, 1990; MOHAMMED *et al.*, 2015). Dessa forma, a expressão de RP é considerada uma indicação de uma via RE intacta e funcional (HORWITZ; KOSEKI; MCGUIRE, 1978; WAKS; WINER, 2019). Por outro lado, a RP não é somente um gene alvo induzido por RE, mas também uma proteína que se associa a RE e modula seu comportamento (MOHAMMED *et al.*, 2015).

O HER2 é um receptor tirosina quinase transmembrana amplificado em cerca de 20% dos CM (PICCART-GEBHART *et al.*, 2005). Ele está envolvido na comunicação célula-célula e célula-estroma principalmente por um processo conhecido como transdução de sinal, onde fatores de crescimento externos, ou ligantes, influenciam a transcrição de vários genes (ROSS *et al.*, 2009). O Ki67 é uma proteína nuclear associada à proliferação celular, que é expressa nas fases G2 e S do ciclo celular, mas não é expressa em células em repouso (VUONG *et al.*, 2014).

A análise em conjunto dos marcadores moleculares descritos nos parágrafos anteriores, fornece a classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama. Os principais marcadores moleculares são luminal A (RE+ ou RP+, HER2- e Ki67 <14%), luminal B (RE+ ou RP+, HER2+ ou Ki67 ≥ 14%), HER2 positivo (RE- e RP-, HER2+) e triplo negativo (RE- e RP-, HER2-). Cerca de 10 a 15% dos CM são triplo negativos (VUONG *et al.*, 2014). Em adição ao descrito

acima, a classificação correta dos tumores da mama é essencial para a determinação do prognóstico e o direcionamento do tratamento.

Em relação à terapia para o câncer de mama, podemos citar a cirurgia, a radioterapia, a terapia neoadjuvante e adjuvante. Para uma terapia ser eficiente ela precisa ter eficácia máxima eliminando ou minimizando a recorrência e com mínimo de efeitos colaterais (FISUSI; AKALA, 2019). Para o câncer de mama não metastático, a terapia local pode consistir na remoção cirúrgica, amostragem e remoção dos linfonodos axilares, considerando a radioterapia pós-operatório. A quimioterapia (terapia sistêmica) pode ser pré-operatória (neoadjuvante), pós-operatória (adjuvante) ou ambas. Para tumores positivos para os receptores hormonais (RE e RP) há a possibilidade de terapia endócrina e para tumores positivos HER2, terapia direcionada com anticorpo. Para os tumores triplo negativos, a única forma de tratamento sistêmico é a quimioterapia (WAKS; WINER, 2019). A quimioterapia é particularmente importante para melhorar a sobrevida livre de doença com base no controle de micrometástases com potencial de espalhar o tumor para todo o corpo (SHIEN; IWATA, 2020).

O tratamento de pacientes com câncer de mama metastático tem o objetivo principal de prolongar a vida e atenuar os sintomas, pois o CM metastático permanece incurável em praticamente todos os pacientes acometidos pela doença (FISUSI; AKALA, 2019). Por isso, é de suma importância detectar o câncer de mama em estadiamentos iniciais, assim como monitorar a eficácia terapêutica para que não ocorram metástases.

3. PROGRESSÃO TUMORAL

O câncer de mama metastático representa a principal causa de mortes entre as mulheres e a progressão tumoral para formação de metástases é um processo complexo e de múltiplas etapas, durante o qual células tumorais sofrem alterações estruturais e funcionais que lhes permitem migrar para sítios distantes (PIÑEIRO, 2020).

A cascata metastática pode ser dividida nas seguintes etapas: 1) destacamento das células tumorais após passarem por transição epitélio-mesenquimal (EMT); 2) migração das células para tecidos adjacentes; 3) intravasação das células tumorais em vasos sanguíneos e linfáticos, passando a serem identificadas como células tumorais circulantes (CTCs); 4) sobrevivência das

CTCs na circulação; 5) extravasamento das CTCs em órgão distantes; 6) adaptação e colonização das células tumorais no novo sítio com formação das metástases a distância (MELZER; VON DER OHE; HASS, 2017).

Um fator-chave para que ocorra a progressão de um tumor *in situ* para um tumor invasivo é o microambiente tumoral (PLACE; JIN HUH; POLYAK, 2011). Esse microambiente tumoral é formado por matriz extracelular e vários tipos celulares. Nesse local ocorre uma pressão nas células tumorais para que elas procurem novos locais que favoreçam o seu crescimento, visto que há uma escassez de nutrientes e outros fatores com a expansão tumoral (MEGO; MANI; CRISTOFANILLI, 2010; MICKE; ÖSTMAN, 2005).

As células com metabolismo irregular passarão pela transição epitélio-mesenquimal e a hipóxia desempenha um papel importante na ativação desse processo (KSIAZKIEWICZ; MARKIEWICZ; ZACZEK, 2012). Durante a EMT, as células tumorais perdem a expressão de marcadores epiteliais específicos, incluindo E-caderina, molécula de adesão celular epitelial (EpCAM) e Cks, adquirem a expressão de marcadores mesenquimais como vimentina, N-caderina, CD44, ALDH1 e regulam positivamente metaloproteinases, principalmente MMP2 e MMP9 (BROERSEN et al., 2014; FRIEDLANDER et al., 2014; VIDEIRA et al., 2014). Após essa mudança de fenótipo, as células conseguem invadir o estroma circundante direcionadas por um gradiente de nutrientes e fatores de crescimento (CHIANG; CABRERA; SEGALL, 2016). Além disso, esse processo ocorre de forma lenta e pode gerar células tumorais com um fenótipo híbrido, ou seja, células tumorais que apresentam características tanto mesenquimais quanto epiteliais (JIE; ZHANG; XU, 2017). Acredita-se que estes diversos fenótipos fornecem habilidades para que as células tumorais colonizem diferentes microambientes (LU; KANG, 2019).

A etapa seguinte à migração das células tumorais pelo estroma é o acesso aos vasos sanguíneos e/ou linfáticos. Como o próprio tumor gera novos vasos (angiogênese) e a parede desses vasos apresenta junções célula a célula fracas, a intravasação das células tumorais é facilitada. Ao entrarem nos vasos tornam-se células tumorais circulantes (UTOGUCHI et al., 1996). Além disso, as próprias células tumorais liberam moléculas que irá fragilizar as paredes dos vasos,

aumentando a carga de CTCs e consequentemente aumentando a probabilidade de formação de metástases (GRISARD; NICOLOSO, 2017).

Na circulação, as células tumorais sofrerão colisões com células sanguíneas, forças de cisalhamento, ataque do sistema imune e estresse oxidativo (MASSAGUÉ; OBENAU, 2016). Além disso, as CTCs precisam resistir a *anoxia* e falta de fatores de proliferação, os quais na maioria das vezes são fornecidos pela interação célula-matriz (MELZER; VON DER OHE; HASS, 2017). Os estudos apontam que CTCs mesenquimais apresentam uma resistência maior a todos esses fatores em comparação com CTCs epiteliais (MITCHELL; KING, 2013).

Na penúltima etapa da cascata metastática, as CTCs deixam a corrente sanguínea e extravasam para sítios secundários e no novo microambiente elas sofrem o processo reverso, transição mesenquimal para epitelial, e adaptam-se para proliferar (CHAFFER; THOMPSON; WILLIAMS, 2007). As CTCs do CM tem um tropismo em colonizar preferencialmente ossos e pulmões (47-60% e 16-34%, respectivamente) (COLEMAN; RUBENS, 1987).

A disseminação de células tumorais na corrente sanguínea ocorre já nos estádios iniciais do CM e essas células podem ser encontradas em pacientes com lesões pré-invasivas (BANYAS *et al.*, 2014). Dessa forma, componentes tumorais liberados nos fluidos corporais podem ser uma importante ferramenta para a triagem, diagnóstico e monitoramento da terapia.

4. BIÓPSIA LÍQUIDA

A biópsia líquida é definida como a detecção e análise de biomarcadores presentes em fluidos biológicos que possibilite a identificação de pacientes com câncer (BANYAS-PALUCHOWSKI; KRAWCZYK; FEHM, 2020). Os biomarcadores são substâncias que podem ser oriundas do tumor ou liberadas por outros tecidos em resposta à presença do tumor (LOKE; LEE, 2018).

Estratégias baseadas nos fluidos biológicos têm atraído considerável atenção durante a última década devido ao seu potencial como ferramenta minimamente invasiva para o monitoramento do câncer (CAYREFOURCQ; ALIX-PANABIÈRES, 2020). Um teste baseado em biomarcadores presentes nos fluidos biológicos para triagem, diagnóstico e/ou monitoramento do tratamento do câncer de mama pode ser uma opção atraente, econômica e prontamente acessível (LOKE; LEE, 2018).

O termo “biópsia líquida” engloba a análise de ácido desoxirribonucleico (DNA) circulante, ácido ribonucleico (RNA) (mRNA, microRNA), exossomos e CTCs (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016) em materiais tais como sangue, urina, saliva e fezes (HABER; VELCULESCU, 2014; SIRAVEGNA *et al.*, 2017).

O DNA tumoral circulante (ctDNA) difere-se do DNA livre de células (cfDNA) por ser fragmento de DNA obrigatoriamente originário do tumor. Mas como a sua concentração nos fluidos é muito baixa, convencionou-se detectar a quantidade de cfDNA e padronizar a diferença de concentração destas moléculas na condição saudável e doente (BANY-S-PALUCHOWSKI; KRAWCZYK; FEHM, 2020). A concentração de cfDNA no sangue pode variar de 13 ng/mL em indivíduos saudáveis cerca de 180 ng/mL em estadiamentos avançados do câncer (PAYNE, 2011). O cfDNA pode ser útil na detecção precoce do câncer de mama, como mostra um estudo utilizando biópsia líquida para medir os níveis de ctDNA/cfDNA permitiu detectar o câncer de mama 5 meses antes da detecção clínica e radiológica (RUSSO; GIORDANO; ROLFO, 2017). Em outra análise, baseada na comparação de cfDNA íntegro com cfDNA total, demonstrou que nos pacientes com câncer de mama há uma menor quantidade de cfDNA íntegro, apesar de haver um aumento na quantidade de cfDNA total permitindo diferenciar os estadiamentos do câncer de mama (MADHAVAN *et al.*, 2014).

Os exossomos são uma subcategoria de vesículas extracelulares com tamanhos de 30 a 100 nm de diâmetro, presentes em uma ampla gama de fluidos corporais tais como sangue, saliva e leite materno (EL ANDALOUSSI *et al.*, 2013; LÄSSER *et al.*, 2011). Os exossomos são liberados não somente por células tumorais, mas também por vários tipos celulares saudáveis, incluindo linfócitos T citotóxicos, células endoteliais e células musculares (GE *et al.*, 2012; WHITESIDE, 2016). Tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com câncer, os exossomos transportam sinais químicos para comunicação intercelular, possivelmente alterando a atividade das células alvo (RODRIGUEZ-DORANTES *et al.*, 2014). Porém, há evidências de que o conteúdo dos exossomos difere para cada tipo celular (HOSHINO *et al.*, 2015; TENG *et al.*, 2017). Por exemplo, um estudo apresentou níveis de miRNA aumentados nos exossomos de pacientes com câncer em comparação com exossomos de controles (JACKSON; GRABOWSKA; RATAN, 2014).

A utilização de CTCs como uma ferramenta de detecção apresenta diversas vantagens sobre outros marcadores, além de não ser invasiva e fácil de repetir, ela possibilita capturar informações quanto a heterogeneidade do tumor (CHAFFER; WEINBERG, 2011; PIÑEIRO, 2020).

4.1 Células Tumorais Circulantes

A presença de células tumorais na corrente sanguínea e a formação de micrometástases distantes, que são indetectáveis por exames disponíveis atualmente, podem ocorrer no início do desenvolvimento do câncer. As CTCs foram identificadas como responsáveis pela disseminação do tumor para outros órgãos do corpo por isso o desenvolvimento de ensaios sensíveis e específicos para sua detecção são foco da pesquisa translacional atualmente (LIANG; HALL; LUCCI, 2020).

As CTCs são populações de células raras e fenotipicamente diversas com viabilidade, dormência, expressão de biomarcadores e potencial metastático variável (HALL; VALAD; LUCCI, 2016). Talvez por isso, apesar de terem sido descritas em 1869 por Ashworth que observou haver células no sangue com características semelhantes ao do tumor em um homem de 38 anos com várias massas tumorais no tórax e abdômen (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017). Somente em 2004 foi desenvolvido a primeira ferramenta capaz de isolá-las, o CellSearch® (ALLARD *et al.*, 2004).

As técnicas desenvolvidas, até o momento, para enriquecimento e identificação de CTCs podem ser classificadas em tecnologias que utilizam propriedades biológicas das células (expressão de marcadores de superfície); aquelas que utilizam propriedades físicas (tamanho e diversidade) (FERREIRA; RAMANI; JEFFREY, 2016) ou aquelas que combinam ambos. No primeiro grupo, o marcador de superfície EpCAM é o mais utilizado para enriquecimento de CTCs por isso essas tecnologias falham em capturar CTCs mesenquimais (HYUN *et al.*, 2016), CellSearch® é um exemplo de tecnologia que emprega essa estratégia. As tecnologias que utilizam propriedades físicas precisam de passos adicionais, muitas vezes utilizando técnicas complexas, para confirmação da natureza maligna das células encontradas (PINZANI *et al.*, 2021).

Apesar dessas limitações, estudos utilizando o CellSearch® demonstraram que cerca de 31% dos pacientes com tumores primários (T1 e T2) tem detecção

positiva para CTCs (FRANKEN *et al.*, 2012; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2010; VAN DALUM *et al.*, 2015). Além disso, uma contagem maior que 5 CTCs por 7.5 mL de sangue em pacientes com câncer de mama metastático está associada a pior sobrevida livre de doença (PFS) e sobrevida global (OS) (CRISTOFANILLI *et al.*, 2004). Em pacientes sem metástases a contagem superior a 1 foi associada com a diminuição de PFS e OS (LUCCI *et al.*, 2012).

Um estudo analisou a relação entre CTCs e a resposta patológica ao tratamento em pacientes com CM inflamatório, estadiamento III e não metastático. Os pacientes que não tiveram CTCs detectadas, por meio do CellSearch®, no início do estudo e tiveram resposta patológica completa após a quimioterapia neoadjuvante tiveram um resultado excelente, com uma PFS de 88% e OS de 94% em 3 anos. Em comparação, aqueles que tiveram detecção de CTC (1 CTC / 7,5 ml) no início do estudo a PFS foi de 34% e OS de 48% em 3 anos (PIERGA *et al.*, 2017).

Como visto anteriormente, EMT é um processo que possibilita que células tumorais adquiram características como motilidade, poder de invasão e resistência a apoptose (BIDARD; PROUDHON; PIERGA, 2016; DAVE *et al.*, 2012; KRAWCZYK *et al.*, 2014). Estudos corroboram a importância da EMT, indicando que presença de marcadores mesenquimais em células tumorais estão associados a agressividade da doença metastática e resistência a terapias anticâncer (DAVE *et al.*, 2012; HALL; VALAD; LUCCI, 2016; MEGO; MANI; CRISTOFANILLI, 2010). Implicando que os tipos de CTCs mais agressivos que estão passando por alterações fenotípicas associadas a EMT ainda não possuem um teste com comprovada aplicação clínica, semelhantes ao que foi estudado utilizando a tecnologia CellSearch® (LIANG; HALL; LUCCI, 2020).

Portanto, o conceito de biópsia líquida para análise de CTCs no sangue de pacientes com câncer de mama é de particular importância, pois essas células desempenham uma função biológica no desenvolvimento metastático e possuem biomarcadores (epiteliais e mesenquimais) que viabilizaria a detecção da progressão tumoral e resistência a terapias (ALIX-PANABIÈRES; PANTEL, 2016).

4.2 Saliva

A composição da saliva é de 99% de água, espécies inorgânicas (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , HPO_3 , Mg^{2+} e NH_3), produtos de putrefação (putrescina e cadaverina),

lipídios (colesterol, ácidos graxos) e mais de 400 tipos de proteínas. As proteínas mais relevantes são as produzidas pelas glândulas salivares (α -amilase, histaminas, cistatinas, lactoferrinas, lisozimas, mucinas e proteínas ricas em prolina) ou advindas do plasma (albumina, IgA e transferrina) (CHIAPPIN *et al.*, 2007).

A saliva pode refletir a condição patológica, pois há uma troca de substâncias com o sangue, possível graças a fina camada de células epiteliais que separa os ductos salivares da circulação sistêmica. Assim é possível uma troca de substâncias entre esses dois fluidos por transporte ativo, difusão através da membrana celular ou difusão passiva por gradiente de concentração (LIU; DUAN, 2012).

Um dos possíveis carreadores de constituintes do tumor para a saliva é o exossomo, constituído de lipídios (SUBRA *et al.*, 2010), mRNA, microRNA (VALADI *et al.*, 2007), DNA (PISETSKY; GAULEY; ULLAL, 2011) e proteínas (THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002).

Como fluido diagnóstico a saliva oferece diversas vantagens, é um método não invasivo, possível de ser coletada pelo próprio paciente, risco reduzido de infecções, mais fácil de ser obtida de pacientes com deficiência. Portanto, pode ser utilizada como uma abordagem econômica para triagem de grandes populações (LIU; DUAN, 2012).

5. TÉCNICAS MOLECULARES E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

A ausência de biomarcadores altamente específicos e sensíveis para o câncer de mama, bem como o número limitado de testes não invasivos e de baixo custo, exigem a descoberta de novos biomarcadores e métodos. Assim, combinações de biomarcadores e o uso de técnicas de análise molecular, como citometria de fluxo e a espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) podem apoiar esse propósito.

A citometria de fluxo é uma tecnologia que fornece uma análise multiparamétrica rápida de células individuais em solução. Essa técnica permite que milhares ou milhões de células sejam analisadas à medida que passam por um, ou vários lasers, podendo ser analisada quanto à dispersão da luz visível e parâmetros de fluorescência. A dispersão da luz visível é medida em duas direções diferentes, a direta (Forward Scatter (FSC)) que pode indicar o tamanho relativo da

célula e a lateral (90°, Side Scatter (SSC)) que indica a complexidade interna ou granulabilidade. A fluorescência pode ser alcançada por corantes ou anticorpos conjugados que se ligam a alvos específicos (por exemplo, proteínas de superfície) (MCKINNON, 2018).

A citometria de fluxo é um método laboratorial amplamente utilizado rotineiramente para analisar o sangue periférico, a medula óssea, o líquido cefalorraquidiano e outros fluidos corporais. A aplicação clínica da citometria de fluxo evoluiu para uma ferramenta de contagem de células T CD4⁺ no sangue de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana, para caracterização de malignidade hematológicas e imunodeficiência primária. Dessa forma, já é uma tecnologia disponível nos laboratórios de análises clínicas (DELMONTE; FLEISHER, 2019).

O FTIR é uma técnica analítica que utiliza da radiação infravermelha para avaliar diversos tipos de amostra, entre elas os fluidos biológicos. Quando a radiação infravermelha atinge a amostra, parte dela é absorvida e parte é transmitida. Quando a amostra absorve a radiação, os grupos funcionais vibram como alongamento, dobra, deformação ou combinação. Assim, o espectro resultante representa a absorção e transmissão molecular, criando uma impressão digital da amostra. Portanto, duas moléculas não irá apresentar o mesmo espectro (HACKSHAW *et al.*, 2020).

Dessa forma, um espectro infravermelho apresenta quais ligações absorveram a radiação (número de onda), com a eficiência da absorção (intensidade) (KRAVDAL; HELGØ; MOE, 2015). A região do infravermelho no espectro pode ser dividida em três: o infravermelho distante (<400 cm⁻¹), o infravermelho médio (4000-400 cm⁻¹) e o infravermelho próximo (13000 – 4000 cm⁻¹). A região do infravermelho médio pode ser subdividida em região de alongamento X-H (4000 – 2500 cm⁻¹; O-H, C-H e N-H), a região tripla (2500 – 2000 cm⁻¹; C≡C e C≡N), a região de ligação duplas (2000- 1500 cm⁻¹; C=C, C=O e C=N) e a região de impressão digital (1500 – 600 cm⁻¹) (NAWROCKA; LAMORSK, 2013). Para análise de materiais biológicos, as regiões mais importantes no espectro do infravermelho é a região da impressão digital e a região da amida I e da amida II (1700-1500 cm⁻¹) (DE BRUYNE; SPEECKAERT; DELANGHE, 2018).

A grande desvantagem dessa técnica é que a água presente na amostra pode interferir em informações bioquímicas importantes, especificamente Amida I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) e lipídios ($3000\text{ a }3500\text{ cm}^{-1}$). Uma das abordagens mais utilizadas para evitar esse efeito é por meio da refletância total atenuada (ATR) (DOHERTY *et al.*, 2018; KONG; YU, 2007). O ATR permite que os feixes de energia não sejam dissipados para além da amostra e assim possam ser detectados (SALA *et al.*, 2020).

Porém, o ATR-FTIR oferece uma série de vantagens, possibilita a detecção de composições químicas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos em amostras biológicas, identificando com precisão as conformações moleculares, tipos de ligação, grupos funcionais e interações intermoleculares das quais a amostra é composta (SU; LEE, 2020). Sabendo-se que no início da transformação maligna ocorrem mudanças na composição e quantidade das principais biomoléculas (KRISHNAN *et al.*, 2017; MALINS *et al.*, 2004) antes que estas alterações sejam detectadas pelos exames de imagem, o FTIR permite a captura dessas pequenas modificações em lesões pré-cancerosas (SAHU; MORDECHAI, 2005). O ATR-FTIR é uma técnica relativamente simples, reproduzível, requer um pequeno volume da amostra (μL), sendo livre de reagentes (SU; LEE, 2020).

Vários tecidos tumorais, tais como mama, pulmão, colón e próstata já foram analisados por FTIR, com resultados promissores. Por exemplo, o método utilizando FTIR para avaliação de imagens teciduais do câncer de próstata apresentou uma sensibilidade de 92,3% e especificidade de 99,4% e do câncer de pulmão apresentou sensibilidade de 99,3% e especificidade de 94,4% (BAKER *et al.*, 2008; BIRD *et al.*, 2012; GAZI *et al.*, 2006; LASCH *et al.*, 2004; WALSH *et al.*, 2012). Apesar do grande número de publicações utilizando a técnica de ATR-FTIR, ainda não foi possível fazer a transição para a rotina clínica e este é o maior desafio na atualidade (MITCHELL *et al.*, 2014). Uma possível resposta para a dificuldade em traduzir as informações para a rotina clínica é a abundância de dados gerados pelas análises de ATR-FTIR.

A inteligência artificial, mais especificamente o aprendizado de máquina, fornece ferramentas robustas para solucionar essa questão do excesso de dados gerados pela técnica de ATR-FTIR, possibilitando a identificação de padrões que

auxiliam na diferenciação de condições normais de condições alteradas (ADAMSON; WELCH, 2019).

O aprendizado de máquina utiliza a estatística e probabilidade para aprender e melhorar o desempenho automaticamente quando recebe novos dados sem a necessidade de programação explícita, ou seja, sem a necessidade de que um programador defina as funções e regras a serem seguidas. Assim, o aprendizado de máquina consegue lidar com milhares de variáveis complexas, extraindo características-chaves e que talvez sejam difíceis de descobrir utilizando a estatística tradicional (YUE *et al.*, 2018).

O objetivo principal do aprendizado de máquina é produzir um modelo que possa ser utilizado para realizar a classificação e/ou predição. Visto que esse modelo seja obtido, torna-se necessário determinar a performance dele. Essa análise se dá por meio da mensuração da sensibilidade, especificidade e acurácia (KOUROU *et al.*, 2015).

Em síntese, a citometria de fluxo e ATR -FTIR aliadas ao aprendizado de máquina podem ser opções extremamente valiosas na pesquisa do câncer de mama para obtenção de uma ferramenta para a triagem, diagnóstico e monitoramento do tratamento. Almejamos assim, obter um painel de biomarcadores abrangente aliados a um sistema simples, rápido, não invasivo, sensível, específico e de baixo custo.

REFERÊNCIAS

ADAMSON, A. S.; WELCH, H. G. Machine Learning, and the Cancer-Diagnosis Problem - No Gold Standard. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 24, p. 2285-2287, 2019. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1907407>

AJAO, O. G. Benign Breast Lesions. **Journal of the National Medical Association**, v. 71, n. 9, p. 867-868, 1979.

ALIX-PANABIÈRES, C.; PANTEL, K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 5, p. 479-491, 2016. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1483>

ALLARD, W. J. et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 20, p. 6897-6904, 2004. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0378>

BAKER, M. J. et al. FTIR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 11, p. 1859-1866, 2008. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604753>

BANYS, M. et al. Detection and clinical relevance of hematogenous tumor cell dissemination in patients with ductal carcinoma in situ. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 144, n. 3, p. 531-538, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2898-6>

BANYS-PALUCHOWSKI, M.; KRAWCZYK, N.; FEHM, T. Liquid Biopsy in Breast Cancer. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, v. 80, n. 11, p. 1093-1104, 2020. <https://doi.org/10.1055/a-1124-7225>

BARBA, D. et al. Breast cancer, screening and diagnostic tools: All you need to know. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 157, p. 103174, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103174>

BASHKIN, P. et al. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. **Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1737-1743, 1989. <https://doi.org/10.1021/bi00430a047>

BIDARD, F.-C.; PROUDHON, C.; PIERGA, J.-Y. Circulating tumor cells in breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 3, p. 418-430, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.001>

BIRD, B. et al. Infrared spectral histopathology (SHP): a novel diagnostic tool for the accurate classification of lung cancer. **Laboratory Investigation**, v. 92, n. 9, p. 1358-1373, 2012. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.101>

BISSELL, M. J. et al. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. **Differentiation; Research in Biological Diversity**, v. 70, n. 9-10, p. 537-546, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700907.x>

BLOOM, H. J.; RICHARDSON, W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **British Journal of Cancer**, v. 11, n. 3, p. 359-377, 1957. <https://doi.org/10.1038/bjc.1957.43>

BUONO, G. et al. Circulating tumor DNA analysis in breast cancer: Is it ready for prime-time?. **Cancer Treatment Reviews**, v. 73, p. 73-83, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.01.004>

C. BRUCKER, M.; SCHARBO-DEHAAN, M. Breast disease: The role of the nurse-midwife. **Journal of Nurse-Midwifery**, v. 36, n. 1, p. 63-73, 1991. [https://doi.org/10.1016/0091-2182\(91\)90021-G](https://doi.org/10.1016/0091-2182(91)90021-G)

CAYREFOURCQ, L.; ALIX-PANABIÈRES, C. Clinical relevance of liquid biopsy in breast cancer: update in 2020. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 20, n. 9, p. 913-919, 2020. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1816828>

CHAFFER, C. L.; THOMPSON, E. W.; WILLIAMS, E. D. Mesenchymal to Epithelial Transition in Development and Disease. **Cells Tissues Organs**, v. 185, n. 1-3, p. 7-19, 2007. <https://doi.org/10.1159/000101298>

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science** (New York, N.Y.), v. 331, n. 6024, p. 1559-1564, 2011. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>

CHAJÈS, V.; ROMIEU, I. Nutrition and breast cancer. **Maturitas**, v. 77, n. 1, p. 7-11, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.10.004>

CHIANG, S. P. H.; CABRERA, R. M.; SEGALL, J. E. Tumor cell intravasation. American Journal of Physiology. **Cell Physiology**, v. 311, n. 1, p. C1-C14, 2016. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00238.2015>

CHIAPPIN, S. et al. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta**, v. 383, n. 1-2, p. 30-40, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>

COLE, P.; MARK ELWOOD, J.; KAPLAN, S. D. Incidence rates and risk factors of benign breast neoplasms. **American Journal of Epidemiology**, v. 108, n. 2, p. 112-120, 1978. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112594>

COLEMAN, R.; RUBENS, R. The clinical course of bone metastases from breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 55, n. 1, p. 61-66, 1987. <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.13>

CRISTOFANILLI, M. et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 8, p. 781-791, 2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040766>

DAVE, B. et al. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 1, p. 202, 2012. <https://doi.org/10.1186/bcr2938>

DE BRUYNE, S.; SPEECKAERT, M. M.; DELANGHE, J. R. Applications of mid-infrared spectroscopy in the clinical laboratory setting. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 55, n. 1, p. 1-20, 2018. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1414142>

DELMONTE, O. M.; FLEISHER, T. A. Flow cytometry: Surface markers and beyond. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 2, p. 528-537, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.011>

DODD, L.; BUI, M. M. Atlas of soft tissue and bone pathology: with histologic, cytologic, and radiologic correlations. **New York: Demos Medical**, 2015.

DOHERTY, J. et al. Increased optical pathlength through aqueous media for the infrared microanalysis of live cells. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 23, p. 5779-5789, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1188-2>

DUPONT, W. D.; PAGE, D. L. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 3, p. 146-151, 1985. <https://doi.org/10.1056/NEJM198501173120303>

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Annals of Surgical Oncology**, v. 17, n. 6, p. 1471-1474, 2010. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4>

EL ANDALOUSSI, S. et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 347-357, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrd3978>

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403-410, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77-106, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>

FERREIRA, M. M.; RAMANI, V. C.; JEFFREY, S. S. Circulating tumor cell technologies. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 3, p. 374-394, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.007>

FISUSI, F. A.; AKALA, E. O. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 3-23, 2019. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190122111224>

FRANKEN, B. et al. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. R133, 2012. <https://doi.org/10.1186/bcr3333>

GANGULY, S. et al. The Nexus of Endocrine Signaling and Cancer: How Steroid Hormones Influence Genomic Stability. **Endocrinology**, v. 162, n. 1, p. bqaa177, 2021. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa177>

GAZI, E. et al. A correlation of FTIR spectra derived from prostate cancer biopsies with gleason grade and tumour stage. **European Urology**, v. 50, n. 4, p. 750-760; discussion 760-761, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.03.031>

GE, R. et al. Exosomes in Cancer Microenvironment and Beyond: have we Overlooked these Extracellular Messengers?. **Cancer Microenvironment**, v. 5, n. 3, p. 323-332, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0110-2>

GEISEL, J.; RAGHU, M.; HOOLEY, R. The Role of Ultrasound in Breast Cancer Screening: The Case for and Against Ultrasound. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**, v. 39, n. 1, p. 25-34, 2018. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2017.09.006>

GRISARD, E.; NICOLOSO, M. S. **Following MicroRNAs Through the Cancer Metastatic Cascade**. In: INTERNATIONAL REVIEW OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY: Elsevier, 2017. v. 333, p. 173-228. E-book. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644817300540>. Acesso em: 19 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.04.005>

GURAY, M.; SAHIN, A. A. Benign breast diseases: classification, diagnosis, and management. **The Oncologist**, v. 11, n. 5, p. 435-449, 2006. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-5-435>

GUSTERSON, B. A. et al. Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in benign and malignant breast diseases. **Cancer Research**, v. 42, n. 11, p. 4763-4770, 1982.

- HABER, D. A.; VELCULESCU, V. E. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 6, p. 650-661, 2014. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-1014>
- HACKSHAW, K. V. et al. Vibrational Spectroscopy for Identification of Metabolites in Biologic Samples. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4725, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25204725>
- HALL, C.; VALAD, L.; LUCCI, A. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients. Critical Reviews in **Oncogenesis**, v. 21, n. 1-2, p. 125-139, 2016. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2016016120>
- HARTMANN, P. E. The lactating breast: an overview from down under. **Breastfeeding Medicine: The Official Journal of the Academy of Breastfeeding Medicine**, v. 2, n. 1, p. 3-9, 2007. <https://doi.org/10.1089/bfm.2006.0034>
- HASSAN, L. M. et al. Evaluation of effect of self-examination and physical examination on breast cancer. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 24, n. 4, p. 487-490, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.04.011>
- HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clinical Anatomy**, v. 26, n. 1, p. 29-48, 2013. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>
- HORWITZ, K. B.; KOSEKI, Y.; MCGUIRE, W. L. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. **Endocrinology**, v. 103, n. 5, p. 1742-1751, 1978. <https://doi.org/10.1210/endo-103-5-1742>
- HOSHINO, A. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. **Nature**, v. 527, n. 7578, p. 329-335, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature15756>
- HYUN, K.-A. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 24677-24687, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8250>
- INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>.
- IYER, S. V. et al. Understanding the Role of Keratins 8 and 18 in Neoplastic Potential of Breast Cancer Derived Cell Lines. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53532, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053532>
- JACKSON, B. L.; GRABOWSKA, A.; RATAN, H. L. MicroRNA in prostate cancer: functional importance and potential as circulating biomarkers. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 930, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-930>
- JESINGER, R. A. Breast anatomy for the interventionalist. **Techniques in Vascular and Interventional Radiology**, v. 17, n. 1, p. 3-9, 2014. <https://doi.org/10.1053/j.tvir.2013.12.002>

JIE, X.-X.; ZHANG, X.-Y.; XU, C.-J. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81558-81571, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18277>

KASTNER, P. et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. **The EMBO journal**, v. 9, n. 5, p. 1603-1614, 1990. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08280.x>

KOERNER, F. C. Epithelial proliferations of ductal type. *Seminars in Diagnostic Pathology*, v. 21, n. 1, p. 10-17, 2004. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2003.10.010>

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549-559, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>

KOUROU, K. et al. Machine learning applications in cancer prognosis and prediction. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 8-17, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.11.005>

KRAVDAL, G.; HELGØ, D.; MOE, M. K. Infrared spectroscopy is the gold standard for kidney stone analysis. *Tidsskrift for Den Norske Laegeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, Ny Raekke*, v. 135, n. 4, p. 313-314, 2015. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.15.0056>

KRAWCZYK, N. et al. Expression of Stem Cell and Epithelial-Mesenchymal Transition Markers in Circulating Tumor Cells of Breast Cancer Patients. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-11, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/415721>

KRISHNAMURTHY, S. et al. Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. **Cancer**, v. 116, n. 14, p. 3330-3337, 2010. <https://doi.org/10.1002/cncr.25145>

KRISHNAN, S. et al. Evidence of Altered Glycosylation of Serum Proteins Prior to Pancreatic Cancer Diagnosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18122670>

KSIAZKIEWICZ, M.; MARKIEWICZ, A.; ZACZEK, A. J. Epithelial-Mesenchymal Transition: A Hallmark in Metastasis Formation Linking Circulating Tumor Cells and Cancer Stem Cells. **Pathobiology**, v. 79, n. 4, p. 195-208, 2012. <https://doi.org/10.1159/000337106>

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670-691, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>

LASCH, P. et al. Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1688, n. 2, p. 176-186, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2003.12.006>

LÄSSER, C. et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 9, 2011. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-9>

LEE, K. et al. The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. **Current Oncology Reports**, v. 21, n. 5, p. 41, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0787-1>

LIANG, D. H.; HALL, C.; LUCCI, A. **Circulating Tumor Cells in Breast Cancer**. In: SCHAFFNER, F.; MERLIN, J.-L.; VON BUBNOFF, N. (org.). Tumor Liquid Biopsies. Cham: Springer International Publishing, 2020. (Recent Results in Cancer Research). v. 215, p. 127-145. https://doi.org/10.1007/978-3-030-26439-0_7

LIU, J.; DUAN, Y. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. **Oral Oncology**, v. 48, n. 7, p. 569-577, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.01.021>

LØBERG, M. et al. Benefits and harms of mammography screening. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 63, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0525-z>

LOKE, S. Y.; LEE, A. S. G. The future of blood-based biomarkers for the early detection of breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 92, p. 54-68, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.12.025>

LOKUHETTY, D., WHITE, V. A.; WATANABE, R., CREE, I. A.; WHO, C. of T. E. B., International Agency for Research on Cancer. **Breast tumours**. [S. l.: s. n.], 2019.

LU, W.; KANG, Y. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. **Developmental Cell**, v. 49, n. 3, p. 361-374, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.010>

LUCCI, A. et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 7, p. 688-695, 2012. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70209-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70209-7)

MADHAVAN, D. et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 146, n. 1, p. 163-174, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2946-2>

MALINS, D. C. et al. From The Cover: Development of a cancer DNA phenotype prior to tumor formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 29, p. 10721-10725, 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403888101>

MANDELSON, M. T. Breast Density as a Predictor of Mammographic Detection: Comparison of Interval- and Screen-Detected Cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 13, p. 1081-1087, 2000. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.13.1081>

MASSAGUÉ, J.; OBENAU, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298-306, 2016. <https://doi.org/10.1038/nature17038>

MCCOOL, W. F.; STONE-CONDY, M.; BRADFORD, H. M. Breast health care. A review. **Journal of Nurse-Midwifery**, v. 43, n. 6, p. 406-430, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0091-2182\(98\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S0091-2182(98)00065-2)

MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: An Overview. **Current protocols in immunology**, v. 120, p. 5.1.1-5.1.11, 2018. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>

MEGO, M.; MANI, S. A.; CRISTOFANILLI, M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 7, n. 12, p. 693-701, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.171>

MELZER, C.; VON DER OHE, J.; HASS, R. Breast Carcinoma: From Initial Tumor Cell Detachment to Settlement at Secondary Sites. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-11, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8534371>

MICKE, P.; ÖSTMAN, A. Exploring the tumour environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 9, n. 6, p. 1217-1233, 2005. <https://doi.org/10.1517/14728222.9.6.1217>

MILLET, A. V.; DIRBAS, F. M. Clinical management of breast pain: a review. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 57, n. 7, p. 451-461, 2002. <https://doi.org/10.1097/00006254-200207000-00022>

MILTENBURG, D. M.; SPEIGHTS, V. O. Benign breast disease. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 285-300, ix, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2008.03.008>

MITCHELL, A. L. et al. Vibrational spectroscopy of biofluids for disease screening or diagnosis: translation from the laboratory to a clinical setting: Vibrational spectroscopy of biofluids: laboratory to clinical setting. **Journal of Biophotonics**, v. 7, n. 3-4, p. 153-165, 2014. <https://doi.org/10.1002/jbio.201400018>

MITCHELL, M. J.; KING, M. R. Computational and Experimental Models of Cancer Cell Response to Fluid Shear Stress. **Frontiers in Oncology**, v. 3, 2013. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00044>

MOHAMMED, H. et al. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. **Nature**, v. 523, n. 7560, p. 313-317, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14583>

MOLL, R.; DIVO, M.; LANGBEIN, L. The human keratins: biology and pathology. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, n. 6, p. 705-733, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6>

MORRIS, E. A. Breast cancer imaging with MRI. **Radiologic Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 443-466, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0033-8389\(01\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0033-8389(01)00005-7)

NAWROCKA, A.; LAMORSK, J. **Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods**. In: GRUNDAS, S. (org.). Advances in Agrophysical Research. [S. l.]: InTech, 2013. <https://doi.org/10.5772/52722>

ONSTAD, M.; STUCKEY, A. Benign breast disorders. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 459-473, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2013.05.004>

ORR, B.; KELLEY, J. L. Benign Breast Diseases: Evaluation and Management. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 59, n. 4, p. 710-726, 2016. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000233>

PANDYA, S.; MOORE, R. G. Breast development and anatomy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 54, n. 1, p. 91-95, 2011. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e318207ffe9>

PAYNE, R. The clinical and prognostic use of circulating tumour cells in breast cancer. [s. l.], 2011. Disponível em: <http://spiral.imperial.ac.uk/handle/10044/1/6957>. Acesso em: 30 dez. 2021.

PEARLMAN, M. D.; GRIFFIN, J. L. Benign breast disease. **Obstetrics and gynecology**, v. 116, n. 3, p. 747-758, 2010. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181ee9fc7>

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1659-1672, 2005.

PIERGA, J.-Y. et al. Circulating tumour cells and pathological complete response: independent prognostic factors in inflammatory breast cancer in a pooled analysis of two multicentre phase II trials (BEVERLY-1 and -2) of neoadjuvant chemotherapy combined with bevacizumab. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 1, p. 103-109, 2017. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw535>

PIÑEIRO, R. **Introduction - Biology of Breast Cancer Metastasis and Importance of the Analysis of CTCs**. In: PIÑEIRO, R. (org.). *Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Metastatic Disease*. Cham: Springer International Publishing, 2020. (Advances in Experimental Medicine and Biology). p. 1-10. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35805-1_1

PINZANI, P. et al. Updates on liquid biopsy: current trends and future perspectives for clinical application in solid tumors. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 59, n. 7, p. 1181-1200, 2021. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1685>

PISETSKY, D. S.; GAULEY, J.; ULLAL, A. J. Microparticles as a source of extracellular DNA. **Immunologic Research**, v. 49, n. 1-3, p. 227-234, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12026-010-8184-8>

PLACE, A. E.; JIN HUH, S.; POLYAK, K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 227, 2011. <https://doi.org/10.1186/bcr2912>

PROVENZANO, E.; ULANER, G. A.; CHIN, S.-F. Molecular Classification of Breast Cancer. **PET clinics**, v. 13, n. 3, p. 325-338, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004>

RODRIGUEZ-DORANTES, M. et al. MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. **OncoTargets and Therapy**, p. 1327, 2014. <https://doi.org/10.2147/OTT.S61562>

ROSS, J. S. et al. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. **The Oncologist**, v. 14, n. 4, p. 320-368, 2009. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0230>

RUSSO, A.; GIORDANO, A.; ROLFO, C. (org.). **Liquid Biopsy in Cancer Patients: The Hand Lens for Tumor Evolution**. Cham: Springer International Publishing, 2017. (Current Clinical Pathology). https://doi.org/10.1007/978-3-319-55661-1_20

SAHU, R. K.; MORDECHAI, S. Fourier transform infrared spectroscopy in cancer detection. **Future Oncology (London, England)**, v. 1, n. 5, p. 635-647, 2005. <https://doi.org/10.2217/14796694.1.5.635>

SALA, A. et al. Biofluid diagnostics by FTIR spectroscopy: A platform technology for cancer detection. **Cancer Letters**, v. 477, p. 122-130, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.020>

SANTEN, R. J. **Benign Breast Disease in Women**. In: FEINGOLD, K. R. et al. (org.). Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000. E-book. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278994/>. Acesso em: 10 dez. 2021.

SHERMAN, M. E. et al. Breast Cancer Risk and Use of Nonsteroidal Anti-inflammatory Agents After a Benign Breast Biopsy. **Cancer Prevention Research** (Philadelphia, Pa.), v. 13, n. 11, p. 967-976, 2020. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-20-0178>

SHIEN, T.; IWATA, H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 50, n. 3, p. 225-229, 2020. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyz213>

SIRAVEGNA, G. et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews*. **Clinical Oncology**, v. 14, n. 9, p. 531-548, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>

SMETHERMAN, D. H. Screening, Imaging, and Image-Guided Biopsy Techniques for Breast Cancer. **Surgical Clinics of North America**, v. 93, n. 2, p. 309-327, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2013.01.004>

STACHS, A. et al. Benign Breast Disease in Women. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 116, n. 33-34, p. 565-574, 2019. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0565>

SU, K.-Y.; LEE, W.-L. Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Cancer Screening and Diagnostic Tool: A Review and Prospects. **Cancers**, v. 12, n. 1, p. 115, 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12010115>

SUBRA, C. et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 8, p. 2105-2120, 2010. <https://doi.org/10.1194/jlr.M003657>

SULTANIA, M. et al. Validation of Different Techniques in Physical Examination of Breast. **Indian Journal of Surgery**, v. 79, n. 3, p. 219-225, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12262-016-1470-5>

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

TENG, Y. et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14448, 2017. <https://doi.org/10.1038/ncomms14448>

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 8, p. 569-579, 2002. <https://doi.org/10.1038/nri855>

US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE. Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. **Annals of Internal**

Medicine, v. 151, n. 10, p. 716, 2009. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-10-200911170-00008>

UTOGUCHI, N. et al. Effect of tumour cell-conditioned medium on endothelial macromolecular permeability and its correlation with collagen. **British Journal of Cancer**, v. 73, n. 1, p. 24-28, 1996. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.5>

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 654-659, 2007. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>

VAN DALUM, G. et al. Circulating tumor cells before and during follow-up after breast cancer surgery. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 1, p. 407-413, 2015. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2694>

VIDI, P.-A.; BISSELL, M. J.; LELIÈVRE, S. A. Three-Dimensional Culture of Human Breast Epithelial Cells: **The How and the Why. Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 945, p. 193-219, 2013. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-125-7_13

VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 465, n. 1, p. 1-14, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288-300, 2019. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>

WALSH, M. J. et al. Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopic imaging for breast histopathology. **Vibrational Spectroscopy**, v. 60, p. 23-28, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.01.010>

WELCH, H. G. et al. Breast-Cancer Tumor Size, Overdiagnosis, and Mammography Screening Effectiveness. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 15, p. 1438-1447, 2016. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600249>

WHITESIDE, T. L. **Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression**. In: ADVANCES IN CLINICAL CHEMISTRY. [S. l.]: Elsevier, 2016. v. 74, p. 103-141. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.12.005>

WHO. **WHO Classification of Tumours of the Breast**. [S. l.: s. n.], 2012. E-book. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-The-Breast-2012>. Acesso em: 12 dez. 2021.

YUE, W. et al. Machine Learning with Applications in Breast Cancer Diagnosis and Prognosis. **Designs**, v. 2, n. 2, p. 13, 2018. <https://doi.org/10.3390/designs2020013>

**CAPÍTULO II — “MÉTODO, PAINEL E KIT PARA O DIAGNÓSTICO
E MONITORAMENTO DO TRATAMENTO DE PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA”**



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2020 026395 1

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MÉTODO, PAINEL E KIT PARA O DIAGNÓSTICO E
MONITORAMENTO DO TRATAMENTO DE PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA

A patente não será disponibilizada na íntegra por questões legais relacionadas ao sigilo exigido pela Universidade Federal de Uberlândia.

**CAPÍTULO III — “USO DE ALGORITMOS DE APRENDIZADO DE
MÁQUINA PARA A DETECÇÃO E TRIAGEM DO CÂNCER DE
MAMA”**



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2021 026038 6

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de USO DE ALGORITMOS DE APRENDIZADO DE MÁQUINA PARA A
Utilidade (54): DETECÇÃO E TRIAGEM DO CÂNCER DE MAMA

A patente não será disponibilizada na íntegra por questões legais relacionadas ao sigilo exigido pela Universidade Federal de Uberlândia.

CONCLUSÕES

Nesta tese, foram desenvolvidas plataformas biotecnológicas para a triagem, diagnóstico do câncer de mama e monitoramento do tratamento visando solucionar problemas relacionados aos exames convencionais utilizados na rotina clínica. Para o diagnóstico e monitoramento foi desenvolvido um método que através do sangue periférico analisa a ausência ou presença de marcadores em células tumorais circulantes por citometria de fluxo. Esse método possibilitou distinguir pacientes com câncer de mama de doença benigna da mama e apresentou diferenças na porcentagem de células tumorais circulantes em pacientes submetidas à quimioterapia daquelas que não haviam realizado o tratamento. Neste sentido, desenvolvemos um método que utiliza um painel de marcadores que poderá detectar a presença de células que poderão formar metástases. Além disso, possibilitará a identificação precoce dos pacientes que não respondem efetivamente ao tratamento. Para a triagem, foi desenvolvido um método que utiliza algoritmo para a análise de dados da saliva obtidos por espectroscopia que diferencia pacientes com câncer de mama de pacientes com doença benigna da mama independentemente da idade e constituição física das mamas. Portanto, os métodos desenvolvidos fornecem plataformas biotecnológicas que possibilitam a biópsia líquida do câncer de mama e poderão ser utilizadas como ferramentas auxiliares aos exames convencionais, auxiliando na tomada de decisões dos profissionais da saúde e, por conseguinte, evitando tratamentos desnecessários e ineficientes.