

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUANA DA SILVA ALVES

DETECÇÃO DE UMA SUBPOPULAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM
AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

PATOS DE MINAS – MG
FEVEREIRO DE 2026

LUANA DA SILVA ALVES

**DETECÇÃO DE UMA SUBPOPULAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM
AMOSTRAS DE SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia

Prof. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

**PATOS DE MINAS – MG
FEVEREIRO DE 2026**

LUANA DA SILVA ALVES

Deteccção de uma subpopulação de vesículas extracelulares em amostras de soro de pacientes com câncer de mama

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Banca examinadora:

Profª. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – Instituto de Biotecnologia - UFU
Presidente

Dra. Paula Marynella Alves Pereira Lima – Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro

Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas – MG, 26 de fevereiro de 2026

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o Autor da vida, que colocou esse sonho em meu coração e proveu todas as coisas.

Agradeço aos meus pais, Fernanda e Stanlei, que me deram asas, força e, principalmente, fé. Sem vocês e suas orações, nada disso seria possível. Vocês abraçaram meu sonho, lutaram comigo e por mim, e por isso, essa conquista tem o nome e o amor de vocês. Obrigada por serem meus maiores exemplos. Deus não poderia ter me agraciado mais do que ao me permitir ter vocês como pais.

Agradeço ao meu companheiro, João Pedro, que esteve ao meu lado desde o primeiro dia dessa jornada. Sua presença foi essencial para chegar aqui, oferecendo apoio, cuidado e incentivo constantes. Obrigada por ser meu abrigo nos momentos difíceis, nas lágrimas e na saudade que sempre me apertou. Você me motivou todos os dias e tornou esse caminho mais leve. Esse trabalho carrega seu amor e paciência.

Agradeço aos meus tios e padrinhos, Sabin, Camila, Érika e Rita, que desde pequena me deram livros, um microscópio, me mostraram que o mundo ia além e plantaram em mim a semente da ciência e do conhecimento. O incentivo, o apoio constante e a confiança no meu potencial fizeram e continuam fazendo toda a diferença na minha vida, permitindo que eu chegasse até aqui.

Aos meus avós, Lourdes, Jacira, Miguel e Renato, pelo amor incondicional, pelo cuidado constante e pelos ensinamentos que moldaram quem eu sou. A sabedoria, o incentivo e as orações de vocês não conhecem limites e sempre me deram força.

À minha tia Cida, a quem tenho como avó, e sua família, Sandro e Valéria, que me incentivaram e tornaram esse sonho possível em tempos difíceis. E à minha prima Hana, que um dia me disse “Você vai gostar da biotecnologia”.

Essa conquista tem uma porção de cada um de vocês.

Ao meu tio Alexandre, com quem cresci e pude aprender sobre a vida, sobre o respeito e a simplicidade todos os dias. Crescer ao seu lado me ensinou que a genética vai muito além de conceitos e livros: ela carrega singularidades, humanidade e amor. E esse terceiro cromossomo é puramente amor.

Aos meus dois pequenos amores, Heitor e Alícia. Tenham coragem, fé e amor.

Aos meus sogros, Elizelma e Osmar, que me receberam como filha. O cuidado de vocês me deu forças todos os dias. Obrigada pelos incentivos e conselhos. Vocês são o cuidado de Deus estendido a mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, por ter me concedido esta oportunidade e por acreditar em mim, mesmo nos momentos em que eu mesma duvidei. Agradeço por todos os ensinamentos, pela paciência, dedicação e orientação ao longo desta caminhada. Sua sabedoria e fé são fontes de inspiração.

À minha irmã de coração, Dâmaris, que sempre esteve ao meu lado, celebrando, orando e chorando, mesmo com tanta distância. Às amigas de longa data que tenho tanto carinho, Fernanda, Thaís e Ana. Vocês são maravilhosas.

A todos os amigos e companheiros de laboratório que a graduação me deu. À Fernanda, que me acompanhou e ensinou com tanto afinho durante os experimentos. À Gislaine, que sempre esteve disposta a me ajudar, ouvir e aconselhar. Ao Henrique, por todas as boas conversas. À Catarina, por seu humor ácido que tanto me diverte. Ao André, por todo o seu carinho (*It's nice to have a friend*). À Gabi, por ser sempre tão querida. À Júlia, pela parceria e leveza no dia a dia. Ter vocês nessa caminhada foi incrível e deixou tudo mais leve. Que venham mais noites de jogos e risos.

Ao Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas à Dra. Luciana de Oliveira, que me deram a oportunidade de estagiar no LDAM e enriquecer tanto em conhecimento.

A todos os professores e colaboradores da UFU – Patos de Minas, que contribuíram de forma significativa para a minha formação profissional e pessoal.

Aos membros da banca, pela disponibilidade, atenção e contribuições.

A todos que passaram pela minha vida e, de alguma forma, contribuíram para que esse momento se tornasse realidade.

"Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês", diz o Senhor, "planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro."

Jeremias, 29:11

RESUMO

O câncer de mama (CM) é a neoplasia mais comum entre as mulheres e uma das principais causas de mortalidade feminina em todo o mundo. Entre as estratégias de detecção e rastreamento, destaca-se a mamografia, sendo que o diagnóstico precisa ser confirmado por biópsia com agulha. Diante desse cenário, métodos menos invasivos, sensíveis e capazes de identificar alterações moleculares vêm sendo explorados, com especial atenção dedicada à biópsia líquida, na qual fluidos corporais, especialmente o sangue, são coletados e analisados para a caracterização do tumor. Nesse contexto, o presente estudo objetivou identificar, no soro de pacientes com CM, uma subpopulação de vesículas extracelulares CD63-positivas utilizando peptídeo previamente selecionado por Phage Display, e correlacionar a absorbância com dados clínicos dos pacientes. Para isso, foram conduzidos ensaios de Magneto-ELISA com partículas tosiladas e considerados como parâmetros o diagnóstico (CM x doença benigna da mama), níveis de Ki-67, expressão de receptores hormonais e de crescimento, subtipo molecular, estadiamento patológico e grau histológico. Os valores de absorbância foram comparados por teste t Mann Whitney, com diferença estatisticamente significativa verificada na discriminação de tumores de grau de Nottingham 1 versus grau 3 ($p = 0,0056$). Foi, então, construída a curva ROC com área sob a curva de 0,97 ($p = 0,0087$), o que demonstra elevado potencial do Magneto-ELISA em discriminar os pacientes entre grau 1 e 3. Assim, evidenciam a importância do estudo e da utilização da biópsia líquida na caracterização de pacientes oncológicos.

Palavras-chave: Câncer de mama. ELISA. Prognóstico. Vesículas extracelulares

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most common neoplasm among women and one of the leading causes of female mortality worldwide. Among detection and screening strategies, mammography stands out; however, diagnosis must be confirmed by needle biopsy. In this context, less invasive and sensitive methods capable of identifying molecular alterations have been increasingly explored, with special attention given to liquid biopsy, in which body fluids, especially blood, are collected and analyzed for tumor characterization. Within this framework, the present study aimed to identify, in the serum of BC patients, a CD63-positive exosome subpopulation using a peptide previously selected by Phage Display, and to correlate absorbance values with patients' clinical data. To this end, Magneto-ELISA assays using tosylated particles were performed, considering as parameters the diagnosis (BC versus benign breast disease), Ki-67 levels, expression of hormonal and growth receptors, molecular subtype, pathological staging, and histological grade. The absorbance values were compared using the Mann–Whitney t test, with a statistically significant difference observed in the discrimination of Nottingham grade 1 versus grade 3 tumors ($p = 0.0056$). A ROC curve was then constructed, with an area under the curve of 0.97 ($p = 0.0087$), demonstrating the high potential of Magneto-ELISA to discriminate patients between grades 1 and 3. Thus, these findings highlight the importance of studying and utilizing liquid biopsy in the characterization of oncology patients.

Keywords: *Breast cancer. ELISA. Extracellular vesicles. Prognosis.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS: *American Cancer Society*
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
AUC: Área sob a curva
BL: Biópsia líquida
BRCA1: Câncer de Mama 1
BRCA2: Câncer de Mama 2
BSA: Albumina Sérica Bovina
CDIS: Carcinoma Ductal *in situ*
cfDNA: DNA Livre de Célula
CM: Câncer de Mama
CNS: Conselho Nacional de Saúde
CTCs: Células Tumorais Circulantes
ctDNA: DNA Tumoral circulante
ctRNA: RNA Tumoral Circulante
DAB: 3,3'-diaminobenzidina
DBM: Doença Benigna da Mama
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
ER: Receptor de Estrógeno
EVs: Vesículas Extracelulares
FGF1/2: Fator de Crescimento de Fibroblastos 1 e 2
gDNA: DNA Genômico
GH: Hormônio do Crescimento
GPC1: Proteína de Superfície Glypican-1
HER2: Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HER2E: Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano Enriquecido
HRP: Peroxidase de Raiz-Forte
IARC: Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IDC: Carcinoma Ductal Invasivo
IDC-NST: Carcinoma Ductal Invasivo de Subtipo Não Específico
ILC: Carcinoma Lobular Invasivo
ILVs: Vesículas Intraluminais
INCA: Instituto Nacional do Câncer
Ki-67: Marcador nuclear de proliferação celular
LA: Luminal A
LB: Luminal B
LCIS: Carcinoma Lobular *in situ*
lncRNAs: RNA longo não codificante
miRNAs: MicroRNA
MS: Ministério da Saúde
MVBS: Corpos Multivesiculares
OMS: Organização Mundial da Saúde
OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde
PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato
PDB: Doença de Paget da Mama

PET: Tomografia por Emissão de Pósitrons
PM: Partícula Magnética
PR: Receptor de Progesterona
PRL: Hormônio Prolactina
p53: Proteína supressora tumoral
ROC: Curva Característica de Operação do Receptor
SASP: Fenótipo Secretor Associado à Senescência Celular
TAAs: Antígenos Associados a Tumores
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TN: Triplo Negativo
TNM: Sistema de estadiamento da *American Joint Committee on Cancer*
TSG101: Proteína do Gene 101 de Suscetibilidade Tumoral
VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcas do câncer, incluindo características promotoras e facilitadoras.....	14
Figura 2. Representação anatômica e histológica da mama. (A) Estrutura anatômica da mama representando esquematicamente os ductos, lóbulos, aréola, mamilo, e linfonodos, bem como sua disposição na parede torácica. (B) Organização celular do epitélio mamário, com a disposição das células luminiais, mioepiteliais e progenitoras em relação à membrana basal.....	16
Figura 3. Fluídos e biomarcadores analisados por Biópsia líquida.....	24
Figura 4. Biogênese dos exossomos. 1. Invaginação da membrana plasmática que forma o endossoma inicial. 2. Invaginação da membrana do endossoma, formando as vesículas intraluminiais. 3. Corpo multivesicular tardio se funde à membrana plasmática, liberando os exossomos.....	26
Figura 5. Moléculas presentes em exossomos. Tetraspaninas e proteínas de transporte encontram-se expressas na membrana e, internamente, são detectadas proteínas, material genético e metabólitos.....	27
Figura 6. Esquema representativo do ensaio de Magneto-ELISA para detecção de vesículas extracelulares. Partículas magnéticas funcionalizadas com anticorpo capturam uma subpopulação de exossomos, que são posteriormente reconhecidos pelo peptídeo C3-biotina, e então revelados com a estreptavidina conjugada à enzima repórter.....	32
Figura 7. Otimização da diluição da estreptavidina marcada com HRP reativa ao peptídeo C3-biotina. (A) Diluição 500 ng/mL. (B) Diluição 50 ng/mL. (C) Diluição 10 ng/mL....	33
Figura 8. Otimização da diluição de soro e concentração de bloqueio para o ensaio de magneto-ELISA. (A) Absorbância em 450 nm para diferentes diluições de soro de pacientes com câncer de mama (CM). (B) Absorbância em 450nm para diferentes concentrações de BSA. CN: controle negativo. CM 1/2: amostra de soro de paciente com câncer de mama. DBM 1/2: amostra de soro de paciente com doença benigna da mama.....	35
Figura 9. Absorbância (OD450 nm) registrada em magneto-ELISA conduzido em soro de pacientes. (A) Comparação dos valores de OD450 nm entre soro de pacientes com câncer de mama (CM) e doença benigna da mama (DBM). (B) comparação dos valores de OD450 nm categorizados pela mediana da idade dos pacientes com CM.....	37
Figura 10. Absorbância (OD450 nm) registrada em magneto-ELISA conduzido em soro de pacientes com câncer de mama. (A) Comparação dos valores de OD450 nm entre soro de pacientes com câncer de mama conforme a expressão de receptor de estrógeno (ER). (B) Comparação dos valores de OD450 nm entre soro de pacientes com câncer de mama conforme a expressão de receptor de progesterona (PR). (C) Comparação dos valores de OD450 nm entre soro de pacientes com câncer de mama conforme a expressão do receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). (D) Comparação dos valores de OD450 nm entre soro de pacientes com câncer de mama conforme a expressão de p53.....	38
Figura 11. Absorbância (OD450 nm) registrada em magneto-ELISA conduzido em soro de pacientes com câncer de mama estratificados por subtipo molecular. LA: Luminal	

A; LB: Luminal B; HERE: fator de crescimento epidérmico humano 2 enriquecido e TN: triplo-negativo.....39

Figura 12- Absorbância (OD450 nm) registrada em magneto-ELISA conduzido em soro de pacientes com câncer de mama. (A) Comparação dos valores de OD450 nm entre tumores com diferentes extensões. (B) Comparação dos valores de OD450 nm entre tumores com graus de Nottingham diferentes. (C) Gráfico de curva ROC para análise de especificidade e sensibilidade de discriminação conforme grau histológico. *p = 0,0056. AUC: área sob a curva.....40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos	12
1.2 Câncer de mama.....	15
1.2.1 Classificação de tumores mamários.....	17
1.2.1.1 Classificação Histológica.....	17
1.2.1.2 Classificação Molecular.....	19
1.2.1.3 Estadiamento e Prognóstico.....	20
1.2.2 Diagnóstico	21
1.2.3 Biópsia Líquida.....	23
1.3 Exossomos	25
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Grupo de estudo	29
3.2 Dot-blot.....	31
3.3 Imobilização de CD63	31
3.4 Magneto-ELISA.....	31
3.5 Análises estatísticas.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Otimização	33
4.2 Magneto-ELISA em soro de pacientes	36
5 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos

O termo câncer abrange mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células transformadas, independente dos mecanismos moleculares de controle, as quais apresentam a capacidade de atingir diferentes tecidos e órgãos (INCA, 2022). Os primeiros registros da doença datam de 3.000 a.C., identificados em múmias egípcias. Entretanto, a designação “câncer” surgiu somente em meados de 400 a.C. do grego *karkínos*, que significa caranguejo, fazendo jus à sua morfologia invasiva (INCA, 2011).

O surgimento do câncer é resultante de alterações genéticas adquiridas por exposição ambiental ou herdadas, as quais causam instabilidade genômica. Destacam-se agressores químicos, físicos ou biológicos, bem como mudanças epigenéticas como metilação e acetilação de DNA e /ou histonas. Os genes intimamente relacionados ao surgimento de tumores são conhecidos como oncogenes e supressores tumorais. Os oncogenes surgem dos proto-oncogenes, que naturalmente conduzem o processo de divisão celular. Contudo, alterações genéticas são responsáveis por um ganho de função, estimulando sucessivas mitoses desordenadas. Os supressores, por sua vez, identificam células danificadas e promovem seu reparo, mas quando inativados por mutações, perdem essa capacidade, contribuindo para o surgimento da doença (Boaretto *et al.*, 2023).

A carcinogênese é um processo complexo, que ocorre, em geral, de forma lenta e é composta por três estágios principais: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é caracterizada por alterações genéticas irreversíveis, que tornam a célula predisposta à transformação maligna e transmissível às células-filhas durante a mitose. Em seguida, essas células estimuladas entram em contato com agentes oncopromotores, como agentes químicos, físicos e biológicos, capazes de promover proliferação celular e imortalidade, definindo o estágio de promoção. Por fim, na progressão, a divisão celular passa a ocorrer de forma independente, garantindo o fenótipo maligno, que é reconhecido pela instabilidade, invasão a outros tecidos, alterações metabólicas e angiogênese (Kurkowiak *et al.*, 2021; INCA, 2022).

Marcas ou características dos tumores também foram descritas por Hannahan e Weinberg (2000) visando auxiliar na compreensão e no desenvolvimento de estratégias de detecção e

tratamento (Figura 1). Em 2000, foram propostos seis *hallmarks*, quais sejam: manutenção da sinalização proliferativa, inibição de supressores de crescimento, evasão à morte celular, replicação imortal, angiogênese e invasão e metástase (Hanahan; Weinberg, 2000).

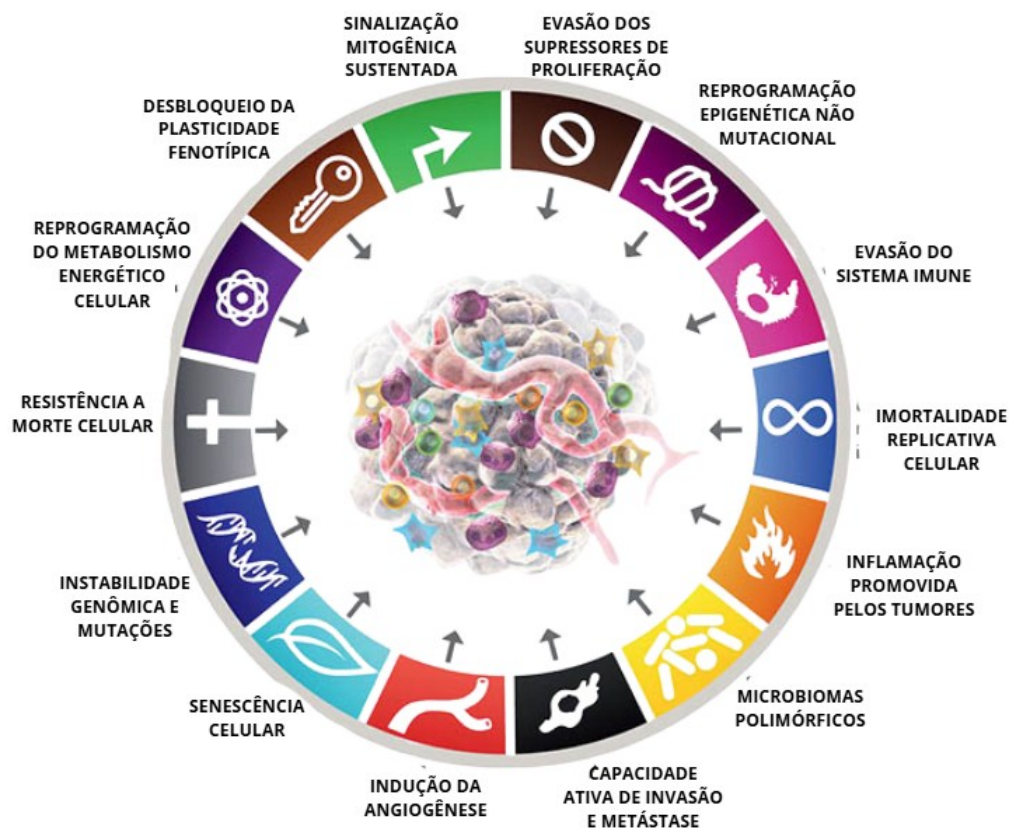
Outrossim, células malignas produzem e secretam seus próprios fatores de crescimento, mantendo uma sinalização autócrina que induz continuamente a divisão celular. Esse comportamento só é possível devido à inibição de supressores, induzindo a célula a um estado proliferativo permanente. Paralelamente, as células malignas inibem o processo apoptótico, o que garante a sobrevivência mesmo na presença de danos no DNA. O principal mecanismo inclui a inativação da proteína supressora tumoral p53 por meio de mutações em seu gene codificante. O potencial replicativo ilimitado também está presente, com a manutenção dos telômeros via expressão contínua da telomerase. Ademais, células tumorais ativam a angiogênese, um pré-requisito para a expansão clonal, com o aumento da expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos 1 e 2 (FGF1/2), permitindo a vascularização com consequente nutrição e oxigenação. Por fim, os tumores podem invadir tecidos e atingir órgãos distantes ao alterar proteínas de adesão, o que caracteriza um estágio avançado e fatal da doença (Hanahan; Weinberg, 2000).

Em 2011, quatro características promotoras da carcinogênese foram adicionadas. A primeira consiste na instabilidade genômica. O acúmulo de mutações compromete a homeostase, desregulando o sistema que monitora a integridade celular, a apoptose e senescência. A inflamação foi incluída como um evento promotor de tumores, favorecendo o crescimento por meio de moléculas que sustentam a sinalização proliferativa, incluindo espécies reativas de oxigênio, citocinas e quimiocinas. Os autores também destacaram a importância da alteração do metabolismo energético e o Efeito Warburg, identificado como uma forma não usual de aquisição de energia pelo aumento da glicólise, o que permite o desvio de vias biossintéticas. Finalmente, o escape imunológico foi citado, de modo que um microambiente imunossupressor contribui para o avanço de células malignas (Hanahan; Weinberg, 2011).

Já em 2022, novas marcas facilitadoras foram publicadas incluindo o desbloqueio da diferenciação terminal, permitindo que a célula desempenhe funções diferentes do seu papel biológico e a aquisição de um fenótipo de células tronco com potencial invasivo. A senescência celular também favorece o câncer, pois a ativação de um fenótipo secretor associado à senescência (SASP) libera proteínas bioativas, que deveriam promover a morte programada, mas estimulam a

progressão por meio de sinalização proliferativa e induzem a angiogênese, metástase e invasão. A reprogramação epigenética não mutacional, por sua vez, modifica o funcionamento gênico através de metilações e acetilações. Por fim, os microbiomas, formados por bactérias e fungos presentes nos tecidos e órgãos, têm se mostrado preponderantes no contexto de tumores, visto que podem ter efeitos positivos ou negativos na progressão e resposta terapêutica (Hanahan, 2022).

Figura 1 - Marcas do câncer, incluindo características promotoras e facilitadoras.



Fonte: Adaptado de *Hallmarks of Cancer: New Dimensions* (Hanahan, 2022).

A gravidade do câncer e os desafios diante da multiplicidade de eventos a ele associados são refletidos em dados epidemiológicos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que ocorreram 20 milhões de novos casos de câncer em 2022, de modo que 1 a cada 5 pessoas desenvolveu a doença ao longo da vida, com 9,6 milhões de mortes. A previsão é que, para 2050, sejam registrados 35 milhões de novos casos, o que equivale a um aumento de 77%, reflexo do envelhecimento e das mudanças no estilo de vida populacional (OPAS, 2024). No Brasil, a realidade não é diferente, dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) revelam que em 2022 o Brasil registrou 279 mil óbitos e, para 2050, são esperados 554 mil mortes, um

aumento de 98,6%. Ainda, segundo o INCA (2026), para cada ano do triênio de 2026 a 2028, estima-se 781 mil novos casos de câncer.

O câncer de pulmão é o mais prevalente no mundo, representando 12,4% de todos os diagnósticos, seguido pelo câncer de mama (CM), com 11,6% (OPAS, 2024). No Brasil, após o câncer de pele não melanoma, o CM é o mais frequentemente diagnosticado, contabilizando 78 mil pacientes, com 20.165 óbitos em 2023, o que equivale a um risco de 18,59 mortes por 100 mil mulheres (INCA, 2026).

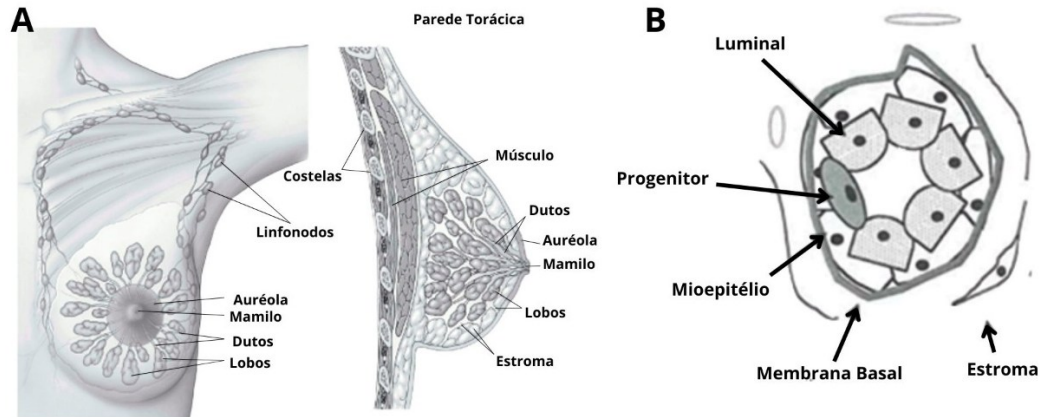
1.2 Câncer de mama

O CM é caracterizado pelo crescimento desordenado e maligno de células do tecido mamário (Filgo *et al.*, 2016). Nos mamíferos em geral, a mama começa seu desenvolvimento ainda na embriogênese, continuando, nas fêmeas, durante a puberdade. Atinge sua maturidade na gestação e lactação, sendo induzida por hormônios, principalmente hormônio do crescimento (GH), prolactina (PRL), progesterona e estrogênio (Macias; Hinck, 2012).

Anatomicamente, as mamas são órgãos pares, simétricos, localizadas na parede anterior do tórax (Figura 2). Sua forma e tamanho são relacionados com a quantidade de tecido adiposo, etnia, peso e idade. São revestidas por um tecido liso e elástico, cujo centro é preenchido pelo mamilo. Este é mais espesso, enrugado e pigmentado, com forma circular e contém a aréola e a papila (Rolim; Martins, 2002). Internamente, cada mama possui entre 15 e 20 lobos independentes e separados por tecido fibroso, que se subdividem em lóbulos. Cada um se conecta a um ducto que transporta o leite até o mamilo (Figura 2A). A mama é suprida por muitos nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, além do tecido glandular (Santana; Borges, 2015).

Histologicamente, o órgão é composto, essencialmente, por células luminais e mioepiteliais. As células luminais revestem os ductos e se encarregam de produzir o leite mediante estímulos recebidos pelos receptores hormonais. Células mioepiteliais estão em contato com a membrana basal, com função contrátil. As células-tronco, também presentes, renovam as populações celulares (Figura 2B) (Birnbaum *et al.*, 2004; Macias; Hinck, 2012).

Figura 2 - Representação anatômica e histológica da mama. (A) Estrutura anatômica da mama representando esquematicamente os ductos, lóbulos, aréola, mamilo, e linfonodos, bem como sua disposição na parede torácica. (B) Organização celular do epitélio mamário, com a disposição das células luminais, mioepiteliais e progenitoras em relação à membrana basal.



Fonte: A: adaptado de ACS, 2021; B: adaptado de Birnbaum *et al.*, 2004

O CM pode atingir diferentes células, como as do epitélio lobular e ductal, sendo uma doença mais prevalente em mulheres, mas, ocasionalmente, acomete homens (ACS, 2016). A maioria dos diagnósticos, especialmente em países com baixo índice de desenvolvimento, ocorre quando a doença já se encontra em estágios avançados, o que dificulta um tratamento eficiente e aumenta o índice de mortalidade diante da ocorrência de metástases (CNS, 2023). Os sintomas não são específicos e incluem o aparecimento de nódulos, manchas, inchaço, irritação, linfonodos aumentados e retração do mamilo (MS).

Em 2022, a incidência de CM foi de 2,3 milhões de casos e, no Brasil, para cada ano do triênio 2026-2028, estima-se 71,57 novos diagnósticos a cada 100 mil mulheres. Assim, desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o CM é o mais incidente no país em todas as regiões (INCA, 2026; OPAS, 2024). Fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam o surgimento dessa doença. A idade se destaca, pois ao longo da vida as exposições a carcinógenos vão acumulando, juntamente com alterações moleculares causadas pelo envelhecimento. Além disso, a herança genética e o histórico familiar também são importantes. Os genes, do inglês, *breast cancer gene 1 e 2*, *BRCA1* (17q21) e *BRCA2* (13q12.3), são supressores tumorais responsáveis por reparar danos no DNA, regular a expressão gênica e controlar o ciclo celular. Quando mutados, perdem sua função, predispondo em 80% o desenvolvimento de CM e em 60% de câncer de ovário. O histórico familiar também é importante e contabiliza 5% a 10% dos casos. Nesse contexto, mulheres com parente de primeiro grau com CM apresentam, em geral, um risco duplicado de

ocorrência da doença (Coelho *et al.*, 2018; Brewer *et al.*, 2017; INCA, 2023). Outros fatores intrínsecos descritos na literatura são menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade e primeira gestação tardia (Amendola *et al.*, 2005; Manouchehri *et al.*, 2022). Quanto aos fatores modificáveis, a escolha de uma vida saudável, sem tabagismo e alcoolismo, unidos à alimentação balanceada e prática de atividade física protegem o organismo contra os tumores em geral. Já a obesidade, o uso de hormônios exógenos e exposição à radiação ionizante, aumentam a incidência de CM (INCA, 2023).

1.2.1 Classificação de tumores mamários

Classificar os tumores mamários é essencial para determinar suas características, incluindo tipos celulares afetados, extensão, avanço e aspectos moleculares. Dessa forma, torna-se possível estabelecer um prognóstico, traçar um tratamento mais adequado e direcionar o manejo dos pacientes. A primeira classificação do CM é baseada no tipo de tecido atingido, diferenciados em sarcomas e carcinomas. Define-se sarcomas cânceres de tecidos moles, que afetam músculos, gordura e tecido conjuntivo. Carcinomas, por sua vez, se originam no tecido epitelial, sendo este o mais comumente diagnosticado nas mamas. O CM também é subclassificado quanto ao tipo histológico e molecular, além de ser definido seu estadiamento patológico (ACS, 2016).

1.2.1.1 Classificação histológica

A classificação histológica considera a aparência das células sob o microscópio. Sendo assim, os carcinomas podem ter origem nos lóbulos ou ductos, nomeados como carcinoma lobular ou carcinoma ductal, respectivamente. Complementando a nomenclatura, o adjetivo *in situ* é definido quando não atinge outros tecidos adjacentes na mama e, invasivos, quando já ultrapassou a membrana basal, sendo considerado um estágio pré-metastático. Importante salientar que tumores invasivos migram para diferentes regiões pela circulação sanguínea e linfática, podendo alcançar órgãos distantes. Nessa perspectiva, a classificação histológica pode ser realizada de acordo com a localização e as características celulares. Assim, os carcinomas de mama invasivos dividem-se em carcinoma ductal invasivo (IDC), que corresponde a 70% a 80% dos casos, e carcinoma lobular

invasivo (ILC), mais comum em idades avançadas, responsável por cerca de 15% dos eventos (ACS, 2021; INCA, 2019; Weigelt; Geyer; Reis-Filho, 2010; Akram *et al.*, 2017).

Os tumores invasivos podem ainda ser subdivididos em carcinoma ductal invasivo de subtipo não específico (IDC-NST), ou em subtipos especiais, como os carcinomas medular, metaplásico, apócrino, mucinoso, cribriforme, tubular e neuroendócrino. O IDC-NST é o IDC mais frequente com grande variação morfológica e clínica, representando 40% a 75% de todos os acometimentos (Probert *et al.*, 2025). Já o carcinoma medular está associado a melhor prognóstico e menor acometimento linfonodal; o metaplásico apresenta elevada agressividade e o apócrino está associado a um alto grau histológico. O mucinoso, por sua vez, apresenta prognóstico favorável e acomete, em geral, mulheres acima de 60 anos; o carcinoma cribriforme possui bom prognóstico e baixa taxa de metástase e o tubular está frequentemente presente em lesões proliferativas pré-malignas. Por fim, o carcinoma neuroendócrino é comumente diagnosticado em pacientes com idades avançadas (Nascimento; Otoni, 2020).

Os tumores *in situ* são divididos em dois grupos de acordo com o tecido de origem, lóbulos ou ductos, sendo que destes, 20 a 25% são carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e 0,5 a 4% representa carcinoma lobular *in situ* (LCIS) (Rubio; El-Ashry, 2023). Ainda há classificações que não se enquadram em invasivos ou *in situ*, como o CM inflamatório, um tipo histológico raro, agressivo e metastático, no qual os seios adquirem aparência vermelha, inchada e quentes devido às células cancerígenas bloquearem os vasos linfáticos (Bertucci *et al.*, 2024). Já a doença de Paget (PDB) apresenta alterações visíveis no mamilo, com erupções cutâneas e coceira, sendo que de todos os casos de CM, entre 1 e 4% são PDB (Vieira *et al.*, 2014). Os tumores filoides são extremamente raros, sendo responsável por menos de 1% dos relatos de CM, e de forma geral, atingem os tecidos conjuntivos da mama (Shin; Seung Koo, 2023).

O Grau Histológico de Nottingham também é analisado, sendo um importante fator prognóstico para tomada de decisões clínicas considerando, como critério, a formação dos túbulos, o grau nuclear e contagens mitóticas. Nesse contexto, são considerado três graus histológicos, sendo o primeiro caracterizado pelo tumor bem diferenciado com proliferação lenta, o que contribui para uma sobrevida em 5 anos alta (95%). O grau 2 refere-se a um tumor com diferenciação e proliferação moderados, resultando em uma sobrevida de 75% em 5 anos. Por fim, no terceiro grau, há pouca diferenciação e alta proliferação, com sobrevida média em 5 anos baixa (50%) (Wang *et al.*, 2022; Li, J. *et al.*, 2020).

1.2.1.2 Classificação Molecular

Tumores mamários também são classificados molecularmente considerando a expressão de receptores de estrogênio (ER), de progesterona (PR) e do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER2). Aproximadamente 75% das lesões expressam ao menos um desses receptores (Harbeck *et al.*, 2019; Orrantia-Borunda *et al.*, 2022). A proteína Ki-67 também é analisada, uma vez que é expressa durante as fases ativas do ciclo celular. Dessa maneira, sua presença indica uma atividade proliferativa que pode ser intimamente correlacionada à agressividade do tumor (Thakur, 2009; Li, L. *et al.*, 2014). Nessa perspectiva, a *International Ki-67 in Breast Cancer Working Group*, em 2021, recomendou um sistema de pontos de corte para Ki-67, de modo que percentuais $\leq 5\%$ indicam baixa proliferação e $\geq 30\%$ alta proliferação (Shim *et al.*, 2023).

Atualmente, do ponto de vista clínico, são considerados quatro subtipos moleculares de CM: Luminal A (LA), Luminal B (LB), HER2- enriquecido (HER2E) e Triplo Negativo (TN) (Al-Thoubaity, 2020). A relação entre os receptores e a classificação é descrita na Tabela 1. Os LA (ER/PR+ e HER2-), apresentam o melhor prognóstico, principalmente devido ao crescimento lento, com menor taxa de recidiva. Os LB, por sua vez, se diferenciam pela maior agressividade comparados aos LA, uma vez que apresentam altos níveis de Ki-67 (Gao; Swain, 2018). Considerando a expressão de HER2, os tumores mamários podem ser classificados como HER2-luminal, quando também são positivos para os receptores hormonais, ou HER2E (ER- e PR-). Finalmente, os TN contabilizam 15-20% dos casos e acometem principalmente mulheres com menos de 40 anos e afro-americanas. Sua elevada taxa proliferativa é relacionada com instabilidade genômica e mutação nos genes *BRCA1* e *TP53*. (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022).

Tabela 1 - Subtipos moleculares de câncer de mama.

Classificação	Marcadores			
	RE	PR	HER2	Ki-67
Luminal A	+	+	-	< 20%
Luminal B	+	+	-	> 20%
HER2-luminal	+	+	+	15-30%
HER2-enriquecido	-	-	+	> 30%
Triplo-negativo	-	-	-	> 30%

ER: receptor de estrogênio; PR: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2.

Fonte- Adaptado de Orrantia-Borunda *et al.*, 2022 e Nishat *et al.*, 2024

1.2.1.3 Estadiamento e Prognóstico

O estadiamento do CM considera a disseminação das células malignas, avaliando tamanho e volume da lesão, invasão, diagnóstico histopatológico e sintomas (INCA, 2022). O sistema adotado é o TNM, onde “T” representa o tamanho do tumor, “N” a disseminação para gânglios linfáticos e “M” a presença de metástase distantes conforme descrito na Tabela 2 (Lu *et al.*, 2021).

Tabela 2 - Sistema TNM detalhado para tumores mamários conforme a Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica

Classificação	Subclassificação	Detalhamento
Extensão/ Tamanho (T)	Tx	Tumor primário não avaliado
	T0	Sem evidência de tumor primário
	Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
	T1	Tumor com diâmetro menor ou igual a 2cm
	T2	Tumor com diâmetro de 2 a 5 cm
	T3	Tumor maior que 5cm
	T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão para parede torácica e/ou pele
Disseminação para linfonodos (N)	Nx	Gânglio linfático próximo não pode ser avaliado
	N0	Câncer não se espalhou para gânglio linfático próximo
	N1	Metástase para 1 a 3 linfonodos axilares e/ou mamários internos
	N2	Metástase para 4 a 9 linfonodos axilares e/ou mamários internos
	N3	Metástase para 10 ou mais linfonodos axilares e/ou região da clavícula
Metástase em locais distantes (M)	M0	Nenhuma metástase é encontrada
	M1	Presença de metástase

Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica

Com base nas informações definidas por meio do sistema TNM, grau e presença de receptores hormonais, o CM pode ser categorizado em estágios, cujo objetivo é prever o comportamento da doença e definir um plano de tratamento (Sawaki; Shien; Iwata, 2018). Os estágios são divididos em 0, I, II, III e IV, e podem ainda ser subdivididos, como IIA e IIB. Nesse cenário, o estágio 0 é adotado para cânceres *in situ* e IV para os metastáticos, enquanto o intervalo entre eles (I, II e III) representa tumores crescentes em tamanhos e envolvimento de linfonodos (Edge; Hortobagyi; Giuliano, 2019).

Desde o início do estadiamento, em 1959, determinado pela American Joint Committee on Cancer (AJCC), o processo vem sendo atualizado, adicionando-se novos parâmetros que refletem os avanços científicos e médicos. A última atualização ocorreu em 2018, implantado pela 8ª edição do Manual de Estadiamento do AJCC (Zhu; Dogan, 2021). Agora, além do sistema de estadiamento anatômico (TNM), inclui-se o estadiamento patológico, que considera grau do tumor, a presença de receptores hormonais (PR, ER e HER2), e ainda, painel multigênico. Assim, o processo de estadiamento torna-se mais refinado, contribuindo para uma melhor escolha de terapia (Teichgraeber *et al.*, 2021).

1.2.2 Diagnóstico

Tumores mamários diagnosticados precocemente são passíveis de cura. Para isso, podem ser adotadas diferentes estratégias, incluindo a identificação da lesão em pessoas com sintomas iniciais e o rastreamento, que busca realizar testes relativamente simples em indivíduos saudáveis e sem manifestações clínicas (INCA, 2024). Nessa perspectiva, a mamografia e o autoexame são amplamente divulgados, sobretudo em políticas públicas. O autoexame consiste em promover a identificação de alterações e irregularidades nas mamas por meio de inspeções manuais e visuais. Essa conduta não torna o método conclusivo, mas ainda assim é recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela American Cancer Society (Hijrah *et al.*, 2024). A mamografia, por sua vez, é o exame de imagem mais empregado no diagnóstico precoce e triagem para CM sendo indicado pelo Ministério da Saúde a partir dos 40 anos (MS, 2025). O exame utiliza um aparelho que emite baixa radiação, criando uma imagem que permite visualizar nódulos e calcificações nas mamas (Teofilo *et al.*, 2024), detectando até 75% dos tumores antes mesmo de serem palpáveis (Tadesse; Tegaw; Abdisa, 2023).

Além da mamografia, outros exames de imagem são aplicados, auxiliando no diagnóstico. A ultrassonografia utiliza pressão acústica para criar imagens (Kratkiewicz *et al.*, 2022). O método é preferível para mulheres sintomáticas e grávidas, além de apresentar melhor sensibilidade em mulheres com mamas densas (Tadesse; Tegaw; Abdisa, 2023). A ressonância magnética oferece uma imagem volumétrica tridimensional com auxílio de agente contrastante (Kratkiewicz *et al.*, 2022). A técnica possui custo elevado, mas é efetiva para detalhamento de tamanho e características

morfológicas do tumor, mostrando com mais precisão sua localização anatômica (Nascimento; Pitta; Rêgo, 2015).

Pacientes com suspeita de metástase podem ser submetidos a tomografia por emissão de prótons (PET) e cintilografia óssea (Fowler; Strigel, 2022). O PET é um exame de imagem que se baseia no maior consumo de glicose pelas células tumorais, fenômeno conhecido como efeito Warburg. Para sua realização, radiotraçadores marcados com isótopos emissores de pósitrons são administrados no paciente. Durante o metabolismo da glicose, esses traçadores emitem radiação, que é captada pelo equipamento PET e convertida em imagens, possibilitando identificar áreas de maior atividade metabólica, evidenciando a localização de células tumorais ativas (Kapoor; Heston; Kasi, 2025). A cintilografia óssea utiliza radiofármacos para detecção de metástases, sendo bem empregado devido à sua alta sensibilidade e capacidade de diferenciação de lesões malignas e benignas (Guimarães; Costa; Silva, 2023). Nesse método, o radiotraçador emite sinal proporcional à atividade osteoblástica e ao fluxo sanguíneo regional, permitindo identificar locais de remodelamento ósseo anormal, inclusive em fases iniciais de processos metastáticos (Ouvrard *et al.*, 2024).

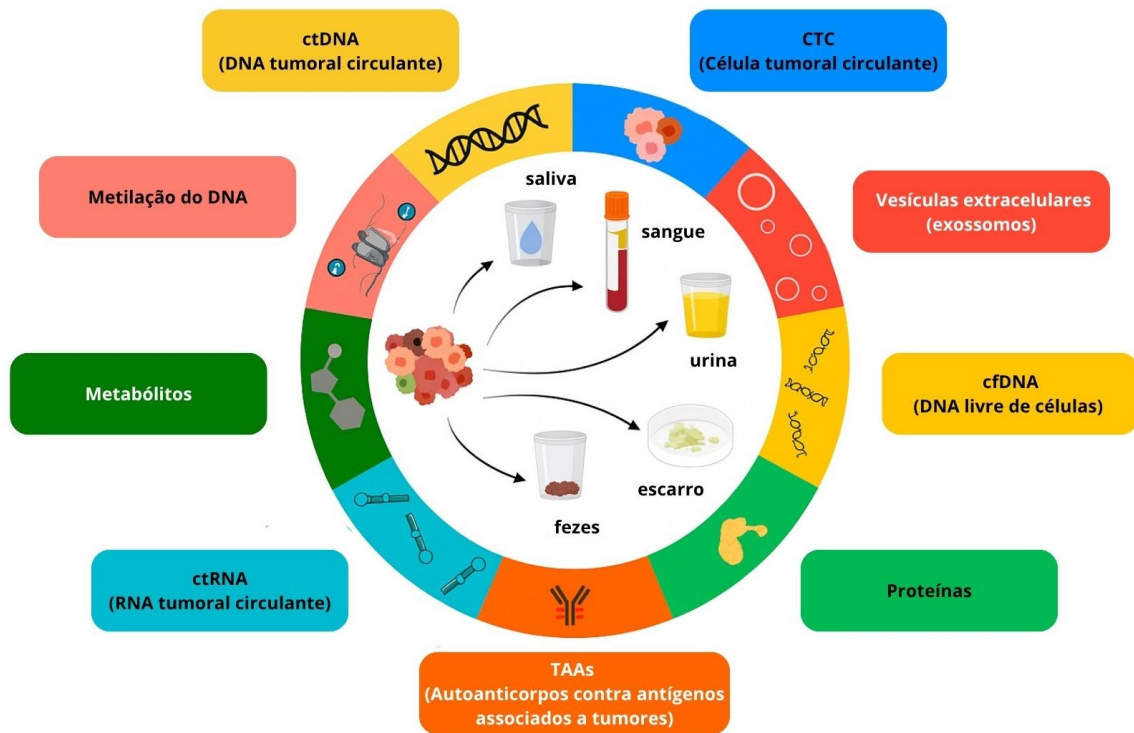
Apesar de importantes na detecção, os exames de imagem não fornecem informações sobre o perfil mutacional e as características moleculares da neoplasia. Assim, a biópsia é essencial para a confirmação do diagnóstico, consistindo na remoção de uma amostra da lesão para análise. (Obeagu; Obeagu, 2024). A biópsia realizada com agulha grossa utiliza um dispositivo a base de molas que se propulsionam até chegar ao tumor, retirando entre 3 e 5 fragmentos com diâmetro médio de 2 mm. O procedimento é simples e ocorre no ambiente ambulatorial com anestesia local, sendo auxiliado pela ultrassonografia ou ressonância magnética (Souza *et al.*, 2022). A aspiração por agulha fina também se apresenta como um método eficiente e com baixo custo, sendo mais utilizado em casos de tumores não palpáveis. Por outro lado, o método é passível de falhas, pois pode recolher pouca ou nenhuma amostra. Quando comparado à biópsia com agulha grossa, a aspiração por agulha fina apresenta menor chance de complicações e hematomas (Yu; Wei; Liu, 2012). Por fim, a mamotomia, ou biópsia a vácuo, também é um método de retirada do tecido tumoral, e, para realizá-la, utiliza-se de um dispositivo gerador de vácuo capaz de cortar e aspirar várias amostras com uma única inserção, tornando-se o modelo preferível para lesões menores (Bhatt; Whaley; Lee, 2020).

Atualmente, a biópsia tradicional, realizada com agulha, é o principal método adotado, entretanto, a técnica ainda é invasiva e não abrange a heterogeneidade do tumor, visto que representa apenas um pequeno fragmento da lesão. Nesse sentido, novas ferramentas têm sido desenvolvidas para superar as limitações atuais, destacando-se a biópsia líquida (BL), que permite o diagnóstico molecular de maneira não invasiva em fluídos como sangue, urina ou saliva (Batoool *et al.*, 2023).

1.2.3 Biópsia Líquida

A BL emergiu na oncologia como uma ferramenta de monitoramento e caracterização de tumores por meio da análise de biomarcadores em fluidos biológicos. Os biomarcadores tumorais podem ser utilizados no diagnóstico, prognóstico, monitoramento e resposta terapêutica, possibilitando, assim, uma conduta personalizada (Freitas *et al.*, 2022). Portanto, a BL apresenta vantagens importantes frente aos métodos tradicionais, podendo ser realizada antes e/ou após a cirurgia e quando não há massa detectável por imagem, além de fornecer um perfil de resposta ao tratamento adotado. De forma geral, a BL tem potencial para informar alterações epigenéticas e perfis transcriptômico, proteômico e metabólico (Lone *et al.*, 2022). Dentre os marcadores destacam-se células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (ctDNA), ctRNA, DNA livre de célula (cfDNA), metilação do DNA, metabólitos, proteínas, incluindo autoanticorpos contra antígenos associados a tumores (TAAs), e vesículas extracelulares (EVs), exemplificados na Figura 3 (Casagrande *et al.*, 2023).

Figura 3 - Amostras e biomarcadores analisados por Biópsia líquida.



Fonte: Adaptado de Casagrande *et al.*, 2023.

As CTCs são células que se desprendem do tecido tumoral e percorrem a corrente sanguínea, podendo originar metástases (Lone *et al.*, 2022). O ctDNA corresponde a fragmentos de DNA liberados por células tumorais na corrente sanguínea contendo mutações associadas ao processo de malignidade. O ctRNA é liberado das células por meio de apoptose, necrose ou secreção celular. Dentro dessa categoria, destacam-se os microRNAs (miRNAs) os RNAs longos não codificante (lncRNAs), ambos com papéis regulatórios. Tanto ctDNA quanto ctRNA, liberados exclusivamente por células tumorais, são estáveis nos fluidos corporais e refletem padrões específicos de expressão tecidual, o que possibilita associá-los a diferentes estágios e tipos tumorais. O cfDNA é um fragmento genético natural advindo de processos fisiológicos, sendo encontrado tanto em indivíduos saudáveis quanto nos doentes, utilizados para avaliar mutações genéticas (Casagrande *et al.*, 2023). Já a metilação é caracterizada por adição de um grupo metil (CH_3) a uma base nitrogenada presente no DNA. Uma vez que isso ocorre, genes são silenciados, como os supressores tumorais, ou ativados, como os oncogenes (Li, P. *et al.*, 2022). Os metabólitos também são alterados em pacientes com câncer, participando da regulação a progressão tumorais (Ren *et al.*, 2024). As proteínas e os antígenos associados a tumores (TAAs) possuem uma ligação

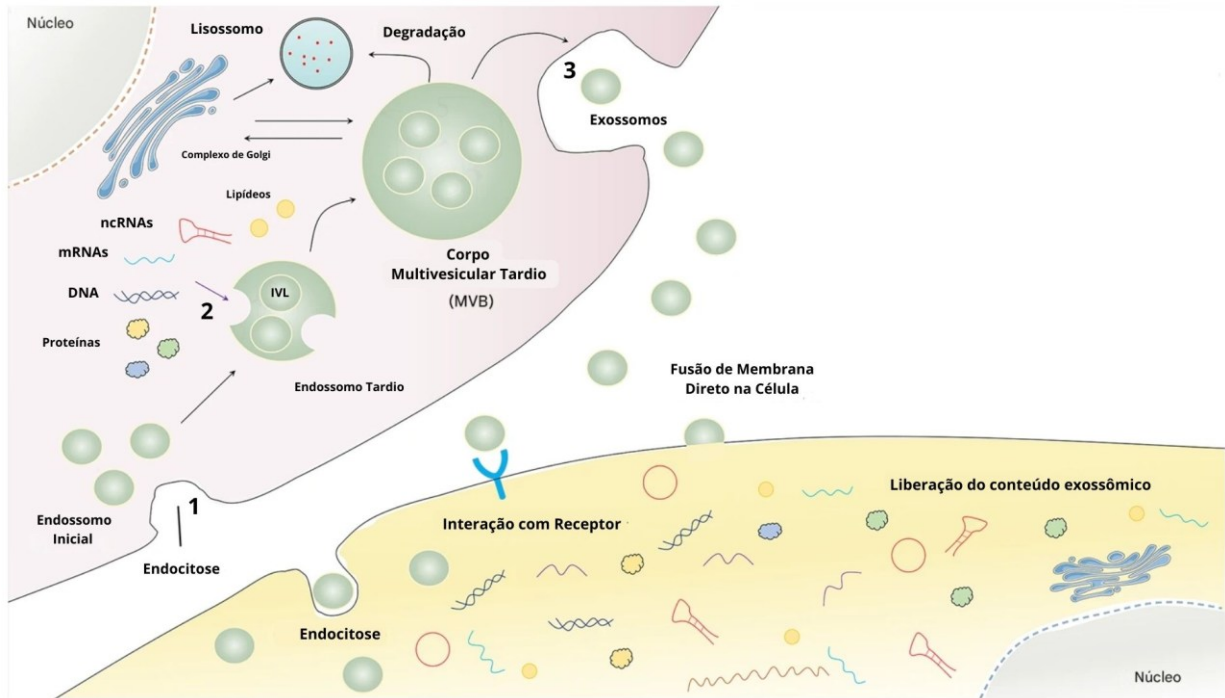
direta com a origem e comportamento do câncer. As proteínas executam diversas funções celulares que fornecem informações sobre a origem do tumor e os TAAs, produzidos pela presença de proteínas aberrantes, podem ativar o sistema imune, gerando anticorpos específicos (Ding *et al.*, 2022). Por fim, as EVs são estruturas membranosas, como exossomos e ectossomos, liberadas como forma de comunicação intercelular, contribuindo para o fenótipo maligno e modulando a proliferação tumoral (Ho *et al.*, 2024).

1.3 Exossomos

As EVs foram descritas pela primeira vez por Wolf há quase 60 anos, quando as observou no plasma sanguíneo (Hessvik; Llorente, 2017). São classificadas de acordo com seu tamanho e surgimento, de modo que ectossomos se originam de brotamento direto da membrana plasmática com diâmetro de 100 a 1000 nm; os corpos apoptóticos surgem com a separação das bolhas durante o processo de morte celular, com um tamanho de 50 a 5000 nm, e por fim, os exossomos, com origem endossômica e tamanho de 50 a 150 nm de diâmetro (Sherif; Yusuf, 2025).

O processo de formação dos exossomos, de forma simplificada, advém da fusão dos corpos multivesiculares (MVBs) à membrana plasmática. Para que isso ocorra é preciso uma primeira invaginação na membrana celular, gerando um endossoma inicial, que amadurece e se transforma em um endossoma tardio. Em seguida, a membrana endossômica sofre uma segunda invaginação, carregando o material do citoplasma e gerando vesículas intraluminais (ILVs) no lúmen, tornando o endossoma um MVBs. Para finalizar o processo, as ILVs são liberadas no meio extracelular pela fusão do MVB com a membrana plasmática, gerando os exossomos (Isaac *et al.*, 2021). Quando fora da célula, essa vesícula pode encontrar outras células e liberar seu conteúdo interno por três mecanismos: fusão direta na membrana celular, interação com receptores ou endocitose (Figura 4) (Tan *et al.*, 2021).

Figura 4 - Biogênese dos exossomos. 1. Invaginação da membrana plasmática que forma o endossoma inicial. 2. Invaginação da membrana do endossoma, formando as vesículas intraluminais. 3. Corpo multivesicular tardio se funde à membrana plasmática, liberando os exossomos.



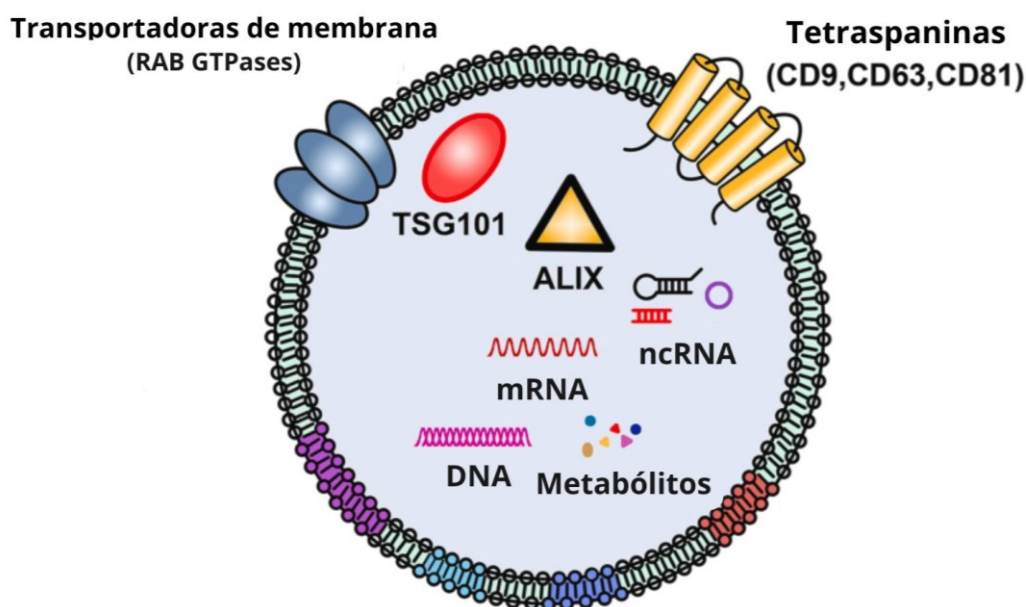
Fonte: Adaptado de Tan *et al.*, 2021.

Morfologicamente, os exossomos possuem uma bicamada lipídica que contém algumas proteínas distintas e outras canônicas (Sherif; Yusuf, 2025). Assim, sua heterogeneidade interna e externa reflete sua biogênese, bem como o estado fisiopatológico da sua célula de origem (Wen *et al.*, 2019). Dentre as proteínas presentes nos exossomos, destacam-se a proteína do gene 101 de suscetibilidade tumoral (TSG101), a ALIX, que é relacionada à produção de MVBs, as proteínas de transporte de membrana, como a RAB GTPases e, finalmente, as tetraspaninas (Liu *et al.*, 2021).

As tetraspaninas são uma família de proteínas transmembranares conservadas, formadas por quatro hélices que atravessam a membrana, interligadas por alças extra e intracelulares e acompanhadas por curtas caudas citoplasmáticas terminais. Estruturalmente, apresentam uma conformação tridimensional em forma de cone invertido, que cria uma bolsa hidrofóbica capaz de se associar a lipídios. Além disso, organiza a membrana em microdomínios funcionais, e assim podem interagir com integrinas e outras tetraspaninas. Esses microdomínios regulam processos celulares e patológicas, como a fusão de membranas, o reparo celular, a sinalização imunológica e a metástase tumoral (Dharan; Sorkin, 2024). Em especial, as tetraspaninas CD9, CD63 e CD81 são

abundantes em exossomos, o que possibilita o uso de anticorpos para isolar essas vesículas (Panwar *et al.*, 2023). Nessa perspectiva, a CD63 se destaca por atuar no transporte vesicular e na sinalização tumoral (Krylova; Feng, 2023), sendo bem caracterizada em exossomos de carcinomas mamários (Raghu *et al.*, 2018). Internamente, os exossomos são compostos por lipídeos, DNA genômico (gDNA) e, com maior destaque, RNAs, incluindo não codificantes (Mitsis *et al.*, 2020) (Figura 5)

Figura 5 - Moléculas presentes em exossomos. Tetraspaninas e proteínas de transporte encontram-se expressas na membrana e, internamente, são detectadas proteínas, material genético e metabólitos.



Fonte: Adaptado de Liu *et al.*, 2021

Funcionalmente, os exossomos transportam seu conteúdo e ativam diferentes vias celulares, o que estabelece uma comunicação celular. Participam diretamente da resposta imunológica, mediando o transporte de antígenos entre células dendríticas e contribuem ativamente para a disseminação de doenças (Mitsis *et al.*, 2020). De fato, a transferência horizontal é um processo relevante tanto em células saudáveis quanto em tumorais podendo, inclusive, promover a transformação de um fenótipo saudável para transformado (Mamalo *et al.*, 2023). Quando derivados de células malignas, o exossomos podem promover apoptose das células de defesa, enfraquecendo o sistema imunológico e permitindo que o tumor escape da vigilância imune (Chen *et al.*, 2024). Ademais, evidências indicam que essas vesículas estão envolvidas na aquisição

de resistência terapêutica por dois mecanismos principais: o primeiro torna células sensíveis em resistentes aos fármacos, enquanto o segundo ocorre pela remoção das drogas nas células tumorais, reduzindo a eficácia da quimioterapia (Zhu *et al.*, 2020). Portanto, os exossomos podem ser utilizados para diagnóstico, prognóstico e monitoramento de doenças (Li, S. *et al.*, 2020).

O termo “exossomos derivados de tumores” foi cunhado em 1981, e desde então, sua relação com a doença vem sendo amplamente estudada de modo que muitas tecnologias estão sendo desenvolvidas (Zhu *et al.*, 2020). Melo e colaboradores (2015), por exemplo, investigaram o uso da proteína de superfície Glypican-1 (GPC1) como biomarcador para câncer de pâncreas, devido à sua alta expressão em exossomos derivados dessas células. Em sua pesquisa, os autores ligaram os exossomos em beads e utilizaram citometria de fluxo para identificar e quantificar aqueles GPC1+ em soro de animais e de pacientes humanos. A estratégia apresentou alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar o câncer de pâncreas antes da formação de massa tumoral detectável. Além disso, os resultados mostraram que, após a cirurgia, os níveis de GPC1+ diminuem, reforçando seu potencial como biomarcador para monitoramento da resposta terapêutica.

Um dos principais desafios para sua aplicação na prática clínica é a eliminação de “ruídos” provenientes de vesículas liberadas por células saudáveis. Para contornar essa limitação, é necessário isolar os exossomos, o que vem sendo conduzido com a detecção de tetraspaninas (Yu *et al.*, 2021). Alves e equipe (2024) utilizaram um peptídeo selecionado por *Phage Display* biotinilado (C3-biotina) associados a anti-CD63 para a captura exitosa, por sensores, de exossomos associados a células de CM. O C3-biotina reconhece 38 proteínas de membrana, sendo destas 11 de origem mitocondrial. Foi previamente avaliado em sensores eletroquímicos, sendo capaz de capturar exossomos liberados por linhagens de CM. Portanto, o estudo e associação de biomarcadores se apresentam promissores, fazendo dos exossomos uma nova fronteira na medicina de precisão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Detectar uma subpopulação de vesículas extracelulares em soro de pacientes com câncer de mama e determinar sua correção com parâmetros clínicos.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar os parâmetros (diluição da estreptavidina, diluição de soro e concentração de bloqueio) dos ensaios de magneto-ELISA para a detecção de exossomos;
- Capturar uma subpopulação de vesículas extracelulares utilizando partículas magnéticas tosiladas sensibilizadas com anticorpo anti-CD63 e peptídeo Biotina-C3;
- Correlacionar os dados de absorbância com parâmetros clínicos de pacientes com CM;
- Determinar o potencial diagnóstico e/ou prognóstico da subpopulação de vesículas extracelulares para o CM.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Grupo de estudo

Esse trabalho foi desenvolvido em parceria com a equipe do Centro Obstétrico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, mediante aprovação do comitê de ética em Pesquisa, sob o número de parecer 064/08. O procedimento de coleta foi realizado dentro da rotina do setor cirúrgico, sem causar desconforto adicional às pacientes. Após a cirurgia e resultado histopatológico, os tumores e lesões encontrados foram classificados quanto ao tipo histológico,

estadiamento e status de receptores de estrogênio (ER) / progesterona (PR). Mulheres diagnosticadas com fibroadenoma, hiperplasia ductal atípica, papiloma ou outras doenças benignas da mama constituíram o grupo de “doença benigna da mama” (DBM). Os dados clínicos encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Característica das amostras sorológicas dos pacientes incluídos no estudo (n=101).

Variável	Paciente	
	N	%
Idade (anos)		
Mediana (intervalo)	56	(26-82)
DBM	47	46,53
CM	54	53,46
Estágio tumoral		
pT1	10	18,52
pT2	10	18,52
pT3	1	1,85
pTis	10	18,52
ND	23	42,59
Status de ER		
Positivo	30	55,56
Negativo	12	22,22
ND	12	22,22
Status de PR		
Positivo	22	40,74
Negativo	19	35,19
ND	13	24,07
Status de HER-2		
Positivo	16	29,63
Negativo	24	44,44
ND	14	25,93
Status de p53		
Positivo	14	25,93
Negativo	26	48,14
ND	14	25,93
Subtipos de CM		
Luminal A	21	38,89
Luminal B	7	12,96
HER-2-enriquecido	10	18,52
Triplo-negativo	3	5,56
ND	13	24,07
Grau Histológico		
Grau 1	4	7,41
Grau 2	26	48,15
Grau 3	9	16,66
ND	15	27,78

Abreviaturas: ND = não disponível; DBM, doença benigna da mama; CM, câncer de mama; ER, receptor de estrogênio; HER2, receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2; PR, receptor de progesterona. Fonte: Próprio autor.

3.2 Dot-blot

O peptídeo C3-biotina foi sintetizado com pureza >95% (Gen Script Biotech) com sequência Acetyl-SAMPPFYTAPGWGGGSAETVESCL-Lys-biotin. O ensaio de Dot Blot foi realizado com o objetivo de avaliar a reatividade do peptídeo biotilado à estreptavidina. Para isso 3,5µg de C3-biotina foram aplicados sobre uma membrana de nitrocelulose 0,22 µm (Hybond ECL, Amersham Biosciences) e deixados secar à temperatura ambiente para adsorção. Em seguida, a membrana foi bloqueada com uma solução de albumina sérica bovina (BSA - 3%) em tampão fosfato salino (PBS 1X) e incubada à temperatura ambiente durante 1 hora. Após esse período, a membrana foi lavada duas vezes com PBS 1X e imersa em uma solução contendo estreptavidina conjugada com peroxidase (código N200, ThermoFisher) testada em diferentes diluições partindo da concentração de 1 mg/mL: 500 ng/mL, 50 ng/mL e 10 ng/mL. Após incubação por mais 1 hora, a membrana foi lavada, novamente, duas vezes com PBS 1X e o ensaio foi revelado com o substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB – Sigma Aldrich) conforme as recomendações do fabricante.

3.3 Imobilização de anti-CD63

Em um microtubo foram adicionados 0,68 µg/mL do anticorpo anti-CD63 (código 10628D, Invitrogen - calculado/poço para o ensaio de ELISA) e 1×10^6 partículas de Dynabeads® M-450 tosiladas (código 14013, Invitrogen - calculado/poço para o ensaio de ELISA), diluídos em tampão borato (borato de sódio 0,1 M, pH 8,5). A mistura foi incubada por 16 horas (*overnight*), sob agitação, a 37 °C.

Após esse período, o sobrenadante foi removido com o auxílio de um separador magnético (Thermo Fisher) e as partículas Magnéticas (PM) foram lavadas com 200 µL de PBS 1X 10 mM. O sobrenadante foi descartado e as PMs modificadas foram ressuspensas em PBS 10 mM (1×10^6 partículas/poço para o ensaio de ELISA).

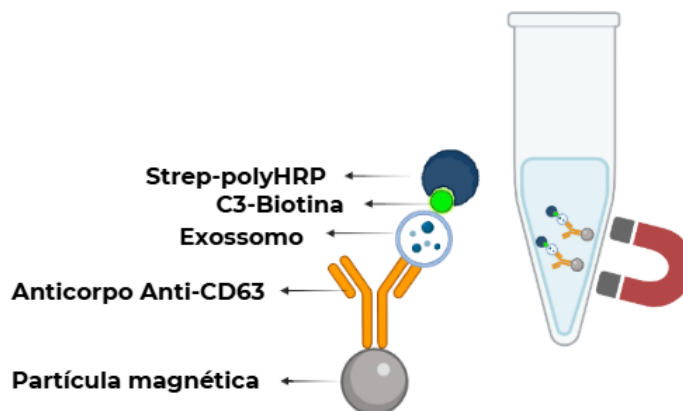
3.4 Magneto-ELISA

Primeiramente, foram conduzidos ensaios para otimização da diluição de soro, com um *pool* de pacientes com CM, e da concentração de BSA a serem utilizados no magneto-ELISA. Para isso, foram avaliadas as diluições 1:1, 1:10, 1:50 de soro e três concentrações de BSA: 0,5%, 1% e 2%.

Para o magneto-ELISA foram utilizadas placas de 96 poços de microtitulação (Kasvi). O soro do paciente foi diluído em PBS 10mM na proporção de 1:50 e, a cada poço da placa, foram adicionados 100µL dessa solução. Foram, então, acrescentadas PMs previamente funcionalizadas (1×10^6 partículas/poço) e a placa colocada sob agitação em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com 200 µL por poço de PBS-BSA 0,5%, quando, então, foi adicionado o peptídeo C3-biotina, na concentração de 2,0 µg/ poço, diluído em PBS-BSA 0,5% (100 µL/poço) e incubado por 1 hora a 37 °C.

Posteriormente, a placa foi lavada, novamente, três vezes com 200 µL por poço de PBS-BSA 0,5% e, então, adicionada a estreptavidina marcada com peroxidase (50 ng/mL), também diluída PBS-BSA 0,5% (100 µL/poço), com nova incubação por 1 hora a 37 °C. Após outras três lavagens com PBS-BSA, (200µL poço⁻¹), foi adicionado o substrato TMB (Pierce - 100 µL/poço), com incubação por 6 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de H₂SO₄ (2,0 M). Com o auxílio do separador magnético, o sobrenadante foi separado das PMs, sendo transferido para poços limpos e lidos no leitor de microplacas (Thermo Scientific) na absorbância de 450nm. O esquema do ensaio está demonstrado na figura 6.

Figura 6 – Esquema representativo do ensaio de Magneto-ELISA para detecção de exossomos. Partículas magnéticas funcionalizadas com anticorpo capturam uma subpopulação de exossomos, que são posteriormente reconhecidos pelo peptídeo C3-biotina, e então revelados com a estreptavidina conjugada à enzima repórter.



Fonte: Próprio autor.

3.5 Análises estatísticas

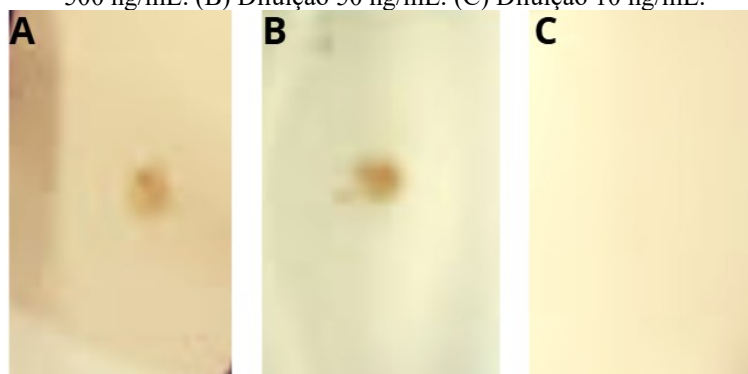
Os valores das absorbâncias foram comparados utilizando o teste t Mann Whitney por meio do software GraphPAD Prism 8 (<https://www.graphpad.com/>). Foram considerados como parâmetros o diagnóstico (CM x DBM) e aspectos relacionados ao prognóstico como TNM, grau e subtipo molecular. Para os valores significantes ($p < 0,05$) foi construída a curva ROC, calculada a AUC com IC 95%, com o objetivo de analisar a sensibilidade e especificidade do método.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização

Diante da complexidade do sistema adotado envolvendo partículas magnéticas tosiladas, anti-CD63 e peptídeo C3-biotina, foi avaliada, em um primeiro momento, por *dot blot*, a reatividade do peptídeo biotinilado à estreptavidina (Figura 7). Conforme observado, a diluição de 10 ng/mL apresentou sinal fracamente visualizados, o que conduziu à escolha para o magneto-ELISA da diluição de 50 ng/mL, visivelmente semelhante a 500 ng/mL.

Figura 7- Otimização da diluição da estreptavidina marcada com HRP reativa ao peptídeo C3-biotina. (A) Diluição 500 ng/mL. (B) Diluição 50 ng/mL. (C) Diluição 10 ng/mL.



Fonte: Próprio autor.

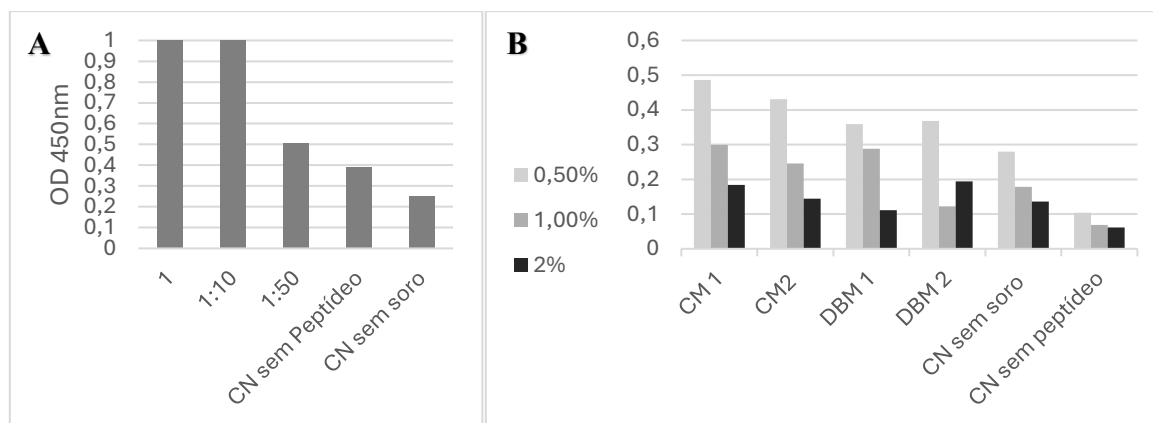
A técnica de *dot blot* é amplamente aplicada para a detecção de proteínas e o estudo de interações moleculares. O ensaio é composto de quatro etapas: a imobilização do analito na

membrana; bloqueio de sítios de ligação inespecíficos; adição da biomolécula marcadora e detecção do sinal. Assim é acessível, específico, fácil e rápido, fornecendo um ótimo custo-benefício (Surti *et al.*, 2022). Neste estudo, o presente ensaio auxiliou na validação da qualidade dos reagentes e na determinação da diluição ideal de estreptavidina.

A estreptavidina é uma proteína composta por quatro subunidades idênticas (Levenberg *et al.*, 2023) que possuem alta afinidade à biotina, conhecida como vitamina B7. Essa interação não covalente é estável, resistente a alterações de pH e temperatura (Murillo; Holgado; Laguna, 2023). A peroxidase de raiz-forte (HRP) é uma enzima repórter sensível que é comumente conjugada à estreptavidina. Na presença de substrato cromogênico, como o TMB, esse conjugado muda de cor, possibilitando seu uso em quantificação por absorbância (Savini *et al.*, 2023). Nesse sentido, a estreptavidina é uma proteína consolidada, tornando o seu uso comum em ensaios de imunodetecção que utilizam biotina como marcador. Sua conjugação com a HRP amplia as possibilidades de aplicação, tornando-a ideal para análise por absorbância, que, neste estudo, foi determinada por ensaio de magneto-ELISA, utilizando partículas tosiladas e amostras de soro de pacientes com CM e DBM.

Em um primeiro momento, a diluição do soro foi otimizada, assim como a concentração da solução de bloqueio (Figura 8), parâmetros importantes em ensaios imunoenzimáticos. Nas menores diluições (1:1; 1:10) a detecção ultrapassou a capacidade de registro do equipamento. Já a diluição de 1:50 permitiu uma análise comparativa e, portanto, escolhida para as análises posteriores (Figura 8A). Para a solução de bloqueio, o sinal diminuiu com o aumento da concentração de BSA. A concentração de 0,5% apresentou a maior absorbância e foi a escolhida para os ensaios subsequentes (Figura 8B).

Figura 8- Otimização da diluição de soro e concentração de bloqueio para o ensaio de magneto-ELISA. (A) Absorbância em 450 nm para diferentes diluições de soro de pacientes com câncer de mama (CM). (B) Absorbância em 450nm para diferentes concentrações de BSA. CN: controle negativo. CM 1/2: amostra de soro de paciente com câncer de mama. DBM 1/2: amostra de soro de paciente com doença benigna da mama.



Fonte: Próprio autor.

O soro é uma fração do sangue rica em biomoléculas e informações, tornando-se atraente para uso em diagnóstico e prognóstico devido à facilidade de coleta, simplicidade de processamento e possibilidade de repetição (Zhang *et al.*, 2013). Contudo, a detecção de biomarcadores específicos é desafiadora, especialmente exossomos (Bhawal *et al.*, 2020). Por essa razão, neste estudo, foram incluídas PMs, ancoradas com tetraspanina. O magneto-ELISA apresenta vantagens em relação às técnicas convencionais que utilizam apenas microplacas como suporte sólido. As PMs oferecem maior área de superfície ativa, favorecendo o aumento da sensibilidade do ensaio (Reymond *et al.*, 2013). Além disso, sua superfície pode ser engenheirada por meio de modificações químicas, permitindo a otimização das interações com partículas biológicas específicas (Comanescu, 2023). O uso do grupo tosil destaca-se por possibilitar reações de substituição com aminas ou tióis, favorecendo a ancoragem de biomoléculas (Shepherd *et al.*, 2025). Em nosso estudo foi ancorado o anticorpo anti-CD63, uma tetraspanina amplamente expressa em exossomos, direcionando a captura dessas EVs (Moura; Marti; Pividori, 2020).

Esse desenho experimental incluindo PMs tosiladas e anti-tetraspaninas vem sendo exitosamente utilizado na literatura no contexto de tumores. Moura e colaboradores (2020) avaliaram a eficiência da separação imunomagnética de exossomos de diferentes linhagens tumorais utilizando PMs tosiladas funcionalizadas com diferentes anti-tetraspaninas. Os autores demonstraram que a abordagem é viável e apresenta vantagens em relação a técnicas convencionais, como ultracentrifugação. Em estudo posterior, o mesmo grupo avaliou três

estratégias de imunodeteção baseada em anti-tetraspanina associadas a PMs em BL, demonstrando ser uma alternativa promissora, de baixo custo e de fácil implementação, com potencial para aplicações em diagnóstico e prognóstico tumoral (Moura *et al.*, 2020). Recentemente, Haizan e equipe (2025) utilizaram anticorpos anti-CD9 e anti-CD24 para realizar ensaios de magneto-ELISA sanduíche para a captura de exossomos provenientes de linhagens tumorais de MCF7 como biomarcadores específicos para diagnóstico.

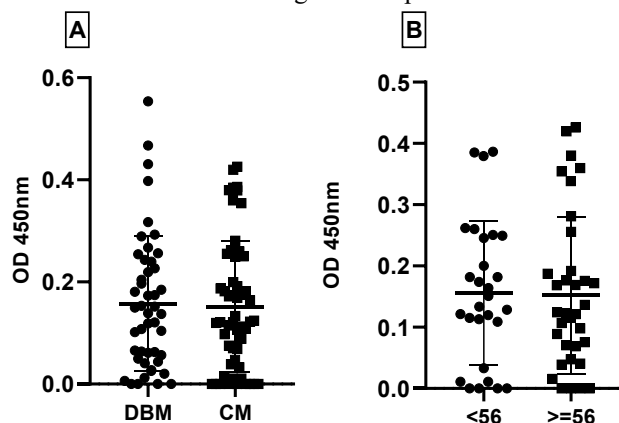
O diferencial de nosso estudo inclui a utilização de peptídeo selecionado por *phage display* como um elemento de reconhecimento específico para vesículas extracelulares derivados de CM, previamente selecionado por nosso grupo de pesquisa (Alves *et al.*, 2022). Além disso, nosso grupo também demonstrou que C3-biotina se liga a exossomos derivados de linhagens de células de CM (Alves *et al.*, 2024). No presente estudo, validamos sua utilização em amostra de soro de pacientes, correlacionando com dados clínicos relevantes.

4.2 Magneto-ELISA em soro de pacientes

O ensaio de magneto-ELISA, foi então conduzido com as 101 amostras e, em um primeiro momento, o potencial diagnóstico do sistema foi avaliado, comparando-se as absorbâncias das amostras de CM com as de DBM (Figura 9). Condições benignas de mama são morfologicamente semelhantes às malignas e a distinção entre ambas se torna importante para o manejo clínico adequado (Guirguis *et al.*, 2021). Atualmente, o método empregado para estratificação de lesões mamárias com mais precisão é a biópsia com agulha, sendo uma metodologia invasiva (Allajbeu *et al.*, 2025). A utilização de soro para diferenciar CM e DBM tornaria o processo mais ágil e simples, contudo, nosso sistema não foi capaz de discriminar os grupos (Figura 9A), uma vez que exossomos são liberados por tecidos saudáveis, gerando ruídos que interferem no resultado. A estatística aplicada à mediana das idades entre pacientes com CM também não apresentou diferença (Figura 9B). Esses dados levantam questões importantes relacionadas à necessidade de purificação dos exossomos para esse tipo de análise. Mukerjee e equipe (2025) compararam diferentes metodologias de acordo com a origem do fluido. O método mais tradicional e documentado na literatura é a ultracentrifugação, uma técnica que isola exossomos por tamanho, densidade e forma, entretanto, não apresenta pureza e pode danificar o analito. Já a abordagem de captura por imunoafinidade é apresentada como uma técnica de alta especificidade, resultando em subespécies

puras de exossomos. Contudo, o processo tende a ser custoso e depende da qualidade do analito presente na amostra. Em nosso estudo optamos por não purificar as vesículas extracelulares, visando uma aplicabilidade direta e acessível.

Figura 9- Absorbância (OD450 nm) registrada em magneto-ELISA conduzido em soro de pacientes. (A) Comparação dos valores de OD450 nm entre soro de pacientes com câncer de mama (CM) e doença benigna da mama (DBM). (B) comparação dos valores de OD450 nm categorizados pela mediana da idade dos pacientes com CM.

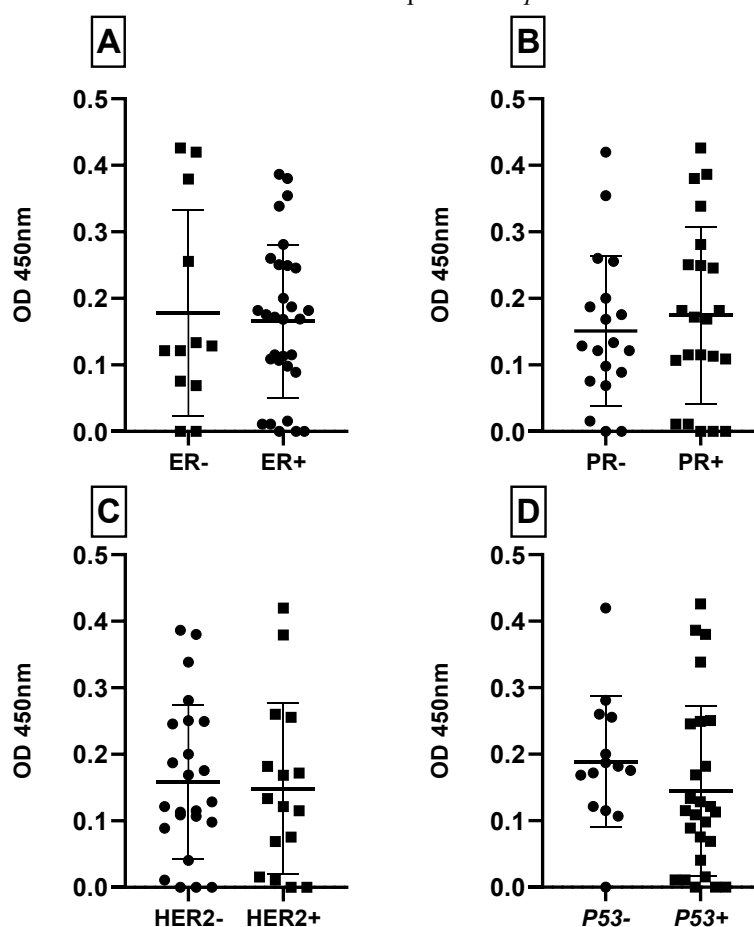


Fonte: Próprio autor.

A correlação da absorbância com a presença de diferentes marcadores clinicamente importantes para pacientes com CM também foi analisada (Figura 10). O ER é um receptor nuclear ativado pela ligação ao estrogênio, estando presente em aproximadamente 75% dos carcinomas mamários. Sua expressão é associada à proliferação tumoral, tornando-o um importante marcador para caracterização de neoplasias. Nesse sentido, tumores ER-positivos são elegíveis a tratamentos hormonais, garantindo um prognóstico mais favorável (Miziak *et al.*, 2023). O PR também consiste em um receptor nuclear e, quando ligado à progesterona, inicia a transcrição de genes alvos. De forma semelhante ao ER, a presença de PR está associada ao crescimento tumoral por via hormonal, causando impacto no prognóstico (Li, Z. *et al.*, 2022). Já o receptor HER2 é uma proteína transmembranar que não possui ligante específico, como os hormônios, mas é ativado por dimerização. Presente em aproximadamente 20 a 30% dos casos, é um marcador prognóstico e preditivo associado a formas mais agressivas de neoplasias, visto que sua ativação promove proliferação, sobrevivência e migração tumoral (Cheng, 2024). Por fim, a proteína p53 é um fator de transcrição regulatório fundamental na supressão tumoral, atuando por meio do controle do ciclo celular, reparo do DNA e indução de apoptose. Mutações no gene *TP53* estão presentes em

aproximadamente 30% dos casos de CM, causando perda de sua função biológica. Assim, tumores com perda funcional de expressão (p53-) são associados a comportamentos mais agressivos e piores prognósticos (Marvalim; Datta; Lee, 2023). Em conjunto, a avaliação dos marcadores tumorais fornece informações relevantes para classificação do câncer, bem como para definir prognóstico e tratamento responsivo. Contudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa, sugerindo que o peptídeo C3-biotina não captura vesículas extracelulares relacionados ao padrão de marcação desses alvos.

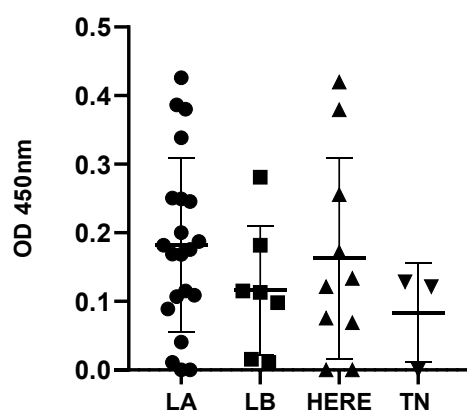
Figura 10- Absorbância (OD450 nm) registrada em magneto-ELISA conduzido em soro de pacientes com câncer de mama. (A) Comparação dos valores de OD450 nm entre soro de pacientes com câncer de mama conforme a expressão de receptor de estrógeno (ER). (B) Comparação dos valores de OD450 nm entre soro de pacientes com câncer de mama conforme a expressão de receptor de progesterona (PR). (C) Comparação dos valores de OD450 nm entre soro de pacientes com câncer de mama conforme a expressão do receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). (D) Comparação dos valores de OD450 nm entre soro de pacientes com câncer de mama conforme a expressão de *p53*.



Fonte: Próprio autor.

Os pacientes com CM foram, então, agrupados conforme os subtipos moleculares (Figura 11) e não foi observada diferenças estatisticamente significantes. A classificação molecular foi introduzida nos anos 2000 com base nos padrões de expressão gênica, permitindo estratificar carcinomas em subgrupos. Fornece informações mais precisas sobre o comportamento tumoral, prognóstico e resposta à terapia, tornando a abordagem terapêutica escolhida pelo corpo clínico mais eficiente (Carvalho *et al.*, 2025). Apesar do conhecimento sobre o aumento de expressão de exossomos em células tumorais, os mecanismos sobre sua biogênese e as razões para os níveis serem elevados em células malignas ainda não são totalmente elucidados (Wang *et al.*, 2023). Dessa forma, é possível que a presença ou ausência de receptores hormonais, bem como a classificação molecular neles baseada não liberem a subpopulação capturada pelo peptídeo C3-biotina.

Figura 11 - Absorbância (OD450 nm) registrada em magneto-ELISA conduzido em soro de pacientes com câncer de mama estratificados por subtipo molecular. LA: Luminal A; LB: Luminal B; HERE: fator de crescimento epidérmico humano 2 enriquecido e TN: triplo-negativo.



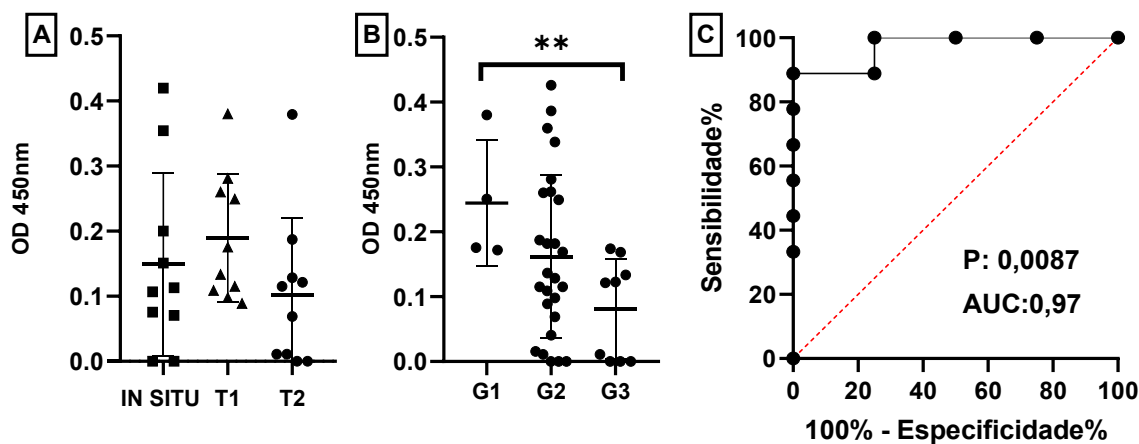
Fonte: Próprio autor.

Por fim, foram considerados parâmetros histológicos como T (tamanho do tumor) e grau de Nottingham (Figura 12). Para o primeiro, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Figura 12A). O sistema de estadiamento utilizado pelo Comitê Conjunto Americano de Câncer (AJCC) baseia-se em aspectos histológicos e visualizados em microscópio (Wu *et al.*, 2020). Liu e colaboradores (2021) propõem que o tamanho tumoral não apresenta correlação estrita com a agressividade da doença. Os autores ressaltam que, em tumores sem comprometimento linfonodal, a relação entre tamanho e agressividade é limitada, enquanto tumores pequenos,

associados a envolvimento linfonodal podem apresentar comportamento altamente agressivo, gerando controvérsias. Portanto, usar apenas o tamanho como parâmetro limita conclusões em relação ao comportamento da lesão.

O sistema de classificação tumoral baseada em grau de Nottingham leva em consideração a formação do túbulo, o pleomorfismo nuclear e a contagem mitótica, assim, descreve o quão diferente a célula cancerígena está da célula saudável (Van Dooijeweert; Van Diest; Ellis, 2021). Nosso magneto-ELISA foi capaz de discriminar pacientes G1 de G3 ($p = 0,0056$) (Figura 12B), com significativo potencial discriminatório avaliado pela curva ROC (Figura 12C).

Figura 12- Absorbância (OD450 nm) registrada em magneto-ELISA conduzido em soro de pacientes com câncer de mama. (A) Comparação dos valores de OD450 nm entre tumores com diferentes extensões. (B) Comparação dos valores de OD450 nm entre tumores com graus de Nottingham diferentes. (C) Gráfico de curva ROC para análise de especificidade e sensibilidade de discriminação conforme grau histológico. * $p = 0,0056$. AUC: área sob a curva.



Fonte: Próprio autor.

A presença de significância para distinção de grau 1 para 3 mostrou-se promissora, tornando possível prever a diferenciação celular de forma rápida e objetiva. Entretanto, não foi verificada diferença em relação ao grau 2. Nessa perspectiva, Kim e equipe (2025) discutem a dificuldade de distinção do grau 2 devido à subjetividade da avaliação histopatológica. Segundo os autores, há sobreposição de características de modo que o grau intermediário apresenta menor capacidade discriminativa. Ademais, esses achados evidenciam a diferença no padrão de vesículas liberadas no início e em graus avançados da doença.

Por fim, foi construída a curva ROC, aplicada com o objetivo de encontrar um ponto de corte que maximize o número de verdadeiros positivos e minimize a ocorrência de falsos positivos. Nesse sentido, um teste ideal possui máxima ascensão no eixo das ordenadas, seguido de deslocamento mínimo ao longo do eixo das abscissas, obtendo maior área sob a curva (Area Under the Curve - AUC) (Chang; Newman, 2024). Assim, o valor AUC indica a capacidade do teste de distinguir entre condições patológicas. Seus valores variam de 1 a 0,5, sendo que, quanto mais próximo de 1, melhor será a capacidade discriminativa do teste, enquanto valores próximos a 0,5 demonstram desempenho semelhante ao acaso (Çorbacioğlu; Aksel, 2023). Embora os resultados promissores (AUC=0,97) indiquem excelente capacidade discriminativa, o número amostral reduzido (n=13) é um limitante do estudo. Feng e outros (2015) discutem essa problemática, ressaltando que, em estudos pré-clínicos, número reduzido de amostras são frequentes e podem levar à superestimação da AUC. Assim, embora o peptídeo apresente potencial preditivo para a estratificação de carcinomas mamários em diferentes graus, estudos com maior número amostral são necessários para garantir maior robustez estatística.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a capacidade de associação entre vesículas CD63+ e características clínicas e epidemiológicas de pacientes com CM através do ensaio de Magneto ELISA para fins de diagnóstico e prognóstico, por meio do peptídeo C3-biotina associado a PMs tosiladas ancoradas com o anticorpo anti-CD63. Ensaio de Magneto-ELISA demonstraram que o sistema não foi capaz de diferenciar amostras de CM daquelas com DBM, assim como não foi observada associação com o *status* de receptores, subtipos moleculares e tamanho do tumor. Contudo, o peptídeo demonstrou potencial de diferenciar carcinomas mamários de Grau de Nottingham 1 e Grau 3, sugerindo a existência de subpopulações distintas de exossomos em tumores avançados. Análises em um número mais expressivo de participantes e em diferentes tumores são necessárias, abrindo perspectivas no manejo clínico otimizado de pacientes oncológicos. A utilização da BL e a detecção de EVs está na vanguarda da medicina translacional, o que faz com que nosso estudo esteja em consonância com os Objetivos de Desenvolvimento

Sustentável (ODS) da ONU, em especial ODS03, ODS09 e ODS10, promovendo saúde e bem-estar, inovação e infraestrutura e redução das desigualdades.

REFERÊNCIAS

- AKRAM, M. *et al.* Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 33, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>.
- ALLAJBEU, I. *et al.* Improving the diagnostic performance of contrast-enhanced mammography through lesion conspicuity and enhancement quantification. **European Radiology**, 3 abr. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00330-025-11501-8>. Acesso em: 29 jan. 2026.
- AL-THOUBAITY, F. K. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 49, p. 44-48, jan. 2020. DOI: 10.1016/j.amsu.2019.11.021 Disponível em: [Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study - PubMed](#)
- ALVES, R. F. *et al.* A novel peptide-based electrochemical biosensor for breast cancer characterization over a poly 3-(3-aminophenyl) propionic acid matrix. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 205, p. 114081, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114081>. Acesso em: 23 jan. 2026.
- ALVES, R. F. *et al.* Recombinant peptide-based biosensing approaches for targeting breast cancer-derived exosomes. **Biosensors and Bioelectronics**, mar. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116211>. Acesso em: 23 nov. 2025.
- AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 325-330, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2005v51n4.1927>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Hormone Receptor Status. American Cancer Society, 2021. Disponível em: < [Breast Cancer Hormone Receptor Status | Estrogen Receptor | American Cancer Society](#) Acesso em: 29 jun. 2025.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Stages. American Cancer Society, 2021. Disponível em: < [Stages of Breast Cancer | Understand Breast Cancer Staging | American Cancer Society](#) Acesso em: 07 jul. 2025.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Types of Breast Cancer. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer.html>. Acesso em: 3 mar. 2026.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. What is breast cancer? American Cancer Society, 2016. Disponível em: <[What Is Breast Cancer? | American Cancer Society](#) Acesso em: 21 jun. 2024.
- BATOOL, S. M. *et al.* The Liquid Biopsy Consortium: Challenges and opportunities for early cancer detection and monitoring. **Cell Reports Medicine**, v. 4, n. 10, p. 101198, set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101198>.

BERTUCCI, F. *et al.* Mutational landscape of inflammatory breast cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 22, n. 1, 18 abr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05198-4>. Acesso em: 23 set. 2025.

BHATT, A. A.; WHALEY, D. H.; LEE, Christine U. Ultrasound-Guided Breast Biopsies. **Journal of Ultrasound in Medicine**, 30 set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jum.15517>. Acesso em: 1 out. 2025.

BHAWAL, R. *et al.* Challenges and Opportunities in Clinical Applications of Blood-Based Proteomics in Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 2428, 27 ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers12092428>. Acesso em: 27 jan. 2026.

BIRNBAUM, D. *et al.* Basal and luminal breast cancers: Basic or luminous? (Review). **International Journal of Oncology**, v. 25, n. 2, p. 249-258, ago. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.25.2.249>.

BOARETTO, N. *et al.* Câncer: uma revisão integrativa por estudantes de medicina. **Boletim do Curso de Medicina da UFSC**, v. 9, n. 2, out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.32963/bcmufsc.v9i2.6402>.

BREWER, H. R. *et al.* Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 165, n. 1, p. 193-200, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4325-2>.

CÂNCER. World Health Organization, 2 fev. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 21 jun. 2024.

CÂNCER de mama: prevenção, detecção precoce e redução de riscos evitáveis estão entre as estratégias para diminuir mortalidade. Conselho Nacional de Saúde, 23 out. 2023. Disponível em: <https://conselho.saude.gov.br/ultimas-noticias-cns/3193-cancer-de-mama-prevencao-deteccao-precoce-e-reducao-de-riscos-evitaveis-estao-entre-as-estrategias-para-diminuir-mortalidade>. Acesso em: 23 jun. 2024.

CARGA global de câncer aumenta em meio à crescente necessidade de serviços. **Organização Pan-Americana da Saúde**, 1 fev. 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/1-2-2024-carga-global-cancer-aumenta-em-meio-crescente-necessidade-servicos>. Acesso em: 21 jun. 2024.

CARVALHO, E. *et al.* Molecular Subtypes and Mechanisms of Breast Cancer: Precision Medicine Approaches for Targeted Therapies. **Cancers**, v. 17, n. 7, p. 1102, 25 mar. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers17071102>. Acesso em: 9 jan. 2026.

CASAGRANDE, G. M. S. *et al.* Liquid Biopsy for Lung Cancer: Up-to-Date and Perspectives for Screening Programs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2505, 28 jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24032505>. Acesso em: 2 out. 2025.

CHANG, P. W.; NEWMAN, T. B. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curves: The Basics and Beyond. **Hospital Pediatrics**, 27 jun. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1542/hpeds.2023-007462>. Acesso em: 14 jan. 2026.

CHEN, Y. *et al.* Exosomes: a review of biologic function, diagnostic and targeted therapy applications, and clinical trials. **Journal of Biomedical Science**, v. 31, n. 1, 11 jul. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01055-0>. Acesso em: 8 out. 2025.

CHENG, X. A Comprehensive Review of HER2 in Cancer Biology and Therapeutics. **Genes**, v. 15, n. 7, p. 903, 11 jul. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes15070903>. Acesso em: 8 jan. 2026.

COELHO, A. S. *et al.* Hereditary predisposition to breast cancer and its relation to the BRCA1 and BRCA2 genes: literature review. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201800615>.

COMANESCU, C. Recent Advances in Surface Functionalization of Magnetic Nanoparticles. **Coatings**, v. 13, n. 10, p. 1772, 15 out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/coatings13101772>. Acesso em: 6 jan. 2026.

ÇORBACIOĞLU, Ş.; AKSEL, G. Receiver operating characteristic curve analysis in diagnostic accuracy studies: A guide to interpreting the area under the curve value. **Turkish Journal of Emergency Medicine**, v. 23, n. 4, p. 195, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.4103/tjem.tjem_182_23. Acesso em: 14 jan. 2026.

DHARAN, R.; SORKIN, R. Tetraspanin proteins in membrane remodeling processes. **Journal of Cell Science**, v. 137, n. 14, 15 jul. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jcs.261532>. Acesso em: 6 out. 2025.

DING, Z. *et al.* Proteomics technologies for cancer liquid biopsies. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, 15 fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01526-8>. Acesso em: 5 out. 2025.

EDGE, S. B.; HORTOBAGYI, G. N.; GIULIANO, Armando E. New and important changes in breast cancer TNM: incorporation of biologic factors into staging. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 19, n. 4, p. 309-318, 26 fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1582335>. Acesso em: 25 set. 2025.

FENG, D.; CORTESE, G.; BAUMGARTNER, R. A comparison of confidence/credible interval methods for the area under the ROC curve for continuous diagnostic tests with small sample size. **Statistical Methods in Medical Research**, v. 26, n. 6, p. 2603-2621, 30 ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0962280215602040>. Acesso em: 14 jan. 2026.

FILGO, A. J. *et al.* Mammary Gland Evaluation in Juvenile Toxicity Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 44, n. 7, p. 1034-1058, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0192623316663864>.

FOWLER, Amy M.; STRIGEL, Roberta M. Clinical advances in PET–MRI for breast cancer. **The Lancet Oncology**, v. 23, n. 1, p. e32-e43, jan. 2022. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(21\)00577-5](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(21)00577-5). Acesso em: 12 fev. 2026.

FREITAS, A. J. A. *et al.* Liquid Biopsy as a Tool for the Diagnosis, Treatment, and Monitoring of Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9952, 1 set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23179952>. Acesso em: 2 out. 2025.

GAO, J. J.; SWAIN, S. M. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. **The Oncologist**, v. 23, n. 5, p. 556-565, 22 fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0535>. Acesso em: 25 set. 2025.

GUIMARÃES, G. M.; COSTA, D. H.; SILVA, T. S. A importância da cintilografia óssea na descoberta de metástase em câncer de mama. **E-Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. e1842471, 17 jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.52076/eacad-v4i2.471>. Acesso em: 12 jul. 2025.

GUIRGUIS, M. S. *et al.* Mimickers of breast malignancy: imaging findings, pathologic concordance and clinical management. **Insights into Imaging**, v. 12, n. 1, 20 abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13244-021-00991-x>. Acesso em: 29 jan. 2026.

HAIZAN, I. *et al.* Dual-target magneto-immunoassay with bifunctional nanohybrids for breast cancer exosome detection. **Talanta**, v. 286, p. 127532, maio 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.127532>. Acesso em: 23 jan. 2026.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, jan. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).

HARBECK, N. *et al.* Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 66, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.

HESSVIK, N. P.; LLORENTE, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 193-208, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>.

HIJRAH, H. *et al.* Influence of variables on breast self-examination: Potential barrier or enhancement of breast cancer prevention. **Breast Disease**, v. 43, n. 1, p. 145-155, 27 maio 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/bd-249001>. Acesso em: 27 set. 2025.

HO, H.-Y. *et al.* Liquid Biopsy in the Clinical Management of Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 16, p. 8594, ago. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25168594>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//abc-do-cancer-2020.pdf>. Acesso em: 4 ago. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/a_situacao_ca_mama_brasil_2019.pdf. Acesso em: 22 jun. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Como surge o câncer. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>. Acesso em: 4 ago. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Detecção precoce. 15 out. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/acoes/deteccao-precoce>. Acesso em: 26 set. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estadiamento. 14 jul. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer/estadiamento#:~:text=O%20estadiamento%20patológico%20baseia-se,aplicável%20a%20todos%20os%20tumores>. Acesso em: 25 set. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2026: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2026. Disponível em: https://ninho.inca.gov.br/jspui/bitstream/123456789/17914/1/Estima2026_completo%20%281%29.pdf. Acesso em: 03 mar. 2026

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). O que é câncer? 14 jul. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 28 abr. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Outubro Rosa 2023. Instituto Nacional de Câncer, 27 set. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/campanhas/2023/outubro-rosa>. Acesso em: 23 jun. 2024

ISAAC, R. *et al.* Exosomes as mediators of intercellular crosstalk in metabolism. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 9, p. 1744-1762, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.08.006>. Acesso em: 5 out. 2025.

KAPOOR, M.; HESTON, T. F.; KASI, A. **Escaneamento PET**. In: StatPearls [Internet]. Ilha do Tesouro (FL): StatPearls Publishing; 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559089/>. Acesso em: 28 set. 2025.

KIM, J. S. *et al.* Predicting Nottingham grade in breast cancer digital pathology using a foundation model. **Breast Cancer Research**, v. 27, n. 1, 19 abr. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13058-025-02019-4>. Acesso em: 10 jan. 2026.

KRATKIEWICZ, K. *et al.* Ultrasound and Photoacoustic Imaging of Breast Cancer: Clinical Systems, Challenges, and Future Outlook. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1165, 22 fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm11051165>. Acesso em: 28 set. 2025.

KRYLOVA, S. V.; FENG, D. The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1337, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24021337>.

KURKOWIAK, M. *et al.* The effects of RNA editing in cancer tissue at different stages in carcinogenesis. **RNA Biology**, p. 1-16, 17 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1877024>. Acesso em: 22 set. 2025.

LEVENBERG, D. R. *et al.* A streptavidin–biotin system combined with magnetic actuators for remote neuronal guidance. **Journal of Biological Engineering**, v. 17, n. 1, 20 jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13036-023-00359-3>. Acesso em: 6 jan. 2026.

LI, J. *et al.* A qualitative transcriptional signature to reclassify histological grade of ER-positive breast cancer patients. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, 6 abr. 2020. DOI:[10.1186/s12864-020-6659-0](https://doi.org/10.1186/s12864-020-6659-0). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6659-0>. Acesso em: 22 jun. 2025.

LI, S. *et al.* The role of exosomes in liquid biopsy for cancer diagnosis and prognosis prediction. **International Journal of Cancer**, 24 nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.33386>. Acesso em: 21 jul. 2025.

LI, L. T. *et al.* Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 3, p. 1566-1572, 10 nov. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>. Acesso em: 1 jul. 2025.

LI, P. *et al.* Liquid biopsies based on DNA methylation as biomarkers for the detection and prognosis of lung cancer. **Clinical Epigenetics**, v. 14, n. 1, 24 set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01337-0>. Acesso em: 9 nov. 2025.

LI, Z. *et al.* The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Drug Design, Development and Therapy**, Volume 16, p. 305-314, jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/dddt.s336643>. Acesso em: 8 jan. 2026.

LIU, J. *et al.* The biology, function, and applications of exosomes in cancer. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.01.001>. Acesso em: 6 out. 2025.

LIU, Y. *et al.* Tumor Size Still Impacts Prognosis in Breast Cancer With Extensive Nodal Involvement. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 9 abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.585613>. Acesso em: 12 jan. 2026.

LONE, S. N. *et al.* Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, 18 mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01543-7>. Acesso em: 2 out. 2025.

LU, X. R. *et al.* Diagnostic role of 18F-FDG PET/MRI in the TNM staging of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Palliative Medicine**, v. 10, n. 4, p. 4328-4337, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21037/apm-20-2555>. Acesso em: 7 jul. 2025.

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary gland development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 4, p. 533-557, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wdev.35>.

MAMALO, A. S. *et al.* Potential roles of the exosome/microRNA axis in breast cancer. **Pathology - Research and Practice**, p. 154845, out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154845>. Acesso em: 9 jan. 2026.

MELO, S. A. *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. **Nature**, v. 523, n. 7559, p. 177-182, 24 jun. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature14581>. Acesso em: 14 nov. 2025.

MARVALIM, Charlie; DATTA, Arpita; LEE, Soo Chin. Role of p53 in breast cancer progression: An insight into p53 targeted therapy. **Theranostics**, v. 13, n. 4, p. 1421-1442, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/thno.81847>. Acesso em: 9 jan. 2026.

MANOUCHEHRI, E. *et al.* Understanding breast cancer risk factors: is there any mismatch between laywomen perceptions and expert opinions. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 309, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09372-z>.

Ministério da Saúde. Câncer de mama. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer-de-mama>. Acesso em: 03 mar. 2026.

Ministério da Saúde. Ministério da Saúde garante acesso a mamografia a partir dos 40 anos. 25 set. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2025/setembro/ministerio-da-saude-garante-acesso-a-mamografia-a-partir-dos-40-anos>. Acesso em: 27 set. 2025.

MITISIS, T. *et al.* Exosomics. **EMBnet.journal**, v. 26, 4 ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.14806/ej.26.0.934>. Acesso em: 6 out. 2025.

MIZIAK, P. *et al.* Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. **Cancers**, v. 15, n. 19, p. 4689, 23 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers15194689>. Acesso em: 8 jan. 2026.

MOURA, L. S; MARTÌ, M; PIVIDORI, M. I. Matrix Effect in the Isolation of Breast Cancer-Derived Nanovesicles by Immunomagnetic Separation and Electrochemical Immunosensing—A Comparative Study. **Sensors**, v. 20, n. 4, p. 965, 11 fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s20040965>. Acesso em: 25 jan. 2026.

MOURA, S. L. *et al.* Multiplex detection and characterization of breast cancer exosomes by magneto-actuated immunoassay. **Talanta**, v. 211, p. 120657, maio 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120657>. Acesso em: 26 jan. 2026.

MUKERJEE, N. *et al.* Exosome isolation and characterization for advanced diagnostic and therapeutic applications. **Materials Today Bio**, p. 101613, fev. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101613>. Acesso em: 30 jan. 2026.

MURILLO, A. M. M.; HOLGADO, M.; LAGUNA, M. Reports on the sensitivity enhancement in interferometric based biosensors by biotin-streptavidin system. **Heliyon**, v. 9, n. 12, p. e23123, dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23123>. Acesso em: 7 jan. 2026.

NASCIMENTO, F. B.; PITTA, M. G. da R.; RÊGO, M. J. B. M.. Análise dos principais métodos de diagnóstico de câncer de mama como propulsores no processo inovativo. **Arquivos de Medicina**, v. 29, n. 6, p. 153-159, 2015. Disponível em: <https://scielo.pt/pdf/am/v29n6/v29n6a03.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2025.

NASCIMENTO, R. G.; OTONI, K. M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, v. 30, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.29289/2594539420202000024>. Acesso em: 23 set. 2025.

NISHAT, L. *et al.* The Expression of Ki-67 and E-cadherin in Triple Negative Breast Cancer: A Hospital Based Study. **Asian Pacific Journal of Cancer Biology**, v. 9, n. 2, p. 155-161, 14 maio 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.31557/apjcb.2024.9.2.155-161>. Acesso em: 25 set. 2025.

OBEAGU, E. I.; OBEAGU, G. U.. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. **Medicine**, v. 103, n. 3, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10798762/>. DOI:10.1097/MD.00000000000036905

ORRANTIA-BORUNDA, E. *et al.* Subtypes of Breast Cancer. In: StatPearls. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583808/>.

OUVRARD, E. *et al.* Nuclear medicine imaging for bone metastases assessment: what else besides bone scintigraphy in the era of personalized medicine? **Frontiers in Medicine**, v. 10, 15 jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1320574>. Acesso em: 29 set. 2025.

PANWAR, D. *et al.* Efficient strategy to isolate exosomes using anti-CD63 antibodies conjugated to gold nanoparticles. **AMB Express**, v. 13, n. 1, 28 ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-023-01592-1>. Acesso em: 12 nov. 2025.

PROBERT, J. *et al.* Histological types of invasive breast cancer in 830,000 women diagnosed in England during 1988–2016. **The Journal of Pathology: Clinical Research**, v. 11, n. 5, set. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/2056-4538.70043>. Acesso em: 23 set. 2025.

RAGHU, D. *et al.* Nanoplasmonic pillars engineered for single exosome detection. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0202773, 24 ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202773>. Acesso em: 14 nov. 2025.

REN, F. *et al.* Liquid biopsy techniques and lung cancer: diagnosis, monitoring and evaluation. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 43, n. 1, 1 abr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13046-024-03026-7>. Acesso em: 5 out. 2025.

REYMOND, F. *et al.* Fabrication and characterization of tosyl-activated magnetic and nonmagnetic monodisperse microspheres for use in microfluidic-based ferritin immunoassay. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 2, p. 532-542, mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.1683>. Acesso em: 6 jan. 2026.

ROLIM, L. M. O.; MARTINS, A. L. Aleitamento materno. **Revista de Pediatria SOPERJ**, v. 3, n. 1, 2002. Disponível em: http://revistadepediatricasoperj.org.br/detalhe_artigo.asp?id=125.

RUBIO, M.; EL-ASHRY, D. **Ductal Carcinoma In Situ (DCIS) | BCRF**. Disponível em: https://www.bcrf.org/about-breast-cancer/dcis-ductal-carcinoma-in-situ/?utm_source. Acesso em: 23 set. 2025.

SANTANA, N. P. P.; BORGES, A. R. Exames de imagem no rastreamento e diagnóstico do câncer de mama: ressonância magnética das mamas em face da mamografia. **Psicologia e Saúde em debate**, v. 1, n. 1, p. 19–38, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.22289/2446-922X.V1N1A3>.

SAVINI, F. *et al.* A Simple Biosensor Based on Streptavidin-HRP for the Detection of Bacteria Exploiting HRP's Molecular Surface Properties. **Applied Biosciences**, v. 2, n. 3, p. 513-526, 19 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/applbiosci2030032>. Acesso em: 7 jan. 2026.

SAWAKI, M.; SHIEN, T.; IWATA, H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 49, n. 3, p. 228-231, 12 dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jjco/hyy182>. Acesso em: 25 set. 2025.

SHEPHERD, S. *et al.* Oligonucleotide surface attachment by tosylation for digital detection of microRNA using photonic resonator absorption microscopy. **APL Bioengineering**, v. 9, n. 4, 28 out. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/5.0290900>. Acesso em: 6 jan. 2026.

SHERIF A. I.; YUSUF S. K. **Histologia de Vesículas Extracelulares**. In: StatPearls [Internet]. Ilha do Tesouro (FL): StatPearls Publishing; 2025. Disponível em: [Histologia, Vesículas Extracelulares - StatPearls - Estante NCBI](#). Acesso em: 05 out. 2025.

SHIN, E.; SEUNG KOO, J. Prognostic factors of breast phyllodes tumors. **Histology and Histopathology**, n. 38, p. 865-878, 2023. Disponível em: https://www.hh.um.es/pdf/Vol_38/38_8/Shin-38-865-878-2023.pdf. Acesso em: 23 set. 2025.

SHIM, V. C. *et al.* Evaluation of the international Ki67 working group cut point recommendations for early breast cancer: comparison with 21-gene assay results in a large integrated health care system. **Breast Cancer Research and Treatment**, 17 out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-023-07118-4>. Acesso em: 25 set. 2025.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA (SBOC). Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. SBOC, 2021.

Disponível:

<https://ninho.inca.gov.br/jspui/bitstream/123456789/11145/1/Diretriz%20SBOC%202021.pdf>

SOUZA, P. V. N. *et al.* Biópsia por agulha grossa (core biopsy) em lesões mamárias. **REVISTA CIENTÍFICA CEREM-GO**, v. 3, n. 07, 1 jun. 2022. Disponível

em: <https://doi.org/10.37951/2675-5009.2022v3i07.87>. Acesso em: 29 set. 2025.

SURTI, P. V. *et al.* Progress on dot-blot assay as a promising analytical tool: Detection from molecules to cells. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 157, p. 116736, dez. 2022.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116736>. Acesso em: 6 jan. 2026.

TADESSE, G. F.; TEGAW, E. M.; ABDISA, E. K. Diagnostic performance of mammography and ultrasound in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Ultrasound**, 25 jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40477-022-00755-3>. Acesso em: 28 set. 2025.

TAN, Y. *et al.* Tumor-derived exosomal components: the multifaceted roles and mechanisms in breast cancer metastasis. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 6, 26 maio 2021. Disponível

em: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03825-2>. Acesso em: 13 nov. 2025.

TEICHGRAEBER, D. C. *et al.* Breast Cancer Staging: Updates in the AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition, and Current Challenges for Radiologists, From the AJR Special Series on Cancer Staging. **AJR Am J Roentgenol**, 217, n. 2, p. 278-290, Aug 2021.

<https://doi.org/10.2214/AJR.20.25223>

TEOFILO, R. N. F. *et al.* Importância Da Mamografia Como Mecanismo Rastreador Precoce Do Câncer De Mama Em Pacientes Com Histórico Familiar: Uma Revisão. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 9, p. 3084-3093, 17 set. 2024. Disponível

em: <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2024v6n9p3084-3093>. Acesso em: 27 set. 2025.

THAKUR, M. L. Genomic Biomarkers for Molecular Imaging: Predicting the Future. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 39, n. 4, p. 236-246, jul. 2009. Disponível

em: <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2009.03.006>. Acesso em: 1 jul. 2025.

VAN DOOIJEWERT, C.; VAN DIEST, P. J.; ELLIS, I. O. Grading of invasive breast carcinoma: the way forward. **Virchows Archiv**, 1 jul. 2021. Disponível

em: <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03141-2>. Acesso em: 10 jan. 2026.

VIEIRA, J. O. *et al.* A doença de Paget mamária: um relato de caso. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 24, n. 1, p. 29-33, 1 mar. 2014. Disponível

em: <https://doi.org/10.5327/z201400010006rbm>. Acesso em: 23 set. 2025.

WANG, Y. *et al.* Improved breast cancer histological grading using deep learning. **Annals of Oncology**. V.33, p. 9-98, 2022. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.09.007 Disponível em:

[https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(21\)04486-0/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(21)04486-0/fulltext) . Acesso em: 22 jun. 2025

WANG, Y. *et al.* The Regulation of Exosome Generation and Function in Physiological and Pathological Processes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 255, 23 dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25010255>. Acesso em: 17 jan. 2026.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: How special are they? **Molecular Oncology**, v. 4, n. 3, p. 192-208, jun. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>.

WEN, S. W. *et al.* Breast Cancer-Derived Exosomes Reflect the Cell-of-Origin Phenotype. **PROTEOMICS**, v. 19, n. 8, p. 1800180, 26 fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.201800180>. Acesso em: 21 jul. 2025.

WU, S. *et al.* Evaluation of the 8th edition of the American joint committee on cancer's pathological staging system in prognosis assessment and treatment decision making for stage T1-2N1 breast cancer after mastectomy. **The Breast**, v. 51, p. 2-10, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2020.02.012>. Acesso em: 12 jan. 2026.

YU, W. *et al.* Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges. **Annals of Oncology**, v. 32, n. 4, p. 466-477, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.01.074>. Acesso em: 8 out. 2025.

YU, Y.; WEI, W.; LIU, J.. Diagnostic value of fine-needle aspiration biopsy for breast mass: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, 25 jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-41>. Acesso em: 29 set. 2025.

ZHANG, A. *et al.* Serum Proteomics in Biomedical Research: A Systematic Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 4, p. 774-786, 23 abr. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0238-7>. Acesso em: 26 jan. 2026.

ZHU, H.; DOGAN, B. E. American Joint Committee on Cancer's Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: Summary for Clinicians. **Eur J Breast Health**, 17, n. 3, p. 234-238, Jul 2021. <https://doi.org/10.4274/ejbh.galenos.2021.2021-4-3>

ZHU, L. *et al.* Isolation and characterization of exosomes for cancer research. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, n. 1, p. 152, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00987-y>.