

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

O ADN TUMORAL CIRCULANTE NA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA DO CANCRO DE MAMA

Trabalho submetido por
Luana Lucia Ruiz Furnari
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

julho de 2025

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

O ADN TUMORAL CIRCULANTE NA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA DO CANCRO DE MAMA

Trabalho submetido por
Luana Lucia Ruiz Furnari
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Ana Clara Ribeiro

julho de 2025

AGRADECIMENTOS

Quero, antes de mais nada, agradecer à minha orientadora de tese e professora, a Doutora Ana Clara Ribeiro. Obrigada pelo acompanhamento ao longo deste ano, pelos conselhos, pela disponibilidade e pelos ensinamentos valiosos transmitidos, especialmente em genética.

Agradeço também à minha faculdade, o Instituto Universitário de Egas Moniz, pelo acompanhamento, pela qualidade do ensino e por todas as memórias que levo comigo.

Um enorme obrigado à minha família – aos meus pais e ao meu irmão – pelo amor, pela confiança e pelo apoio constante desde França ao longo destes cinco anos.

Por fim, quero agradecer aos meus amigos em Portugal, a minha segunda família. Obrigada pelos momentos partilhados, pelas risadas, pelo apoio e por tudo o que vivemos – e pelo que ainda está por vir.

RESUMO

As células tumorais libertam moléculas de DNA livre na circulação sanguínea. Este DNA tumoral circulante (ctDNA) é atualmente o analito principal das biópsias líquidas para explorar o perfil mutacional do cancro. (Dang & Park, 2022) O DNA tumoral circulante é um biomarcador emergente com grande potencial para a deteção precoce, avaliação prognóstica e monitorização do cancro da mama. Estes marcadores circulantes avaliam e monitorizam as células cancerosas através de uma simples colheita de sangue não invasiva, conhecida como biópsia líquida (Alemzadeh et al., 2023).

Atualmente, o cancro de mama é o mais prevalente e a segunda causa de mortalidade por cancro entre as mulheres. Apesar dos avanços notáveis no seu tratamento, a heterogeneidade dos tumores, entre as pacientes e dentro de um mesmo tumor, continua a ser um desafio importante para o diagnóstico e o prognóstico (Song et al., 2016).

A análise do DNA tumoral circulante é clinicamente útil no cancro da mama no estágio inicial, no diagnóstico precoce, na deteção da doença residual mínima e na previsão de recidivas metastáticas (Vlataki et al., 2023).

O objetivo principal deste estudo consiste em contextualizar o papel do DNA tumoral circulante (ctDNA) no cancro de mama como biomarcador molecular sendo especialmente utilizado no diagnóstico precoce, na monitorização terapêutica e na personalização do tratamento. Permitirá a construção de um estado da arte atualizado sobre o uso clínico do ctDNA no cancro da mama e das suas potenciais implicações na prática oncológica moderna.

Este estudo visa contribuir para a compreensão de como o ctDNA pode auxiliar na abordagem ao cancro de mama, tornando-a mais personalizada, sensível e eficaz.

Palavras-chave : Biópsias líquidas; DNA tumoral circulante; Cancro da mama; Biomarcador Molecular; Tratamento; Resistência; Recidiva

ABSTRACT

Tumor cells release free DNA molecules into the bloodstream. This circulating tumor DNA (ctDNA) has become the main analyte in liquid biopsies used to explore the mutational profile of cancer (Dang & Park, 2022).

Circulating tumor DNA is a promising non-invasive biomarker that enables real-time monitoring of tumor dynamics and offers new opportunities for personalized treatment in breast cancer. These circulating markers assess and monitor cancer cells through a simple, non-invasive blood test, liquid biopsies (Alemzadeh et al., 2023).

Breast cancer is currently the most common and second leading cause of cancer mortality among women. Despite remarkable advances in its treatment, the heterogeneity of tumors, between patients and within the same tumor, remains a major challenge for diagnosis and prognosis (Song et al., 2016).

Analysis of circulating tumor DNA is clinically useful in early-stage breast cancer for early diagnosis, detection of minimal residual disease and prediction of metastatic recurrences (Vlataki et al., 2023).

The main objective of this study is to contextualize the role of circulating tumor DNA (ctDNA) in breast cancer as a molecular biomarker, with particular emphasis on its application in early diagnosis, therapeutic monitoring, and treatment personalization. This review aims to provide an updated current knowledge on the clinical use of ctDNA in breast cancer and its potential implications in current oncological practice.

This study also seeks to contribute to a better understanding of how ctDNA can support a more personalized, sensitive, and effective approach to breast cancer management.

Keywords : Liquid biopsies; Circulating tumor DNA; Breast cancer; Molecular biomarker; Treatment; Resistance; Recurrence

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
ÍNDICE GERAL.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
I. INTRODUÇÃO	15
II. DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1. Cancro da mama: abordagem terapêutica atual e principais desafios....	17
2.1.1. Caracterização molecular dos tumores : recetores hormonais, HER2 e subtipos	17
2.1.1.1. Recetores hormonais : Luminal A e Luminal B	17
2.1.1.2. HER2	19
2.1.1.3. Triple negative breast cancer (TNBC).....	20
2.1.1.4. Mutações genéticas associadas ao cancro da mama: fundamentos biológicos e implicações clínicas	21
2.1.2. Estratégias de rastreio e diagnóstico inicial: imagem e biópsia tecidual	24
2.1.3. Abordagens terapêuticas convencionais : cirurgia, hormonoterapia, quimioterapia e radioterapia	25
2.1.3.1. Hormonoterapia	25
2.1.3.2. Terapia biológica	26
2.1.3.3. Quimioterapia, cirurgia e radioterapia.....	26
2.1.4. Limitações atuais na deteção de recidivas e personalização do tratamento	26
2.2. DNA tumoral circulante : conceitos fundamentais	27
2.2.1. ctDNA : definição e origem biológica.....	27
2.2.1.1. Caracterização do ctDNA: origem, composição e relevância clínica	27
2.2.1.2. ctDNA na corrente sanguínea.....	28

2.2.1.3.	Principais características biológicas e abordagens analíticas do ctDNA	31
2.2.1.4.	Fragmentação, metilação, mutações e técnicas de detecção do ctDNA	32
2.2.2.	Interesse do ctDNA como biomarcador da biópsia líquida: atividade tumoral e carga tumoral	33
2.2.2.1.	Conceito de biópsia líquida	33
2.2.2.2.	ctDNA como reflexo da atividade tumoral	36
2.2.2.3.	ctDNA como indicador da carga tumoral	36
2.2.3.	Técnicas avançadas de detecção do ctDNA	37
2.2.3.1.	Deteção baseada em nanomateriais	38
2.2.3.2.	Deteção baseados na PCR	40
2.2.3.3.	Sequenciação genómica	42
2.2.3.	Aplicação como biomarcador no diagnóstico precoce, monitorização do tratamento e deteção de recidivas	43
2.2.3.1.	Diagnóstico precoce	43
2.2.3.2.	Monitorização da resposta ao tratamento	44
2.2.3.3.	Deteção precoce de recidivas	45
2.3.	O ctDNA na resistência aos tratamentos, previsão nos casos de recidiva e na personalização dos tratamentos , uma integração na prática clínica do cancro da mama	46
2.3.3.	Deteção precoce da doença residual mínima (MRD)	46
2.3.4.	Deteção do risco de recidiva e emergência de resistências : papel central do DNA tumoral circulante	49
2.3.4.1.	Marcadores preditivos e mutações associadas à recidiva	49
2.3.4.2.	ctDNA como ferramenta de deteção precoce da resistência adquirida	50
2.3.4.3.	Adaptações terapêuticas orientadas pelo perfil mutacional	50
2.3.5.	Mutações emergentes e resistência	51
2.3.6.	Medicina personalizada : adaptação terapêutica orientada pelo perfil mutacional do ctDNA, uma integração na prática clínica do cancro de mama	52
2.4.	Limitações, desafios e perspectivas futuras do DNA tumoral circulante no cancro de mama	53
2.4.3.	Limitações atuais do ctDNA	53

2.4.4. Desafios para aplicação clínica.....	54
2.4.5. Perspectivas futuras e caminhos de avanço	55
3. CONCLUSÃO.....	57
4. BIBLIOGRAFIA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação entre os esquemas atuais de subtipos entre linhas celulares e tumores de cancro de mama (adaptado de (Dai et al., 2017))

Figura 2 - Utilidades clínicas potenciais do DNA tumoral circulante conforme o contexto clínico. (adaptado de (Castelli et al., 2018))

Figura 3 - Fluxograma da aplicação da biópsia líquida em cancros. Aplicações das biópsias líquidas e tipos de biomarcadores para biópsias líquidas (adaptado de (Ma et al., 2024))

Figura 4 - Os métodos de deteção do ctDNA (adaptado de (Wang et al., 2021))

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Subtipos moleculares / intrínsecos dos cancros da mama (adaptado de (Feng et al., 2018))

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA: Ácido desoxirribonucleico

AKT1: v-akt oncogene viral homólogo 1 (proteína quinase B)

ARMS-PCR: Sistema de Amplificação Refratária a Mutação - Reação em Cadeia da Polimerase

BEAMing: Bolas, emulsão, amplificação e magnetismo

BRCA1: Gene associado ao cancro de mama tipo 1

BRAC2: Gene associado ao cancro de mama tipo 2

c-ERBB2: Sinônimo de HER2 - Receptor tirosina quinase erbB-2

CA 15-3: Antígeno do Cancro 15-3 (marcador tumoral)

CDK4/6: Quinases dependentes de ciclina 4 e 6

cfDNA: DNA livre circulante

CHEK2: Quinase de ponto de verificação 2

CHIP: Hematopoiese Clonal de Potencial Indeterminado

CNV: Número de cópias

CTC: Células tumorais circulantes

cfDNA : DNA livre circulante

ctDNA: DNA circulante tumoral

ddPCR: PCR Digital em Gotas

DELFI: Avaliação do DNA Fragmentado para Intercepção Precoce

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

ER: Receptor de estrogênios

ERBB2: Oncogene Eritroblástico B2

ESR1: Receptor de Estrogênio 1

FDA: Food and Drug Administration

FISH: Hibridização por Fluorescência In Situ

FOXA1: Forkhead box A1

GATA3: Proteína de Ligação GATA 3

HER2: Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano

HER2/NEU: Outro nome para HER2

KI-67: Proteína de proliferação celular, codificada pelo gene MKI-67

KRT8: Queratina 8

KRT18: Queratina 18

KRT19: Queratina 19

LAR: Receptor Androgênico Luminal (subtipo de TNBC)

MAF: Frequência do Alelo Menor

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MKI-67: Gene que codifica a proteína Ki-67

MRD: Doença Residual Mínima

MVBs: Corpos multivesiculares

NGS: Sequenciação de Nova Geração

OR: Razão de chances (Odds Ratio)

PADA1: Estudo clínico sobre cancro de mama metastático ER+ HER2-

PALB2: Parceiro e Localizador de BRCA2

PALOMA3: Estudo clínico de fase III sobre inibidores de CDK4/6

PAM50: Análise de Predição de Microarray 50

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PFS: Sobrevivência Livre de Progressão

PI3K: Fosfo-inositol 3-quinase

PIK3CA: Gene que codifica a subunidade catalítica alfa da PI3K

PR: Receptor de progesterona

PTEN: Fosfatase e homólogo de TENSin

RCB: Carga residual de cancro

RM: Ressonância Magnética

RNA: Ácido ribonucleico

SERENA6: Estudo clínico avaliando o tratamento do cancro de mama

SERS: Espalhamento rRaman Intensificado por Superfície

SOLAR1: Estudo clínico sobre inibidores de PI3K (alpelisibe)

TC: Tomografia computadorizada

TNBC: Cancro de mama triplo negativo

TP53: Proteína tumoral 53

WES: Sequenciação de exoma completo

WGS: Sequenciação do genoma completo

I. INTRODUÇÃO

O cancro da mama é o tipo de cancro mais frequente a nível mundial e é a principal causa de mortalidade de cancro em mulheres. Constitui, por isso, um importante desafio de saúde pública (Yang et al., 2023).

Apesar dos avanços terapêuticos, muitas pacientes tratadas continuam a sucumbir devido à progressão da doença. Existe, assim, uma necessidade urgente de melhorar as estratégias de rastreio, diagnóstico e tratamento (Xu et al., 2024).

No passado recente a monitorização do cancro baseava-se em exames imagiológicos e em marcadores tumorais séricos com baixa especificidade, como o CA 15-3.

Atualmente, têm emergido novas abordagens não invasivas com o objetivo de possibilitar uma vigilância mais precisa, sensível e menos agressiva da evolução da doença. Entre estas, destaca-se a biópsia líquida, e em particular o DNA tumoral circulante (ctDNA), como um avanço promissor na abordagem do cancro da mama (Costa & Schmitt, 2019; Mesquita et al., 2020; Addanki et al., 2022).

O ctDNA consiste em pequenos fragmentos de DNA libertados na circulação sanguínea por células tumorais, através de processos de apoptose, necrose ou secreção ativa. O ctDNA reflete a heterogeneidade genética dos tumores. Além disso, as suas características moleculares alteram-se rapidamente, o que o torna um biomarcador dinâmico com potencial para a monitorização em tempo real da doença (Alemzadeh et al., 2023; Sant et al., 2022). A sua curta meia-vida permite detetar precocemente variações na carga tumoral, antes mesmo de alterações visíveis por exames imagiológicos, como a tomografia computadorizada (TC) ou a ressonância magnética (RM) (Sanz-Garcia et al., 2022).

Diversas tecnologias têm sido desenvolvidas para a deteção do ctDNA, nomeadamente a PCR digital, BEAMing e a sequenciação de nova geração (NGS) (Dao et al., 2023; Li et al., 2024). Técnicas mais recentes, como as abordagens NGS tumor-guided, possibilitam uma vigilância personalizada altamente sensível, especialmente nos estádios precoces da doença (Panet et al., 2024).

No contexto do cancro da mama, o ctDNA tem demonstrado utilidade clínica em várias situações. Permite a deteção da doença residual mínima (MRD) após tratamento com intenção curativa, possibilitando antecipar recidivas meses antes de qualquer manifestação clínica (Zhang et al., 2025).

Apesar do seu elevado potencial, o ctDNA ainda apresenta limitações técnicas e clínicas, nomeadamente a baixa sensibilidade em casos de pequena carga tumoral, variabilidade nos procedimentos pré-analíticos e a ausência de protocolos padronizados entre laboratórios (Q. Hu et al., 2023; Liu, 2024). A sua integração nas recomendações clínicas continua por validar, exigindo ensaios clínicos prospetivos e controlados (Alix-Panabières & Pantel, 2016; Melichar, 2024).

O objetivo desta tese é analisar o papel do ctDNA no cancro da mama, nomeadamente na deteção precoce, avaliação da resistência terapêutica e personalização do tratamento, com base numa revisão da literatura científica recente.

Esta revisão baseia-se numa revisão da literatura sobre o uso do ctDNA no rastreio e seguimento do cancro da mama, com especial enfoque no método da biópsia líquida. A metodologia utilizada consistiu na pesquisa de 62 artigos científicos publicados nos últimos dez anos nas bases de dados PubMed, B-on, ScienceDirect, PharmGKB e Ensembl, em português, em inglês e em francês.

II. DESENVOLVIMENTO

2.1. Cancro da mama: abordagem terapêutica atual e principais desafios

O cancro da mama é o tipo de cancro mais frequente nas mulheres em todo o mundo. Cerca de 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas e 685.000 morreram em 2020 devido ao cancro da mama. Todas as mulheres, independentemente da idade, podem ser afetadas por esta doença, o que a torna um importante problema de saúde pública (Ben-Dror et al., 2022).

2.1.1. Caracterização molecular dos tumores : recetores hormonais, HER2 e subtipos

O cancro da mama é uma doença heterogénea com uma grande variedade de comportamentos biológicos, genéticos e moleculares, o que influencia a forma como evolui, responde aos tratamentos e afeta o prognóstico. Apresenta vários subtipos distintos, que são diferenciados molecularmente com base na presença dos recetores hormonais: recetores de estrogénios positivos (ER+), recetores de progesterona positivos (PR+) e recetor do fator de crescimento epidérmico humano positivo (HER2+).

Consoante a expressão ou não destes recetores, distinguem-se quatro subtipos de cancro da mama: Luminal A, Luminal B, HER2-positivo e cancro da mama triplo negativo (TNBC) (Mayrovitz, 2022).

2.1.1.1. Recetores hormonais : Luminal A e Luminal B

Os recetores hormonais estão presentes nas células do corpo humano, ao nível do núcleo. As hormonas estrogénio e progesterona, quando ligadas aos recetores de uma célula, podem ou não favorecer o crescimento dessa célula e influenciar o seu comportamento.

No cancro da mama, estas hormonas podem influenciar o crescimento e a divisão das células que possuem recetores hormonais (Allison et al., 2020).

Para explicar estes recetores hormonais, distinguem-se dois subtipos de cancro da mama: Luminal A e Luminal B.

O cancro da mama do tipo Luminal A distingue-se por uma expressão positiva dos recetores hormonais, especialmente os recetores de estrogénio e, na maioria dos casos, também os recetores de progesterona. Este subtipo tumoral apresenta geralmente um prognóstico mais favorável, com menor risco de recidiva metastática em comparação com outras formas de cancro da mama (Hilton et al., 2018).

Do ponto de vista biológico, os tumores Luminal A são caracterizados por uma menor taxa de proliferação celular, evidenciada por uma expressão reduzida do índice Ki-67 (um marcador de proliferação). Isto contrasta com o subtipo Luminal B, mais agressivo, no qual a expressão do PR é frequentemente mais baixa. Esta distinção é reforçada por análises genómicas como o teste PAM50 (*Prediction Analysis of Microarray 50* – teste de expressão de 50 genes que identifica os subtipos moleculares intrínsecos do cancro da mama), que demonstram que os tumores Luminal A apresentam níveis significativamente mais elevados de expressão do PR, constituindo um critério discriminante essencial entre os dois subtipos (Neves Rebello Alves et al., 2023).

A nível celular, as linhagens associadas ao fenótipo Luminal A expressam fortemente genes típicos do epitélio mamário diferenciado. Entre eles :

- *ESR1* (*Estrogen Receptor 1*, ou ER α – principal forma do recetor de estrogénio na mama),
- *KRT8*, *KRT18*, *KRT19* (genes que codificam *Queratinas* – proteínas estruturais das células epiteliais),
- *GATA3* (*GATA binding protein 3* – fator de transcrição essencial para a diferenciação das células mamárias),
- *FOXA1* (*Forkhead box A1* – cofator do ER, regula a resposta hormonal).

Estes perfis de expressão traduzem um elevado grau de diferenciação celular e uma baixa capacidade de migração, refletindo um comportamento tumoral menos invasivo. Além disso, a presença de junções intercelulares bem organizadas nestas células reforça o seu caráter epitelial coeso e não agressivo (Dai et al., 2017).

O tipo Luminal B caracteriza-se por uma expressão positiva dos recetores de estrogénio, mas distingue-se por uma expressão mais fraca ou ausente dos recetores de progesterona, bem como por uma deteção mais elevada do marcador Ki67, que está associado a um pior prognóstico e a um tratamento mais agressivo para as doentes (Hilton et al., 2018).

O Ki-67 é um marcador essencial da proliferação celular, codificado pelo gene *MKI-67*. Permite distinguir subtipos de cancro e orientar a decisão terapêutica, em particular para diferenciar os cancros Luminal A e B e prever a resposta aos tratamentos endócrinos. A sua medição após algumas semanas de terapêutica endócrina neoadjuvante permite avaliar precocemente a resposta biológica ao tratamento. Variações nos níveis de Ki-67 a curto prazo estão associadas aos benefícios a longo prazo, sendo um marcador preditivo promissor (Hilton et al., 2018; Neves Rebello Alves et al., 2023).

2.1.1.2. HER2

O cancro da mama positivo para os recetores do gene HER2 (abreviatura de *Human Epidermal growth factor Receptor 2*) é geralmente negativo para os recetores hormonais de estrogénio e progesterona. HER2 é uma proteína transmembranar com atividade tirosina-quinase, codificada pelo gene *ERBB2*, também conhecido como HER2/NEU ou c-ERBB2. Este gene está localizado na região cromossómica 17q12 e pertence à família dos recetores do fator de crescimento epidérmico (EGFR/HER). A proteína HER2 é composta por um domínio extracelular de ligação, um domínio transmembranar e um domínio intracelular. De forma constitutivamente ativa, HER2 forma facilmente dímeros com outros recetores, favorecendo a ativação de vias de sinalização intracelular. A estimulação de HER2 leva à fosforilação de resíduos de tirosina, ativando cascatas de sinalização como as vias MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*), que estão respetivamente envolvidas na regulação do ciclo celular e na sobrevivência e crescimento das células tumorais. A amplificação do gene *ERBB2* provoca uma sobreexpressão de HER2, associada a um crescimento tumoral acelerado e a um prognóstico mais desfavorável.

O cancro da mama do tipo Luminal B pode também expressar HER2, o que contribui para o seu carácter mais agressivo (Feng et al., 2018; Prat et al., 2015).

2.1.1.3. Triple negative breast cancer (TNBC)

O cancro da mama triplo negativo (TNBC) caracteriza-se pela ausência de expressão dos recetores hormonais (estrogénio e progesterona) e pela ausência de sobre-expressão do recetor HER2. Esta particularidade biológica priva-o de alvos terapêuticos convencionais, o que contribui para um prognóstico geralmente mais desfavorável. Distingue-se por uma elevada agressividade clínica, uma proliferação tumoral rápida e uma tendência a desenvolver precocemente metástases, nomeadamente ao nível dos pulmões, do fígado e do cérebro (Borri & Granaglia, 2021).

O TNBC constitui um grupo heterogéneo de tumores, tanto do ponto de vista molecular como histológico. A análise da expressão génica permitiu identificar vários subtipos distintos, como as formas basal-like, mesenquimatosas ou ainda aquelas que expressam o recetor de androgénios (LAR), cada um apresentando perfis biológicos específicos e respostas terapêuticas variáveis. Esta diversidade dificulta a implementação de abordagens terapêuticas direcionadas eficazes e sublinha a necessidade de uma estratificação precisa das doentes.

Do ponto de vista morfológico, o TNBC inclui maioritariamente carcinomas ductais invasivos de alto grau, frequentemente associados a necrose tumoral extensa e a um infiltrado inflamatório importante. Inclui também formas mais raras, como os carcinomas adenoides císticos, que, apesar do seu perfil triplo negativo, apresentam um comportamento clínico mais favorável e uma evolução geralmente menos agressiva (Borri & Granaglia, 2021; Dai et al., 2017).

Tabela 1 – Subtipos moleculares / intrínsecos dos cânceros da mama (adaptado de (Feng et al., 2018))

Subtipos	Assinaturas Moleculares	Características	Opções de tratamento
Luminal A	ER+, PR±, HER2-, Ki67 baixo	~70%, mais comum Melhor prognóstico	Terapia Hormonal Terapia Alvo
Luminal B	ER+, PR±, HER2±, Ki67 alto	10% – 20% Sobrevida menor que Luminal A	Terapia Hormonal Terapia Alvo
HER2	ER-, PR-, HER2+	5% – 15%	Terapia Alvo
TNBCC	ER-, PR-, HER2-	15% – 20% Pior prognóstico	Terapia Limitada Terapia Alvo

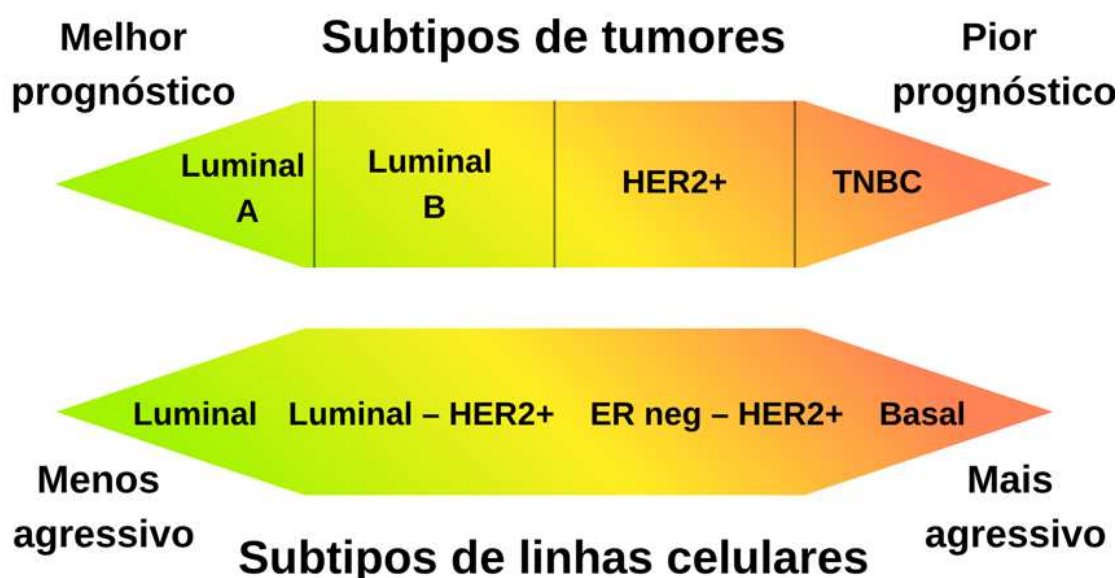


Figura 1 - Comparação entre os esquemas atuais de subtipos entre linhas celulares e tumores de cancro de mama (adaptado de (Dai et al., 2017))

2.1.1.4. Mutações genéticas associadas ao cancro da mama: fundamentos biológicos e implicações clínicas

O desenvolvimento do cancro da mama baseia-se, em muitos casos, em alterações genéticas específicas. Algumas destas mutações são germinativas e transmitidas de forma hereditária, enquanto outras são adquiridas ao longo da carcinogénese. A sua identificação permite não só compreender melhor os mecanismos moleculares da

doença, como também orientar as decisões clínicas em termos de rastreio, tratamento e prevenção (Feng et al., 2018).

Mutações germinativas (predisposição hereditária ao cancro de mama) :

Essas mutações estão presentes em todas as células desde o nascimento e aumentam significativamente o risco de desenvolver cancro de mama. Elas são investigadas em contextos de histórico familiar.

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* codificam proteínas supressoras de tumor envolvidas na reparação de quebras de fita dupla do DNA por recombinação homóloga. As mutações germinativas nesses genes aumentam consideravelmente o risco de desenvolver cancro de mama ou de ovário. As mutações em *BRCA1* estão particularmente associadas às formas triplo-negativas, enquanto *BRCA2* está mais frequentemente ligado a tumores luminais com receptor de estrogênio positivo (ER+). Do ponto de vista clínico, a sua identificação pode justificar uma vigilância reforçada ou medidas preventivas, como a mastectomia bilateral profilática (Feng et al., 2018; Neves Rebello Alves et al., 2023).

O gene *TP53*, que codifica a proteína p53, desempenha um papel central na regulação do ciclo celular, da apoptose e da reparação do DNA. Trata-se do gene mais frequentemente mutado nos cancros de mama invasivos, especialmente nos subtipos triplo-negativo e HER2-positivo. As mutações em *TP53* estão associadas a um fenótipo tumoral mais agressivo, baixa diferenciação, maior propensão à metástase e resposta variável à quimioterapia (Neves Rebello Alves et al., 2023; Silwal-Pandit et al., 2017).

O gene *PALB2* (Partner and Localizer of BRCA2) atua em conjunto com o *BRCA2* nos mecanismos de reparação do DNA e ajuda a direcioná-lo para o seu local de ação dentro da célula. As mutações patogénicas em *PALB2* estão associadas a um risco cumulativo de 35% de desenvolver cancro de mama antes dos 70 anos. Esse risco é ainda maior na presença de histórico familiar. As pacientes com mutações geralmente apresentam um fenótipo triplo-negativo e uma sobrevida global reduzida (Neves Rebello Alves et al., 2023).

O gene *CHEK2* codifica uma quinase envolvida na resposta às lesões no DNA. As mutações germinativas patogénicas conferem um risco moderado de cancro de mama, especialmente nos subtipos luminal A ou B (Neves Rebello Alves et al., 2023).

Mutações somáticas (adquiridas no tumor) :

Essas mutações surgem nas células mamárias ao longo da vida e contribuem para o desenvolvimento ou a progressão tumoral. Elas podem servir como biomarcadores prognósticos ou preditivos.

O gene *PIK3CA* é frequentemente mutado nos cancros de mama, especialmente nas formas luminais ER+/HER2-. Essas mutações ativadoras levam à hiperativação da via PI3K/Akt/mTOR, promovendo a proliferação e a sobrevivência celular. Embora estejam associadas a tumores de baixo grau, essas mutações também estão ligadas a uma maior quimiorresistência (Neves Rebello Alves et al., 2023; Reinhardt et al., 2022).

O gene *ESR1* codifica o receptor de estrogénio (ER α), principal alvo dos tratamentos hormonais. Em tumores metastáticos tratados com inibidores da aromatase, podem surgir mutações adquiridas no *ESR1*, localizadas no domínio de ligação ao ligante, que levam à resistência hormonal. Essas mutações são raras em tumores primários, mas sua detecção no ctDNA é atualmente possível por meio da biópsia líquida, permitindo antecipar uma adaptação terapêutica (Dustin et al., 2019; Neves Rebello Alves et al., 2023).

O gene *ERBB2*, mais conhecido como *HER2*, codifica um receptor tirosina quinase. Sua superexpressão está associada a um comportamento tumoral agressivo, alto risco de metástases e prognóstico desfavorável (Neves Rebello Alves et al., 2023).

O gene *PTEN* regula negativamente a via PI3K/Akt. A perda de expressão, observada em cerca de 50% dos casos de cancro de mama, favorece a proliferação e a disseminação tumoral. As mutações em *PTEN* também estão envolvidas em síndromes hereditárias raras, como a síndrome de Cowden, que aumenta o risco de cancro de mama (Feng et al., 2018; Neves Rebello Alves et al., 2023).

2.1.2. Estratégias de rastreio e diagnóstico inicial: imagem e biópsia tecidual

O rastreio significa identificar mudanças precoces ou sinais invisíveis de uma doença que podem indicar uma doença em fase inicial. É uma triagem e no cancro de mama, pode permitir a deteção desse mesmo cancro numa fase precoce da doença e aumentar as hipóteses de sucesso do tratamento (National Cancer Institute (2025)).

O diagnóstico do cancro da mama baseia-se, em primeiro lugar, no rastreio, geralmente através da mamografia, complementada, se necessário, por uma ecografia ou uma ressonância magnética mamária (Cardoso et al., 2019).

Para detetar um possível cancro da mama nas mulheres, realiza-se uma avaliação tripla que inclui a recolha dos antecedentes médicos, um exame clínico das mamas, bem como um exame imagiológico, como uma ecografia e/ou mamografia, e ainda uma biópsia tecidual de qualquer lesão suspeita.

O exame clínico mamário inclui a avaliação das mamas, da parede torácica, das zonas axilares e dos gânglios linfáticos.

Este exame divide-se em duas partes: a inspeção e a palpação. O médico observa a pele em busca de anomalias como retrações, aderências, eritemas, cicatrizes, massas ou alterações do mamilo, incluindo secreções.

A palpação permite identificar diferenças na densidade do tecido mamário (Katsura et al., 2022).

Para além das abordagens já referidas, existem outros métodos de rastreio, nomeadamente métodos de imagiologia, como a mamografia, que permite detetar o cancro numa fase inicial, potencialmente curável (Løberg et al., 2015).

Para confirmar o diagnóstico de cancro da mama, é necessário realizar uma análise histológica de uma amostra, obtida através de uma biópsia tecidual, que é atualmente o método de referência na deteção de tumores mamários.

Esta técnica permite não só identificar o tipo histológico, mas também analisar a expressão de biomarcadores preditivos, essenciais para a orientação terapêutica, nomeadamente no contexto das terapias alvo ou da imunoterapia (Licata et al., 2023).

Existem diferentes tipos de testes que permitem identificar o subtipo de cancro da mama. Para determinar o estado dos recetores hormonais do cancro, é necessário recorrer a uma biópsia tecidular, a fim de realizar testes de imunohistoquímica (Allison et al., 2020).

Através da biópsia tecidular, analisa-se igualmente o estado do HER2 com recurso à imunohistoquímica, que permite determinar a quantidade de proteínas HER2 nas células cancerígenas, bem como o número de cópias do gene *HER2* nessas células, através de um teste genético molecular – a hibridização in situ por fluorescência (FISH) (Wolff et al., 2023).

Novos métodos, como a biópsia líquida, poderão ser integrados no rastreio, de forma a introduzir a relevância do DNA tumoral circulante.

2.1.3. Abordagens terapêuticas convencionais : cirurgia, hormonoterapia, quimioterapia e radioterapia

Cada subtipo de cancro da mama terá uma terapêutica diferente. dependendo da expressão dos recetores, o estágio ou o subtipo do cancro, bem como as características da doente, a terapêutica pode variar, sendo que, atualmente, a personalização dos tratamentos se tornou um ponto fundamental.

2.1.3.1. Hormonoterapia

Nos tipos de cancro positivos para os recetores hormonais, a primeira linha de tratamento é a hormonoterapia.

Existem vários medicamentos indicados, consoante o perfil da doente. Para mulheres em pré-menopausa, é geralmente prescrito o tamoxifeno, enquanto, em mulheres na pós-menopausa, os inibidores da aromatase, como o anastrozol, são mais frequentemente utilizados.

É recomendada uma avaliação da densidade óssea antes do início do tratamento (Katsura et al., 2022).

2.1.3.2. Terapia biológica

Nas doentes com uma sobre-expressão do recetor do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2), está indicada uma terapêutica alvo complementar. Esta baseia-se na administração de anticorpos monoclonais anti-HER2, como o trastuzumab, em associação com a quimioterapia.

Embora estes tratamentos tenham melhorado significativamente o prognóstico das doentes HER2+, apresentam um risco de cardiotoxicidade, o que exige uma monitorização regular da função cardíaca durante o tratamento (Katsura et al., 2022).

2.1.3.3. Quimioterapia, cirurgia e radioterapia

No caso do cancro da mama triplo negativo, um tipo de cancro altamente heterogéneo, é geralmente implementada uma combinação de várias terapêuticas. A abordagem baseia-se, em regra, numa quimioterapia intensiva, seguida de uma cirurgia conservadora sempre que possível, e posteriormente de radioterapia.

Esta combinação visa alcançar uma resposta patológica completa, especialmente em doentes jovens e com elevado risco. No entanto, os efeitos a longo prazo permanecem incertos. A mastectomia não apresenta uma vantagem clara em termos de recorrência em comparação com a cirurgia conservadora (Borri & Granaglia, 2021).

2.1.4. Limitações atuais na deteção de recidivas e personalização do tratamento

Nas últimas décadas, registaram-se numerosos avanços no rastreio e no tratamento do cancro da mama. No entanto, persistem limitações, sobretudo na deteção precoce das recidivas. Esta continua a basear-se maioritariamente em exames imagiológicos e em marcadores tumorais séricos com baixa sensibilidade e especificidade.

Além disso, a heterogeneidade biológica dos tumores e a variabilidade da resposta aos tratamentos dificultam a verdadeira personalização das estratégias terapêuticas.

Estas limitações sublinham a necessidade de desenvolver ferramentas inovadoras, capazes de acompanhar a evolução da doença de forma mais sensível, dinâmica e individualizada. É neste contexto que se insere o DNA tumoral circulante (ctDNA), uma abordagem promissora (Merker et al., 2018).

2.2. DNA tumoral circulante : conceitos fundamentais

2.2.1. ctDNA : definição e origem biológica

O DNA tumoral circulante (ctDNA) é uma abordagem não invasiva na detecção de diversas doenças cancerígenas, especialmente no contexto da biópsia líquida (Kiavue & Cabel, 2025).

A Figura 2 ilustra as potenciais utilidades clínicas do ctDNA ao longo das diferentes fases do tratamento oncológico, desde o rastreamento até a progressão da doença.

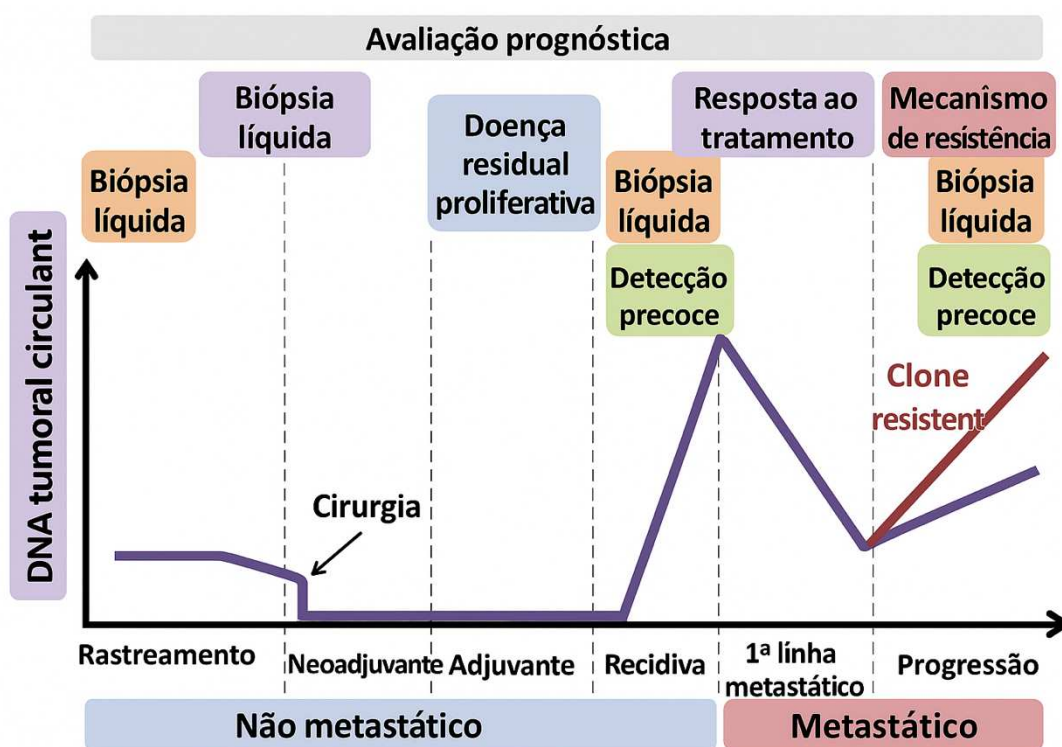


Figura 2 - Utilidades clínicas potenciais do DNA tumoral circulante conforme o contexto clínico.
(adaptado de (Castelli et al., 2018))

2.2.1.1. Caracterização do ctDNA: origem, composição e relevância clínica

O DNA livre circulante (cfDNA) está presente no sangue e em outros líquidos biológicos. É considerado um biomarcador potencial de várias patologias, sendo que sua concentração varia de acordo com os processos fisiológicos ou patológicos (Castelli et al., 2018).

O cfDNA representa um conjunto de pequenos fragmentos de DNA de dupla hélice libertados na corrente sanguínea, entre os quais se distingue uma fração de origem tumoral denominada ctDNA, proveniente especificamente de células cancerosas. Ao contrário do cfDNA, que é gerado por células saudáveis durante processos fisiológicos como a apoptose ou a necrose, o ctDNA é exclusivamente derivado de células tumorais e reflete as alterações genéticas e epigenéticas características, como mutações somáticas, anomalias de metilação, inserções ou deleções (Dao et al., 2023; Mesquita et al., 2020).

Representa uma proporção baixa, mas significativa do cfDNA total, geralmente entre 0,1% e 1%, podendo, no entanto, aumentar conforme a progressão da doença ou a carga tumoral (Ma et al., 2024).

Do ponto de vista clínico, o ctDNA permite o acesso não invasivo ao material genético tumoral, a partir de uma simples amostra de sangue. Trata-se, portanto, de uma ferramenta promissora no campo da biópsia líquida. A sua presença e concentração variam de acordo com várias características tumorais, como o tipo histológico, o estágio, a vascularização, a carga tumoral ou ainda a taxa de apoptose (Mesquita et al., 2020).

Por fim, embora o sangue seja o principal fluido utilizado na sua análise, o ctDNA também pode ser detectado noutros líquidos biológicos, como a urina, o líquido cefalorraquidiano, a saliva ou ainda os derrames pleurais e peritoneais, alargando assim as suas possibilidades de aplicação clínica (Dao et al., 2023).

2.2.1.2. ctDNA na corrente sanguínea

O ctDNA está presente em diversos fluidos corporais, nomeadamente no sangue. É libertado na circulação sanguínea através de vários mecanismos, como a apoptose, a necrose ou ainda a secreção ativa. Estes mecanismos influenciam diretamente o tamanho, a estrutura e a estabilidade dos fragmentos de DNA detetáveis na circulação sanguínea.

A apoptose é um mecanismo que conduz a uma morte celular controlada, em que as células deixam de se dividir e de crescer. O DNA é inicialmente degradado em grandes fragmentos (50–300 kb) e, de seguida, clivado em unidades nucleossômicas de aproximadamente 167 pares de bases, correspondentes ao DNA enrolado em torno das histonas, incluindo o DNA inter-nucleossômico (Z. Hu et al., 2021).

As células apoptóticas formam corpúsculos denominados corpúsculos apoptóticos que contêm esses fragmentos de DNA. Em princípio, estas estruturas são rapidamente eliminadas por células fagocitárias, como os macrófagos. Contudo, quando este sistema está sobrecarregado ou ineficaz — situação frequentemente observada em tumores proliferativos ou sob condições de stress (quimioterapia, hipóxia) — os fragmentos de DNA podem escapar para o sangue, contribuindo diretamente para a presença de ctDNA na circulação (D’Arcy, 2019).

A necrose é, por seu lado, uma forma de morte celular não controlada, que ocorre em resposta a danos celulares severos, nomeadamente em situações de hipóxia, inflamação ou em tumores altamente agressivos. Esta lise celular liberta o ctDNA de forma desorganizada, produzindo fragmentos de tamanho muito heterogéneo, frequentemente superiores a 1 000 ou mesmo 10 000 pb. Ao contrário da apoptose, estes fragmentos não estão estruturados em unidades nucleossômicas e são libertados num ambiente inflamatório pouco propício à sua estabilidade. A sua elevada concentração nos tumores necróticos constitui uma fonte significativa de ctDNA detetado no plasma (D’Arcy, 2019; Z. Hu et al., 2021).

Dados recentes evidenciaram um mecanismo de libertação de ctDNA que não depende nem da apoptose nem da necrose: a secreção ativa. Este processo envolve células vivas, capazes de libertar ativamente ctDNA para o meio extracelular, mesmo na ausência de morte celular aparente. Este fenómeno é observado *in vitro*, onde a concentração de DNA extracelular se correlaciona com a proliferação de células cancerígenas. Existem duas vias distintas: a via dos exossomas, em que o ctDNA fica encapsulado em pequenas vesículas extracelulares originadas nos corpos multivesiculares (MVBs), que se fundem com a membrana plasmática para libertar o seu conteúdo; e a via dependente dos anfisomas, associada à autofagia, em que fragmentos de ctDNA são transportados

através de estruturas autofágicas que se fundem com a membrana plasmática para os libertar (D'Arcy, 2019; Z. Hu et al., 2021).

Os mecanismos de libertação influenciam diretamente as características do ctDNA circulante. Consoante o processo envolvido, varia o tamanho dos fragmentos: a apoptose gera fragmentos curtos e regulares (~167 pb), correspondentes a unidades nucleossómicas; a necrose, por seu turno, produz fragmentos mais longos e heterogêneos, frequentemente superiores a 1 000 pb, devido a uma degradação desorganizada do genoma. No caso da secreção ativa, os fragmentos são normalmente mais curtos (~145 pb) e estão protegidos pela sua encapsulação em vesículas (Z. Hu et al., 2021).

A estabilidade do ctDNA depende também da sua origem. Os fragmentos apoptóticos são relativamente estáveis devido à sua associação aos nucleossomas, enquanto os provenientes da necrose são mais vulneráveis à degradação. A encapsulação em exossomas ou anfisomas, no contexto da secreção ativa, pode igualmente reforçar a sua estabilidade (D'Arcy, 2019).

Nos doentes com cancro, o ctDNA apresenta-se geralmente mais fragmentado do que o DNA livre circulante normal (cfDNA), com comprimentos frequentemente inferiores a 150 pb, reflexo de uma degradação mais intensa no contexto tumoral. Por fim, a quantidade de ctDNA libertada varia de acordo com vários fatores tumorais: uma elevada taxa de renovação celular, um estágio avançado ou uma carga tumoral significativa, bem como condições locais como a hipóxia ou a inflamação, que favorecem a necrose e amplificam a libertação de material tumoral para a circulação (Z. Hu et al., 2021).

O mecanismo de libertação do ctDNA influencia diretamente as suas características biológicas, nomeadamente a estrutura e a estabilidade. A apoptose, a necrose e a secreção ativa constituem as principais vias biológicas de libertação do ctDNA na circulação. Cada uma delas influencia de modo específico a estrutura, o tamanho e a estabilidade dos fragmentos libertados.

2.2.1.3. Principais características biológicas e abordagens analíticas do ctDNA

O DNA tumoral circulante (ctDNA) refere-se a fragmentos de DNA livre presentes na circulação sanguínea, originários de células tumorais primárias ou metastáticas. Como componente do DNA acelular (DNAac), é atualmente reconhecido como um biomarcador não invasivo promissor para a detecção, o acompanhamento terapêutico e o rastreio do cancro (Peng et al., 2021).

O ctDNA apresenta-se sob a forma de pequenos fragmentos, geralmente mais curtos do que aqueles provenientes de células não tumorais. O seu tamanho varia entre 150 e 200 pares de bases, refletindo mecanismos de apoptose e necrose característicos das células cancerígenas. A sua meia-vida muito curta — de alguns minutos a algumas horas — permite um acompanhamento quase em tempo real da evolução da doença, nomeadamente em resposta a uma cirurgia, quimioterapia ou imunoterapia (Araujo et al., 2019; Moding et al., 2021).

Ao contrário das biópsias teciduais clássicas, a análise do ctDNA por biópsia líquida oferece uma visão global mais fiel da heterogeneidade tumoral, integrando tanto as características do tumor primário como das metástases, bem como de clones resistentes que podem surgir ao longo do tratamento (Chan et al., 2021).

O ctDNA contém alterações moleculares específicas do tumor: mutações pontuais, deleções, duplicações, rearranjos cromossómicos, metilações irregulares e variações no número de cópias (CNVs). Estas assinaturas genéticas e epigenéticas fazem dele um marcador altamente específico para o diagnóstico e o acompanhamento do cancro (Dang & Park, 2022; Peng et al., 2021).

Uma das principais limitações reside na baixa concentração do ctDNA no plasma, representando por vezes menos de 0,01% do DNAac total, especialmente nos estádios precoces da doença. Esta escassez exige tecnologias de detecção extremamente sensíveis e específicas para evitar falsos positivos, nomeadamente aqueles relacionados com a hematopoiese clonal (CHIP) ou com a libertação de DNA genómico por células sanguíneas lisadas (Dang & Park, 2022; Moding et al., 2021).

2.2.1.4. Fragmentação, metilação, mutações e técnicas de detecção do ctDNA

O ctDNA possui características moleculares únicas que o distinguem do DNA livre circulante (cfDNA) de origem não tumoral. Estas propriedades incluem um grau elevado de fragmentação, alterações epigenéticas específicas como a metilação aberrante e mutações somáticas adquiridas. Estas assinaturas biológicas são fundamentais para a sua identificação e quantificação em contexto clínico.

Fragmentação do ctDNA

O ctDNA apresenta-se sob a forma de pequenos fragmentos de DNA de cadeia dupla, geralmente com menos de 150 pares de bases. Esta elevada fragmentação resulta de processos celulares como a apoptose e a necrose, frequentemente mais intensos em contextos tumorais. A análise do padrão de fragmentação — incluindo o tamanho, as extremidades e a distribuição dos fragmentos — permite melhorar a discriminação entre cfDNA tumoral e não tumoral.

A técnica DELFI (*DNA Evaluation of Fragments for Early Interception*) permite analisar os padrões de fragmentação do cfDNA a nível genómico, contribuindo para a deteção precoce do cancro. Pode ser combinada com outras abordagens, como a análise de mutações, para aumentar a sensibilidade diagnóstica (Peng et al., 2021).

Metilação

A metilação do DNA é uma modificação epigenética que desempenha um papel essencial na regulação da expressão génica. No contexto tumoral, observa-se frequentemente hipermetilação de regiões promotoras de genes supressores de tumor e hipometilação global, alterando a transcrição e contribuindo para a oncogénese. Estas alterações são preservadas no ctDNA e constituem biomarcadores específicos, detetáveis no plasma mesmo em concentrações muito baixas.

A análise da metilação mostra-se promissora para o diagnóstico precoce, a classificação tumoral, o prognóstico e o acompanhamento terapêutico. Por exemplo, a metilação do promotor do gene *ESR1*, associado à perda de expressão do recetor hormonal ER, pode indicar resistência ao tratamento hormonal no cancro da mama (Chan et al., 2021; Moding et al., 2021).

Mutações

O ctDNA transporta mutações somáticas características do tumor, incluindo mutações pontuais (como nos genes *PIK3CA* e *ESR1*), deleções, inserções, rearranjos cromossômicos e variações no número de cópias. Estas alterações refletem a heterogeneidade tumoral e têm um papel fundamental na orientação terapêutica. A detecção destas mutações permite monitorizar a evolução da doença, identificar mecanismos de resistência e adaptar os tratamentos de forma personalizada (Peng et al., 2021).

2.2.2. Interesse do ctDNA como biomarcador da biópsia líquida: atividade tumoral e carga tumoral

2.2.2.1. Conceito de biópsia líquida

A biópsia líquida é um método de análise minimamente invasivo que permite detectar sinais de cancro a partir de fluidos corporais, como o sangue. Ela representa uma alternativa ou um complemento à biópsia tecidual tradicional (Magbanua et al., 2022). Baseia-se na detecção de biomarcadores circulantes, como o DNA tumoral circulante, as células tumorais circulantes, as vesículas extracelulares e certos tipos de RNA (Yin et al., 2025).

Essa técnica apresenta diversas vantagens: é mais confortável e menos arriscada para o paciente, permite coletas repetidas ao longo do tempo e pode oferecer uma visão mais abrangente da doença, especialmente quando a biópsia tecidual é difícil de realizar. Também é promissora para acompanhar a resposta ao tratamento, detectar recidivas ou até identificar um cancro em estágio precoce. Em geral, o sangue é o fluido mais utilizado para esse tipo de análise, mas outros fluidos como a urina também podem ser utilizados (Bany-Paluchowski et al., 2020).

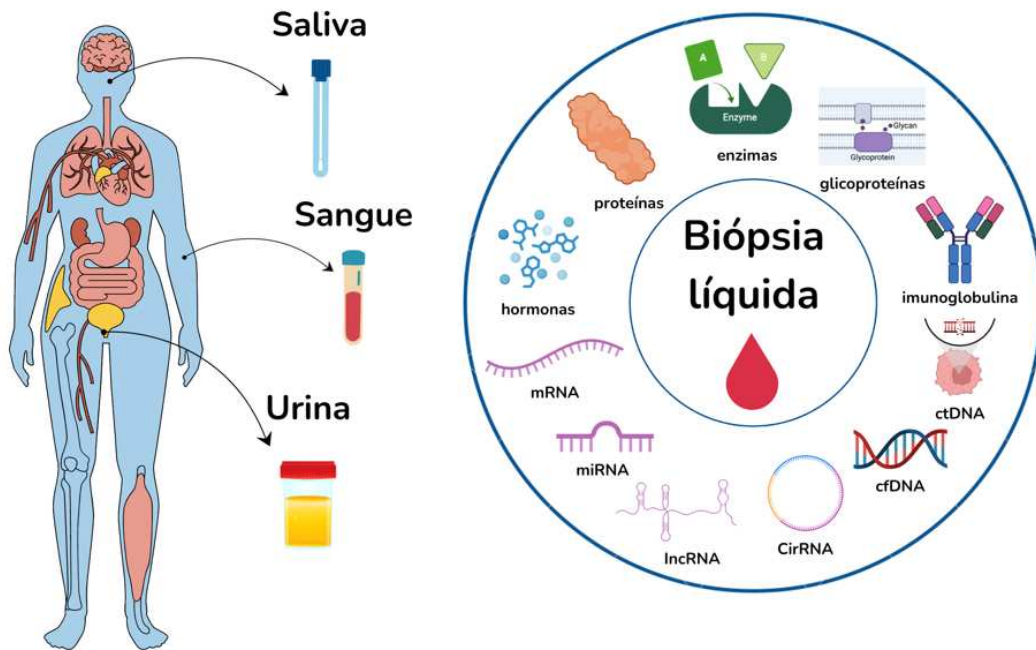


Figura 3 - Fluxograma da aplicação da biópsia líquida em cânceres. Aplicações das biópsias líquidas e tipos de biomarcadores para biópsias líquidas (adaptado de (Ma et al., 2024))

O protocolo experimental detalhado para realizar uma biópsia líquida visando analisar o ctDNA no cancro de mama envolve várias etapas-chave : o tipo de amostra, sua preparação, a extração do DNA e as técnicas de análise (Buono et al., 2019).

A principal amostra para a análise do DNA tumoral circulante é o sangue, mais especificamente o plasma. A lise dos glóbulos brancos leva à liberação de uma quantidade significativa de DNA genómico no soro. Aproximadamente 4 a 5 mL de plasma podem ser obtidos a partir de 10 mL de sangue de um paciente com cancro, contendo de 5 a 10 ng/mL de ctDNA (Kim & Park, 2023).

As etapas realizadas antes da análise do ctDNA têm um impacto significativo na qualidade dos resultados. Se essas etapas não forem bem controladas ou padronizadas, isso pode levar a variações importantes entre os resultados obtidos em diferentes laboratórios (Buono et al., 2019).

A colheita com o anticoagulante é essencial : A heparina não é considerada o melhor anticoagulante utilizado nos tubos de colheita de sangue, ao contrário do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O EDTA garante a estabilidade e a qualidade do

DNA livre circulante, enquanto a heparina pode interferir na reação de PCR, dificultando a detecção e a análise do ctDNA (Kim & Park, 2023).

A temperatura de armazenamento e prazo de processamento também são essenciais na colheita de sangue para a extração do ctDNA. Nos tubos com EDTA, o processamento das amostras de sangue deve ser realizado nas 6 horas seguintes à colheita. A conservação a 4 °C ou à temperatura ambiente não altera a concentração de cfDNA (Buono et al., 2019).

A maioria dos protocolos experimentais carece de informações padronizadas sobre os protocolos de centrifugação, mas alguns exemplos observados em protocolos incluem:

- Primeira centrifugação: 2.000 g durante 10 minutos à temperatura ambiente, ou 1.500 g durante 15 minutos a 4 °C.
- Segunda centrifugação: 2.000 g durante 10 minutos a 4 °C, ou 3.000 g durante 10 minutos (Kim & Park, 2023).

A extração do DNA tumoral circulante é um desafio devido à sua baixa quantidade, pois representa apenas uma pequena fração do cfDNA. Ele é altamente fragmentado e, muitas vezes, difícil de distinguir do cfDNA não tumoral sem o uso de técnicas sensíveis (Buono et al., 2019).

Os kits de extração de ctDNA, como os que utilizam esferas magnéticas ou fibras de vidro, são otimizados para recuperar fragmentos tumorais circulantes. Sua eficácia varia conforme o método empregado. Kits como o QIAamp são amplamente utilizados na pesquisa clínica (Kim & Park, 2023).

A detecção do ctDNA requer técnicas altamente sensíveis devido à sua baixa concentração em comparação com o DNA das células normais. Os métodos podem ser direcionados (targeted) ou não direcionados (non-targeted) (Kim & Park, 2023).

Heterogeneidade das práticas : Elementos essenciais como o volume de sangue colhido, o tempo até o processamento ou os protocolos de centrifugação variam amplamente entre os protocolos laboratoriais . Além disso, essas informações muitas vezes estão ausentes nos relatórios, refletindo a falta de protocolos padronizados. Isso representa um

grande desafio para a implementação generalizada dos testes de ctDNA na prática clínica (Kim & Park, 2023).

2.2.2.2. ctDNA como reflexo da atividade tumoral

O ctDNA é composto por fragmentos de DNA provenientes das células tumorais, libertados na circulação principalmente durante a apoptose ou a necrose. Tem uma meia-vida curta, que varia de alguns minutos até cerca de 2,5 horas, torna-o um indicador dinâmico da atividade tumoral. O acompanhamento dos seus níveis ao longo do tempo permite uma monitorização em tempo real da doença (Ma et al., 2024).

Uma diminuição nos níveis de ctDNA está geralmente associada a uma boa resposta ao tratamento, enquanto um aumento pode indicar a progressão do tumor ou uma recidiva. Em alguns casos, as variações no ctDNA antecedem até mesmo os resultados dos exames de imagem. O ctDNA também permite identificar o surgimento de mutações associadas à resistência terapêutica, o que pode orientar as decisões clínicas e o ajuste dos tratamentos (Nikanjam et al., 2022).

Em resumo, o ctDNA oferece uma janela biológica em tempo real sobre a dinâmica tumoral, permitindo aprimorar a monitorização, prever recidivas e orientar estratégias terapêuticas adaptativas e individualizadas.

2.2.2.3. ctDNA como indicador da carga tumoral

A concentração de ctDNA no sangue reflete em grande parte a carga tumoral, ou seja, a quantidade de células cancerígenas no organismo. Uma carga tumoral elevada está geralmente associada a uma maior liberação de ctDNA. Diversos estudos demonstraram uma correlação entre os níveis de ctDNA e o estágio da doença (Ma et al., 2024).

O ctDNA é particularmente útil para detectar a doença residual mínima (MRD) após um tratamento curativo, como a cirurgia ou a quimioterapia. Sua presença indica a persistência de células tumorais e um risco aumentado de recidiva, frequentemente vários meses antes que a recidiva seja visível por exames de imagem. Assim, ele

constitui uma ferramenta relevante para avaliar o risco, ajustar os tratamentos adjuvantes e detectar precocemente as recidivas. Embora os mecanismos de liberação do ctDNA ainda não estejam totalmente esclarecidos, sua análise, isoladamente ou em combinação com outros biomarcadores como as CTCs (células tumorais circulantes), oferece uma visão mais completa da evolução da doença (Yin et al., 2025).

Assim, embora o ctDNA não reflita perfeitamente a massa tumoral, a sua quantificação fornece informações complementares valiosas sobre o volume, a agressividade e a presença de doença residual após o tratamento. Trata-se de uma ferramenta central numa abordagem de monitorização personalizada e dinâmica da doença oncológica.

2.2.3. Técnicas avançadas de deteção do ctDNA

As técnicas de deteção do ctDNA dividem-se em três grandes categorias principais : os métodos baseados nos nanomaterias, os métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) e os métodos de sequenciação genómica. Cada abordagem apresenta vantagens e limitações específicas, dependendo do contexto clínico e do objetivo da análise (Figura 4) (Wang et al., 2021).

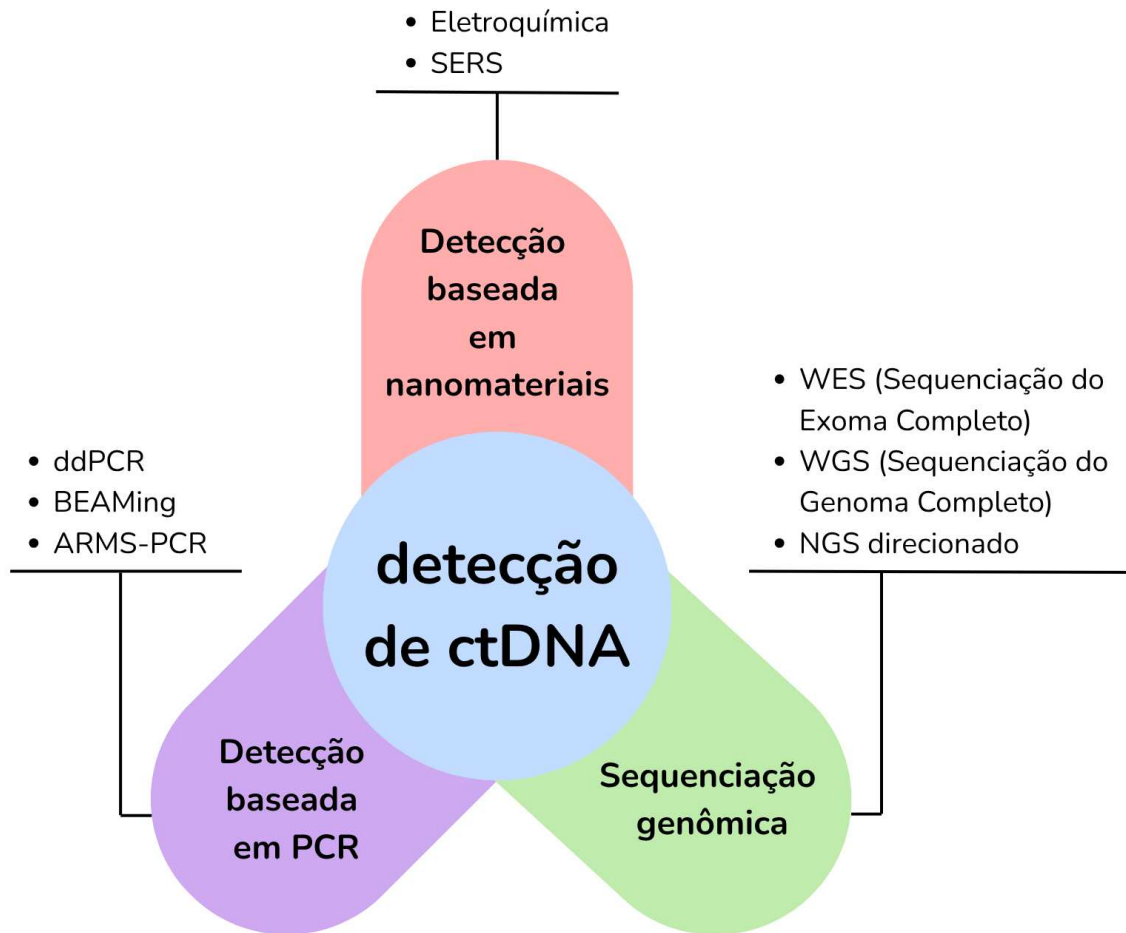


Figura 4 - Os métodos de detecção do ctDNA (adaptado de (Wang et al., 2021))

2.2.3.1. Detecção baseada em nanomateriais

Os biossensores eletroquímicos de DNA são dispositivos capazes de converter as interações entre o DNA alvo e sondas específicas em sinais eletrônicos mensuráveis. Geralmente, eles se baseiam em dois componentes principais fixados à superfície de um eletrodo: uma sonda de captura, que reconhece especificamente a sequência do DNA alvo, e uma sonda de sinal, que contém marcadores eletroquímicos responsáveis pela geração do sinal (Wang et al., 2021).

Um exemplo concreto de aplicação é uma plataforma de detecção de biomarcadores duplos, que combina apoferritina com fosfato de chumbo (LPA) e nanopartículas de ouro acopladas a sondas PNA. Este dispositivo permite detetar simultaneamente mutações tumorais e a metilação do gene *PIK3CA*. Revelou-se particularmente promissor na detecção de ctDNA no soro de pacientes, graças à sua elevada sensibilidade

e especificidade, ideais para uma abordagem de medicina personalizada (Wang et al., 2021).

Em termos de avaliação, esses biossensores apresentam vantagens significativas, especialmente a elevada especificidade. No entanto, ainda existem algumas limitações, como o alto custo dos materiais utilizados e a complexidade dos procedimentos necessários para a sua implementação (Wang et al., 2021).

A difusão Raman intensificada por superfície (SERS) é uma técnica espectroscópica poderosa que permite obter uma verdadeira "impressão digital" das moléculas, por meio da análise da luz por elas difundida.

A SERS baseia-se em um fenômeno óptico no qual o sinal Raman de um analito é fortemente amplificado quando este é adsorvido em uma superfície metálica nanostruturada e irradiado com luz. Essa amplificação ocorre por dois mecanismos principais :

- A melhoria eletromagnética, relacionada à excitação das ressonâncias plasmónicas na superfície das nanoestruturas metálicas, que intensifica o campo eletromagnético local.
- A melhoria química, que envolve uma transferência de carga entre as moléculas-alvo e o metal, aumentando a intensidade do sinal.

Sendo um método rápido, não destrutivo e sem contato, a SERS destaca-se pela sua eficácia na detecção de diversas substâncias bioquímicas. Apesar da sua sensibilidade excepcional, a aplicação da SERS ainda enfrenta limitações devido à complexidade dos ambientes biológicos, que pode interferir na análise (Wang et al., 2021).

Os métodos de detecção baseados em nanomateriais, sejam eletroquímicos ou baseados em SERS, apresentam um grande potencial para a análise do ctDNA, graças à sua elevada sensibilidade e especificidade. Assim, abrem novas perspectivas para o diagnóstico e o acompanhamento do cancro.

2.2.3.2. Detecção baseados na PCR

Os métodos baseados na PCR são amplamente utilizados para a deteção do ctDNA, devido à sua elevada sensibilidade e à capacidade de identificar mutações conhecidas. Revelam-se particularmente eficazes na deteção de alterações genéticas específicas, mesmo em concentrações muito baixas no sangue, tornando-se ferramentas valiosas para o diagnóstico precoce, o acompanhamento da evolução da doença e a deteção da doença residual mínima (MRD) (Peng et al., 2021).

A PCR digital em gotículas (ddPCR) é um método de quantificação absoluta de ácidos nucleicos, baseado em uma PCR de molécula única. O processo consiste na divisão da mistura reacional em dezenas ou até centenas de milhares de microgotículas, em uma emulsão água-em-óleo. As moléculas de DNA são distribuídas aleatoriamente entre essas gotículas e, após a amplificação por PCR, apenas aquelas que contêm DNA alvo emitem um sinal fluorescente.

Cada gotícula é analisada individualmente. As que apresentam fluorescência são consideradas positivas (1), enquanto as demais são negativas (0). A quantidade inicial de moléculas é então calculada com base em um modelo estatístico fundamentado na distribuição de Poisson (Wang et al., 2021).

A ddPCR destaca-se pela sua elevada sensibilidade, rapidez (resultados em menos de 72 horas) e baixo custo. Apresenta uma boa tolerância a inibidores, o que a torna fiável mesmo em amostras complexas.

No entanto, está limitada à deteção de variantes conhecidas e possui uma capacidade de multiplexação reduzida em comparação com outras metodologias (Peng et al., 2021).

A tecnologia BEAMing (bolas, emulsão, amplificação e magnetismo) baseia-se na ligação específica de cada tipo de molécula de DNA a microesferas magnéticas, permitindo distinguir as sequências por citometria de fluxo, com marcação fluorescente. Neste sistema, o produto da PCR gerado em cada gotícula de emulsão permanece ligado às esferas até ao final da reação, o que facilita a separação e purificação por meio magnético.

Este método apresenta uma elevada sensibilidade na deteção de mutações raras do DNA tumoral circulante e constitui uma ferramenta fiável para a análise de variações

genéticas. Além disso, não exige equipamentos especializados, apenas um agitador magnético, um circulador de temperatura e um citómetro de fluxo, que são amplamente disponíveis em laboratórios.

No entanto, a BEAMing só permite a deteção de mutações conhecidas, e o seu uso continua a ser caro e tecnicamente complexo (Wang et al., 2021).

A PCR ARMS (Amplification Refractory Mutation System-PCR) baseia-se numa característica particular da DNA polimerase, que não possui atividade exonuclease 3'→5'. Isso significa que o primer deve ser perfeitamente complementar ao DNA alvo na extremidade 3' para que a amplificação ocorra. Dessa forma, é possível desenhar primers específicos para detetar mutações conhecidas. Em condições ideais, apenas os primers mutantes ligam-se ao DNA tumoral circulante (ctDNA) e geram um sinal fluorescente, enquanto o DNA do tipo selvagem, devido ao desajuste na extremidade 3', não é amplificado. Para reduzir falsos positivos, podem ser adicionadas bases desajustadas adicionais próximas à extremidade 3'.

Este método é simples de executar, baixo custo e exige poucos equipamentos especializados. A sua sensibilidade pode atingir 1% na deteção de mutações.

No entanto, a ARMS-PCR é limitada à deteção de mutações conhecidas e apresenta uma taxa elevada de falsos positivos, o que reduz sua eficácia para identificar mutações em concentrações muito baixas (<0,1%). Além disso, requer uma otimização rigorosa das condições experimentais, como a seleção dos primers, concentrações dos reagentes e temperatura de hibridação. Por fim, a complexidade das amostras clínicas, como o plasma, pode interferir na eficiência da amplificação e comprometer os resultados (Wang et al., 2021).

Estas técnicas são rápidas, acessíveis e muito sensíveis, mas estão limitadas à análise de mutações específicas conhecidas.

2.2.3.3. Sequenciação genómica

A sequenciação genómica desempenha um papel fundamental na análise do ctDNA, especialmente graças aos avanços das tecnologias de sequenciação de alta capacidade, conhecidas como sequenciação de nova geração (NGS). Essas abordagens transformaram profundamente o diagnóstico e o acompanhamento do cancro ao oferecerem uma análise não invasiva e detalhada do perfil genético tumoral (Peng et al., 2021).

O WGS (sequenciação do genoma inteiro) analisa toda a sequência genómica, fornecendo informações abrangentes sobre mutações somáticas, variações no número de cópias, reordenamentos estruturais, bem como SNPs e Indels. Trata-se de uma abordagem não direcionada, ideal para identificar alterações desconhecidas sem necessidade de personalização prévia

No entanto, o custo elevado, a profundidade limitada de sequenciação e a complexidade da análise bioinformática limitam sua aplicação rotineira. Apesar dessas restrições, o WGS demonstrou sua utilidade em vários contextos clínicos, como na deteção de ctDNA em sarcomas, tumores pediátricos e hemopatias malignas em estágio inicial (Chan et al., 2021; Wang et al., 2021).

O WES (sequenciação do exoma completo) foca exclusivamente nas regiões codificantes do genoma (os exões), permitindo identificar de forma eficaz mutações somáticas ativadoras, com alta cobertura e uma análise mais rápida do que o WGS. Por isso, é particularmente adequado à procura de mutações específicas com fins diagnósticos.

No entanto, não analisa as regiões não codificantes, as variações estruturais nem os elementos reguladores, o que limita o seu alcance. Além disso, sua sensibilidade pode ser reduzida quando a concentração de ctDNA é baixa.

No caso do cancro da mama, o WES tem sido utilizado para identificar mutações associadas à doença residual mínima (MRD), mesmo antes do reaparecimento clínico da doença (Peng et al., 2021; Wang et al., 2021).

O NGS direcionado concentra-se em genes ou regiões específicas do genoma, permitindo uma sequenciação mais profunda e precisa, com custo reduzido. É

especialmente indicado para a análise de um grande número de amostras e pode ser otimizado por técnicas como o uso de identificadores moleculares únicos e estratégias de correção de erros, que aumentam a precisão dos resultados (Chan et al., 2021; Peng et al., 2021).

O NGS, nas suas diferentes modalidades (WGS, WES e direcionado), representa uma ferramenta poderosa e promissora na gestão personalizada do cancro, ao permitir uma compreensão mais aprofundada da heterogeneidade tumoral, o acompanhamento da resposta ao tratamento e a deteção precoce de recidivas.

2.2.3. Aplicação como biomarcador no diagnóstico precoce, monitorização do tratamento e deteção de recidivas

2.2.3.1. Diagnóstico precoce

O diagnóstico precoce do cancro da mama constitui um desafio crucial para melhorar a sobrevivência global e otimizar a abordagem terapêutica. Neste contexto, o DNA tumoral circulante (ctDNA), proveniente da degradação celular por apoptose ou necrose, revela-se um biomarcador promissor detetável através de biópsia líquida, um método não invasivo. Graças à sua curta meia-vida, o ctDNA permite uma avaliação dinâmica e em tempo real das alterações tumorais, oferecendo assim a possibilidade de detetar modificações moleculares muito antes do aparecimento de sintomas clínicos ou da evidência de lesões na imagiologia (Dao et al., 2023; Panet et al., 2024).

Em comparação com as técnicas tradicionais, como a mamografia ou a ecografia, a biópsia líquida apresenta vantagens significativas: acessibilidade, ausência de morbilidade, possibilidade de repetição e capacidade de refletir a heterogeneidade tumoral (Alix-Panabières & Pantel, 2016; Panet et al., 2024).

O ctDNA distingue-se pela sua capacidade de detetar certas alterações específicas, como as mutações nos genes *PIK3CA* e *ESR1*, particularmente relevantes no cancro da mama. O gene *ESR1* codifica o recetor dos estrogénios (ER), uma proteína-chave na progressão e no tratamento do cancro da mama. As mutações neste gene podem ativar o recetor de

forma constitutiva, conferindo resistência adquirida às terapias hormonais, nomeadamente aos inibidores da aromatase, e estão associadas a um pior prognóstico. Já o gene *PIK3CA*, frequentemente mutado no cancro da mama primário e metastático, está envolvido na via PI3K/AKT/mTOR, crucial para a proliferação celular. Estas mutações são consideradas acionáveis e podem orientar o uso de terapias específicas, como os inibidores de PI3K- α , demonstrando assim o valor do ctDNA na monitorização molecular e na personalização do tratamento (Agostinetto & Ignatiadis, 2023; Dustin et al., 2019).

Para além do seu potencial no rastreio precoce, o ctDNA permite igualmente o acompanhamento terapêutico da doença. A sua capacidade de refletir em tempo real a evolução da carga tumoral torna-o uma ferramenta pertinente para avaliar a eficácia dos tratamentos.

2.2.3.2. Monitorização da resposta ao tratamento

A análise do ctDNA representa uma abordagem promissora para monitorizar em tempo real a resposta ao tratamento no cancro da mama. Este DNA é libertado na circulação principalmente através de processos de apoptose e necrose das células tumorais, e a sua concentração está fortemente associada à carga tumoral. Assim, níveis elevados de ctDNA são geralmente indicativos de maior volume tumoral e prognóstico desfavorável (Moding et al., 2021).

Sendo a biópsia líquida, por via de uma simples colheita sanguínea, permite um acompanhamento mais frequente, menos invasivo e mais representativo da carga tumoral global, graças à sua curta meia-vida no sangue (Alix-Panabières & Pantel, 2016).

Esta antecipação na deteção da resposta (ou resistência) ao tratamento poderá, no futuro, permitir ajustes terapêuticos mais precoces e personalizados, desde que acompanhada pela padronização das técnicas analíticas e validação de limiares clínicos (Moding et al., 2021).

2.2.3.3. Detecção precoce de recidivas

A recidiva continua a ser uma ameaça constante, mesmo após uma resposta inicial completa. O ctDNA enquanto ferramenta de monitorização pós-tratamento, permite a detecção de doença residual molecular (MRD) muito antes do aparecimento de sinais clínicos ou radiológicos. Estudos recentes demonstram que o ctDNA pode anteceder as recidivas em vários meses, oferecendo assim um tempo de alerta significativo em comparação com biomarcadores clássicos como o CA 15-3 (Chan et al., 2021; Panet et al., 2024).

Este potencial preditivo do ctDNA confere-lhe um papel crescente na avaliação do risco de recidiva. A sua detecção após o tratamento, nomeadamente após quimioterapia neoadjuvante ou cirurgia, está associada a um prognóstico mais desfavorável. A presença de ctDNA detetável após a terapêutica curativa tem-se revelado fortemente correlacionada com a ocorrência de recidivas futuras, frequentemente detetadas vários meses antes de quaisquer alterações clínicas ou imagiológicas evidentes (Chan et al., 2021; Panet et al., 2024).

No entanto, a integração do ctDNA na prática clínica de rotina exige ainda validações prospetivas que comprovem um benefício real em termos de sobrevivência. Embora alguns testes já estejam a ser utilizados em contextos limitados, nomeadamente nos Estados Unidos, o acesso generalizado a ferramentas padronizadas depende ainda de mais estudos (Kiavue & Cabel, 2025).

2.3. O ctDNA na resistência aos tratamentos, previsão nos casos de recidiva e na personalização dos tratamentos , uma integração na prática clínica do cancro da mama

2.3.3. Detecção precoce da doença residual mínima (MRD)

A vigilância e monitorização do cancro de mama baseia-se historicamente em exames de imagem e biópsias de tecido, embora estes forneçam apenas uma visão parcial da doença. No entanto, o aparecimento do ctDNA, especialmente no contexto da detecção da doença residual mínima (MRD), representa um avanço significativo na área (Sabit et al., 2025).

Definição da Doença Residual Mínima (MRD).

Após um tratamento curativo, podem permanecer no organismo quantidades muito reduzidas de células cancerígenas ou de material genético tumoral. Este fenómeno, conhecido como doença residual mínima (MRD), muitas vezes não é detetado pelos exames clássicos, como a imagiologia médica. Identificar precocemente esta MRD é essencial, pois pode permitir uma intervenção antes de uma recidiva, com uma adaptação mais direccionada dos tratamentos (Moding et al., 2021; Peng et al., 2021).

Papel do ctDNA na detecção ultra precoce da MRD

Devido à sua curta meia-vida, o ctDNA fornece informações em tempo real sobre a evolução tumoral, o que o torna um biomarcador valioso para o acompanhamento da progressão do cancro e da resposta ao tratamento (Bittla et al., 2023).

A análise do ctDNA permite detetar a MRD ainda presente após um tratamento. Esta abordagem oferece uma oportunidade valiosa de intervir antes que uma recidiva seja visível por métodos clássicos, como a imagiologia. Assim, permite identificar sinais que seriam invisíveis por outras vias e adaptar os tratamentos de forma rápida (Moding et al., 2021; Sabit et al., 2025).

Estudos de validação e risco de recidiva

Vários estudos demonstraram uma forte correlação entre a detecção de ctDNA após o tratamento e um risco aumentado de recidiva, assim como piores desfechos em termos de sobrevivência.

- Em pacientes com cancro de mama triplo negativo (TNBC) em estadios precoces, uma meta-análise recente revelou que a presença de DNA tumoral circulante (ctDNA) após a quimioterapia neoadjuvante (pré ou pós-cirúrgica) estava fortemente associada a um risco aumentado de recidiva (HR 4,12; IC 95% 2,81–6,04), assim como a uma redução da sobrevivência global (HR 3,26; IC 95% 1,88–5,63). O HR (*hazard ratio*) representa o risco relativo de ocorrência de um evento (como recidiva ou morte) ao longo do tempo, e valores acima de 1 indicam pior prognóstico. Já o IC 95% (*intervalo de confiança de 95%*) indica a margem de confiança estatística em torno do valor do HR, refletindo a precisão da estimativa. Observações semelhantes foram feitas em detecções de ctDNA durante ou após a quimioterapia adjuvante, confirmando o seu valor como marcador prognóstico desfavorável (Zhang et al., 2025).
- A presença persistente de ctDNA após o tratamento neoadjuvante também está associada a uma menor probabilidade de alcançar uma resposta patológica completa (pCR). A pCR (*resposta patológica completa*) corresponde à ausência total de células tumorais detectáveis no tecido mamário e nos gânglios linfáticos após o tratamento, sendo considerada um forte indicador de bom prognóstico. Por exemplo, as pacientes com ctDNA positivo durante o tratamento têm menos hipóteses de atingir uma pCR (odds ratio – OR = 0,16), o que significa que apresentam 84% menos probabilidade de obter uma resposta completa em comparação com as pacientes ctDNA-negativas. De forma semelhante, aquelas em que o ctDNA permanece detectável após o tratamento também têm uma probabilidade reduzida de alcançar uma pCR (OR = 0,22). Por outro lado, a eliminação do ctDNA após o tratamento está correlacionada com uma melhor sobrevivência (Zhang et al., 2025).

- Mesmo em pacientes com doença residual após a quimioterapia neoadjuvante, a positividade do ctDNA está associada a uma menor sobrevivência livre de recidiva à distância, acrescentando informações prognósticas relevantes para além da avaliação tradicional da carga tumoral residual (RCB) (Zhang et al., 2025).

Comparação com os métodos tradicionais

A abordagem tradicional na gestão do cancro de mama tem sido limitada pelas biópsias de tecido e pela imagiologia, que oferecem uma visão pontual da doença. O ctDNA, por outro lado, oferece uma abordagem não invasiva e dinâmica para monitorizar o cancro. Ao contrário dos métodos de imagiologia tradicionais, que podem não detetar quantidades muito reduzidas de células cancerígenas restantes após o tratamento, a análise do DNA tumoral circulante (ctDNA) permite evidenciar esses vestígios moleculares residuais. Pesquisas demonstraram que essa deteção por ctDNA pode anteceder em vários meses o reaparecimento clínico ou radiológico de uma recidiva, oferecendo assim uma vantagem em termos de monitorização e antecipação.

Além disso, em comparação com biomarcadores proteicos mais clássicos como o CA 15-3, o ctDNA fornece informações mais precisas, com melhor concordância com a carga tumoral, o estágio da doença e a resposta terapêutica.

Apresenta também a capacidade única de revelar a heterogeneidade genética do tumor e aparecimento de mutações de resistência, por vezes muito antes de serem visíveis nas avaliações radiográficas habituais. A elevada sensibilidade dos testes de ctDNA (atingindo quase 100% em casos de recidiva metastática) permite uma deteção precoce das recidivas (Bittla et al., 2023; Moding et al., 2021; Sabit et al., 2025).

O ctDNA impôs-se como uma ferramenta indispensável para a deteção ultra precoce da MRD, oferecendo vantagens significativas em relação às abordagens tradicionais e abrindo novas perspetivas para a personalização do tratamento do cancro de mama.

2.3.4. Detecção do risco de recidiva e emergência de resistências : papel central do DNA tumoral circulante

O ctDNA permite a detecção precoce da doença residual mínima (MRD) e a antecipação do risco de recidiva, assim como a identificação do aparecimento de resistências aos tratamentos.

2.3.4.1. Marcadores preditivos e mutações associadas à recidiva

Este método facilita o diagnóstico, a avaliação prognóstica e o acompanhamento terapêutico. Ao identificar mutações genéticas específicas, permite adaptar os tratamentos às características moleculares próprias de cada paciente. O ctDNA contribui igualmente para identificar potenciais alvos terapêuticos, abrindo assim caminho para uma medicina de precisão mais eficaz (Sabit et al., 2025).

TP53: As alterações são frequentes neste gene , nos cancros da mama triplo negativos (TNBC) e estão correlacionadas com uma sobrevivência global mais curta (HR = 1,58; IC 95%: 1,34–1,81), segundo uma meta-análise (Riva et al., 2020). Após a quimioterapia neoadjuvante, a positividade do ctDNA para TP53 constitui um marcador de mau prognóstico (Zavarykina et al., 2023).

PIK3CA: Muito frequentes nos tumores luminais A ($\approx 45\%$), As mutações neste gene estão associadas a uma proliferação aumentada através da via PI3K-AKT-mTOR. Alguns estudos relacionam-nas a uma sobrevivência livre de recidiva mais baixa (Sabit et al., 2025), embora uma meta-análise tenha mostrado resultados contrastantes (Zhang et al., 2025).

ESR1: Surgidas durante a hormonoterapia, as mutações neste gene indicam resistência aos inibidores da aromatase. A sua detecção no ctDNA está correlacionada com uma sobrevivência livre de progressão reduzida (Zavarykina et al., 2023).

Esta abordagem revela-se particularmente útil em pacientes de alto risco, jovens ou com formas agressivas da doença, permitindo considerar tratamentos mais direcionados ou uma vigilância mais intensiva (Peng et al., 2021).

2.3.4.2. ctDNA como ferramenta de detecção precoce da resistência adquirida

Uma das principais contribuições do ctDNA é a sua capacidade de revelar mutações adquiridas em resposta à pressão terapêutica.

ESR1: No ensaio PADA1 (NCT03079011), uma mudança de tratamento baseada na detecção plasmática de ESR1 permitiu uma melhoria significativa na sobrevivência livre de progressão (11,9 meses versus 5,7 meses), confirmando o seu papel como marcador dinâmico de resistência (Kiavue & Cabel, 2025).

PIK3CA: O acompanhamento da fração alélica mutada (MAF) permite antecipar a resposta ao tratamento. Uma diminuição rápida da taxa de mutação após 15 dias de tratamento no estudo PALOMA-3 esteve fortemente correlacionada com a sobrevivência livre de progressão (PFS) (Araujo et al., 2019).

HER2: O ctDNA permitiu observar ampliações ou mutações em HER2 em pacientes inicialmente HER2-negativas, sugerindo um benefício potencial de um tratamento anti-HER2 em fases posteriores (Chan et al., 2021).

Estes exemplos realçam a importância do perfil genético dinâmico do tumor para além dos testes iniciais, ao detetar em tempo real os mecanismos de evasão terapêutica.

2.3.4.3. Adaptações terapêuticas orientadas pelo perfil mutacional

Atualmente, o ctDNA orienta algumas decisões terapêuticas em contextos validados, e numerosos estudos estão a explorar modelos adaptativos.

ESR1: Os ensaios PADA1 e SERENA-6 exploram a adaptação hormonal precoce à detecção de mutações *ESR1*, com resultados promissores em termos de sobrevivência livre de progressão (PFS).

PIK3CA: O ensaio SOLAR-1 levou à aprovação do alpelisibe para pacientes com mutação *PIK3CA* detetada por ctDNA, validada pela FDA.

Mutações raras: O estudo plasma MATCH demonstrou que mutações como *AKT1*, *HER2* ou *PTEN* podem orientar tratamentos dirigidos, com respostas objetivas.

BRCA1/2: O teste FoundationOne Liquid CDx está validado para orientar o tratamento com inibidores de PARP (olaparib, rucaparib) em casos de mutações BRCA detetadas no ctDNA (Chan et al., 2021; Kiavue & Cabel, 2025; Kim & Park, 2023).

Vários ensaios clínicos estão a avaliar a adaptação terapêutica precoce com base na detecção positiva de ctDNA (MONDRIN, DARE), com o objetivo de evitar recidivas através de uma resposta proativa (Kiavue & Cabel, 2025).

2.3.5. Mutações emergentes e resistência

O ctDNA é uma ferramenta poderosa na medicina de precisão, pois permite revelar informações em tempo real sobre a evolução do perfil genómico de um tumor. O ctDNA é libertado a partir de múltiplas regiões tumorais, refletindo assim a heterogeneidade intra-tumoral e a evolução clonal. Isso possibilita a detecção de alterações genéticas adquiridas e o decifrar dos mecanismos de resistência aos tratamentos (Buono et al., 2019).

Principais mutações associadas à resistência terapêutica

ESR1: Mutações ativadoras neste gene podem surgir sob pressão dos inibidores da aromatase. A sua detecção precoce no plasma permite antecipar a resistência hormonal e adaptar a terapêutica antes da progressão radiológica. Ensaios clínicos como o PADA-1 e o SERENA-6 demonstraram o benefício clínico da mudança para fulvestrant ou novos SERD em doentes com mutação *ESR1* identificada por ctDNA (Agostinetto & Ignatiadis, 2023; Chan et al., 2021).

PIK3CA : As mutações neste gene ativam a via PI3K/AKT/mTOR, estando associadas à resistência hormonal. A sua presença no ctDNA permite selecionar terapias dirigidas como o alpelisibe, aprovado após os resultados do ensaio SOLAR-1. A dinâmica da fração alélica mutada (MAF) pode ser utilizada como biomarcador de resposta precoce ao tratamento (Chan et al., 2021).

HER2 : Alterações no gene HER2 podem surgir ao longo da evolução da doença, mesmo em tumores inicialmente classificados como HER2-negativos. A reaparição ou

amplificação de HER2 no ctDNA após progressão sugere resistência adquirida e pode justificar uma nova linha de terapêutica dirigida anti-HER2.

Adaptação terapêutica baseada no ctDNA

A detecção precoce de mutações emergentes através do ctDNA permite uma adaptação proativa da terapêutica, muitas vezes antes que a progressão tumoral seja visível na imagiologia. Esta abordagem tem demonstrado:

- Aumento da sobrevivência livre de progressão quando se muda o tratamento com base em mutações como *ESR1*;
- Seleção eficaz de inibidores de PI3K em função da mutação *PIK3CA*;
- Identificação de novas alterações genéticas em pacientes com resistência aos inibidores de CDK4/6 (Agostinetti & Ignatiadis, 2023; Chan et al., 2021).

A monitorização do perfil genómico tumoral via ctDNA oferece uma visão dinâmica da evolução tumoral. A identificação de mutações emergentes permite antecipar resistências adquiridas e personalizar o tratamento de forma mais eficaz, integrando-se cada vez mais na prática clínica do cancro da mama metastático (Boonstra et al., 2020).

2.3.6. Medicina personalizada : adaptação terapêutica orientada pelo perfil mutacional do ctDNA, uma integração na prática clínica do cancro de mama

O aparecimento do ctDNA como biomarcador dinâmico e não invasivo abre novas perspectivas para uma oncologia personalizada. Ao refletir a heterogeneidade genómica dos tumores e sua evolução sob pressão terapêutica, o ctDNA permite adaptar os tratamentos em tempo real, de acordo com as mutações emergentes ou persistentes (Freitas et al., 2022).

Várias mutações acionáveis, como *ESR1*, *PIK3CA*, *HER2*, *AKT1* e *BRCA1/2*, já demonstraram o seu valor na orientação terapêutica, com base em ensaios clínicos como o PADA-1, SOLAR-1 ou plasmaMATCH. Estes estudos permitiram ajustar precocemente os tratamentos hormonais ou direcionados, melhorando a sobrevivência livre de progressão das pacientes (Sant et al., 2022; Xu et al., 2024).

Além disso, a detecção ultra precoce da doença residual mínima (MRD) através do ctDNA oferece uma oportunidade única de prevenir recidivas antes de qualquer sinal clínico ou radiológico. Isso justifica a sua integração crescente nos algoritmos de vigilância pós-tratamento e nos ensaios clínicos de desintensificação ou intensificação terapêutica (Araujo et al., 2019).

Por fim, embora a biópsia tecidual continue a ser indispensável no diagnóstico inicial, a sua utilização conjunta com a biópsia líquida permite um acompanhamento longitudinal, não invasivo e mais representativo da carga tumoral global. A integração do ctDNA na prática clínica baseia-se agora na padronização dos protocolos, na validação de limiares clínicos e no reconhecimento nas diretrizes internacionais. Assim, o ctDNA posiciona-se no centro de uma estratégia de medicina de precisão, tornando possível um acompanhamento reativo, personalizado e centrado na biologia real da doença, com um enorme potencial para transformar o percurso terapêutico das pacientes com cancro da mama (Addanki et al., 2022; Ho et al., 2024; Merker et al., 2018).

2.4. Limitações, desafios e perspectivas futuras do DNA tumoral circulante no cancro de mama

A utilização do DNA tumoral circulante (ctDNA) na oncologia representa um avanço significativo no diagnóstico, monitoramento terapêutico e medicina personalizada. No entanto, apesar de seus inúmeros benefícios, sua aplicação rotineira no cancro de mama ainda enfrenta diversas limitações e desafios técnicos, biológicos e organizacionais. Esta seção analisa em detalhes esses obstáculos, bem como as perspectivas futuras que podem favorecer a integração plena do ctDNA no cuidado das pacientes com cancro de mama.

2.4.3. Limitações atuais do ctDNA

Uma das principais limitações do ctDNA é sua baixa concentração, especialmente nas fases iniciais do cancro de mama ou após o tratamento. Nessas situações, o ctDNA pode representar menos de 0,01% do DNA livre circulante total, o que dificulta sua detecção mesmo com tecnologias de alta sensibilidade. Essa limitação é particularmente

relevante na detecção da doença residual mínima (MRD), onde um resultado falso negativo pode levar à subestimação do risco de recidiva (Kiavue & Cabel, 2025; Panet et al., 2024).

Além disso, a presença de mutações de origem não tumoral, como as derivadas da hematopoese clonal, pode gerar falsos positivos. Essas mutações, frequentemente localizadas em genes como *ESR1*, *BRCA* ou *TP53*, dificultam a interpretação dos resultados quando não há comparação com o perfil genómico tumoral inicial ou com o DNA de leucócitos (Kiavue & Cabel, 2025).

A isso acresce uma grande heterogeneidade técnica entre as plataformas disponíveis (PCR digital, NGS, BEAMing, etc.), que apresentam diferentes níveis de sensibilidade e especificidade. Não há, até o momento, uma padronização internacional clara quanto aos protocolos de colheita, processamento e análise bioinformática, o que dificulta a reprodutibilidade e a comparação entre estudos (Dang & Park, 2022; Schwarzenbach & Pantel, 2015).

Por fim, a curta meia-vida do ctDNA (variando de 15 minutos a algumas horas) implica que o momento da colheita sanguínea é crucial para a confiabilidade dos resultados. Essa instabilidade temporal torna difícil a interpretação de um resultado isolado e reforça a necessidade de medições seriadas, o que aumenta os custos e a complexidade do uso clínico (Panet et al., 2024).

2.4.4. Desafios para aplicação clínica

Além das limitações técnicas, há desafios estruturais que dificultam a implementação rotineira do ctDNA. O primeiro deles é o alto custo dos testes, especialmente os testes personalizados (“tumor-informed”), que exigem sequenciação prévia do tumor e desenvolvimento de um ensaio individualizado (Panet et al., 2024).

Outro desafio importante é a interpretação clínica dos resultados. Diferente da biópsia tecidual, o ctDNA reflete uma imagem dinâmica, mas não localizada, da carga tumoral. A interpretação de certas mutações pode ser complexa, principalmente quando seu valor prognóstico ou terapêutico ainda não está claramente estabelecido (Dang & Park, 2022).

Além disso, a regulamentação dos testes de ctDNA ainda está em evolução. Embora alguns testes já sejam utilizados em países como os EUA e outros países Europeus, ainda não há um consenso internacional sobre sua aplicação clínica (Stadler et al., 2022).

Por fim, destaca-se a necessidade de formação específica dos profissionais de saúde, visto que a análise e o uso clínico dos testes de ctDNA exigem colaboração multidisciplinar entre oncologistas, patologistas, biólogos moleculares e bioinformáticos.

2.4.5. Perspectivas futuras e caminhos de avanço

Apesar das limitações, as perspectivas futuras do ctDNA no cancro de mama são altamente promissoras. Os avanços tecnológicos no sequenciamento de nova geração, na bioinformática e na análise de metilação devem melhorar a sensibilidade dos testes e possibilitar a detecção de variantes tumorais em frequências alélicas muito baixas (Ma et al., 2024; Panet et al., 2024).

Abordagens combinando diferentes biomarcadores circulantes (ctDNA, RNA livre, exossomas, células tumorais circulantes) estão em desenvolvimento. Essa abordagem multimodal pode oferecer uma caracterização mais precisa do tumor e melhorar a predição de resposta terapêutica (Stadler et al., 2022).

Além disso, diversos ensaios clínicos avaliam o uso do ctDNA para ajustar os tratamentos em tempo real, como na detecção precoce de resistência ou recidiva. O estudo PADA-1, por exemplo, demonstrou que adaptar a terapia hormonal com base na detecção da mutação ESR1 antes da progressão radiológica aumentou a sobrevida livre de progressão (Kiavue & Cabel, 2025).

A longo prazo, o ctDNA poderá desempenhar um papel crucial na detecção precoce de cancro em populações assintomáticas, por meio de testes multitumorais baseados em perfis de metilação (Dang & Park, 2022).

Por fim, iniciativas como BloodPAC, CANCER-ID e o consórcio ctMoniTR procuram padronizar práticas laboratoriais, validar biomarcadores clínicos e promover a regulamentação internacional dos testes baseados em ctDNA. Esses esforços são fundamentais para a adoção segura, eficaz e equitativa da biópsia líquida na oncologia moderna (Ma et al., 2024).

3. CONCLUSÃO

O DNA tumoral circulante (ctDNA) representa uma inovação promissora no campo da oncologia, oferecendo uma abordagem não invasiva, dinâmica e altamente específica para o diagnóstico, monitorização e personalização do tratamento do cancro da mama. Ao longo desta dissertação, foi possível evidenciar o valor clínico crescente do ctDNA em várias fases da doença — desde a deteção precoce até à vigilância pós-tratamento —, com destaque para o seu papel na identificação da doença residual mínima (MRD), no acompanhamento terapêutico e na antecipação de recidivas.

Através da biópsia líquida, o ctDNA permite ultrapassar limitações associadas às técnicas convencionais, como a biópsia tecidular e os marcadores tumorais séricos. A sua capacidade de refletir a heterogeneidade tumoral e de revelar mutações emergentes sob pressão terapêutica posiciona-o como um pilar central na medicina personalizada, possibilitando decisões terapêuticas mais precoces, adaptadas e eficazes.

Contudo, a sua implementação na prática clínica enfrenta ainda desafios técnicos, económicos e regulamentares. A baixa concentração de ctDNA em fases precoces da doença, a falta de padronização dos métodos de análise e a necessidade de validação em larga escala são obstáculos a ultrapassar. A integração plena desta ferramenta na rotina clínica requer não só avanços tecnológicos, mas também uma articulação multidisciplinar entre investigadores, clínicos e entidades reguladoras.

Apesar destas limitações, as perspetivas futuras são encorajadoras. Ensaio clínicos em curso, estratégias de deteção combinada de biomarcadores e iniciativas de padronização internacional indicam que o ctDNA está no caminho de se tornar um aliado indispensável na luta contra o cancro da mama. O seu potencial para transformar o paradigma de acompanhamento oncológico é inegável, e a sua utilização crescente poderá, no futuro próximo, traduzir-se em melhores resultados clínicos, maior sobrevivência e melhor qualidade de vida para as pacientes.

Assim, o ctDNA não é apenas uma promessa, mas uma realidade em evolução, que redefine a forma como compreendemos e tratamos o cancro da mama.

4. BIBLIOGRAFIA

- Addanki, S., Meas, S., Sarli, V. N., Singh, B., & Lucci, A. (2022). Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Precision Oncology for Breast Cancers. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23147843>
- Agostinetto, E., & Ignatiadis, M. (2023). ctDNA as a predictive biomarker in advanced breast cancer: Lessons from the MONALEESA studies. In *Annals of Oncology* (Vol. 34, Issue 11, pp. 955–959). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.09.3111>
- Alemzadeh, E., Allahqoli, L., Dehghan, H., Mazidimoradi, A., Ghasempour, A., & Salehiniya, H. (2023). Circulating tumor cells and circulating tumor DNA in breast cancer diagnosis and monitoring. In *Oncology Research* (Vol. 31, Issue 5, pp. 667–675). Tech Science Press. <https://doi.org/10.32604/or.2023.028406>
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2016). Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. In *Cancer Discovery* (Vol. 6, Issue 5, pp. 479–491). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1483>
- Allison, K. H., Elizabeth, ; M, Hammond, H., Dowsett, ; Mitchell, Mckernin, S. E., Carey, L. A., Patrick, ;, Fitzgibbons, L., Daniel, ;, Hayes, F., Sunil, ;, Lakhani, R., Chavez-Macgregor, M., Perlmutter, J., Charles, ;, Perou, M., Meredith, ;, Regan, M., David, ;, ... Wolff, A. C. (2020). Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol*, 38, 1346–1366. <https://doi.org/10.1200/JCO.19>
- Araujo, D. V., Bratman, S. V., & Siu, L. L. (2019). Designing circulating tumor DNA-based interventional clinical trials in oncology. In *Genome Medicine* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0634-x>
- Banys-Paluchowski, M., Krawczyk, N., & Fehm, T. (2020). Liquid Biopsy in Breast Cancer. *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*, 80(11), 1093–1104. <https://doi.org/10.1055/a-1124-7225>
- Ben-Dror, J., Shalamov, M., & Sonnenblick, A. (2022). The History of Early Breast Cancer Treatment. In *Genes* (Vol. 13, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes13060960>
- Bittla, P., Kaur, S., Sojitra, V., Zahra, A., Hutchinson, J., Folawemi, O., & Khan, S. (2023). Exploring Circulating Tumor DNA (CtDNA) and Its Role in Early Detection of Cancer: A Systematic Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.45784>
- Boonstra, P. A., Wind, T. T., van Kruchten, M., Schuurin, E., Hospers, G. A. P., van der Wekken, A. J., de Groot, D. J., Schröder, C. P., Fehrmann, R. S. N., & Reyners, A. K. L. (2020). Clinical utility of circulating tumor DNA as a response

- and follow-up marker in cancer therapy. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 39, Issue 3, pp. 999–1013). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09876-9>
- Borri, F., & Granaglia, A. (2021). Pathology of triple negative breast cancer. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 72, pp. 136–145). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.06.005>
- Buono, G., Gerratana, L., Bulfoni, M., Provinciali, N., Basile, D., Giuliano, M., Corvaja, C., Arpino, G., Del Mastro, L., De Placido, S., De Laurentiis, M., Cristofanilli, M., & Puglisi, F. (2019). Circulating tumor DNA analysis in breast cancer: Is it ready for prime-time? In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 73, pp. 73–83). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.01.004>
- Castelli, J., Cabel, L., Bidard, F. C., Duvergé, L., & Bachet, J. B. (2018). Circulating tumour DNA: Current detection methods, use in radiotherapy and future development. In *Cancer/Radiotherapie* (Vol. 22, Issues 6–7, pp. 653–659). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2018.06.018>
- Chan, J. C. H., Chow, J. C. H., Ho, C. H. M., Tsui, T. Y. M., & Cho, W. C. (2021). Clinical application of circulating tumor DNA in breast cancer. In *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* (Vol. 147, Issue 5, pp. 1431–1442). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03588-5>
- Costa, J. L., & Schmitt, F. C. (2019). Liquid Biopsy: A New Tool in Oncology. In *Acta Cytologica* (Vol. 63, Issue 6, p. 448). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000501355>
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping. In *Journal of Cancer* (Vol. 8, Issue 16, pp. 3131–3141). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>
- Dang, D. K., & Park, B. H. (2022). Circulating tumor DNA: current challenges for clinical utility. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 132, Issue 12). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI154941>
- Dao, J., Conway, P. J., Subramani, B., Meyyappan, D., Russell, S., & Mahadevan, D. (2023). Using cfDNA and ctDNA as Oncologic Markers: A Path to Clinical Validation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 17). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms241713219>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. In *Cell Biology International* (Vol. 43, Issue 6, pp. 582–592). Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Dustin, D., Gu, G., & Fuqua, S. A. W. (2019). ESR1 mutations in breast cancer. In *Cancer* (Vol. 125, Issue 21, pp. 3714–3728). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cncr.32345>

- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. In *Genes and Diseases* (Vol. 5, Issue 2, pp. 77–106). Chongqing University. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>
- Freitas, A. J. A. de, Causin, R. L., Varuzza, M. B., Calfa, S., Hidalgo Filho, C. M. T., Komoto, T. T., Souza, C. de P., & Marques, M. M. C. (2022). Liquid Biopsy as a Tool for the Diagnosis, Treatment, and Monitoring of Breast Cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23179952>
- Hilton, H. N., Clarke, C. L., & Graham, J. D. (2018). Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 466, pp. 2–14). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.08.011>
- Ho, H. Y., Chung, K. S., Kan, C. M., & Wong, S. C. (2024). Liquid Biopsy in the Clinical Management of Cancers. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Issue 16). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25168594>
- Hu, Q., Chen, L., Li, K., Liu, R., Sun, L., & Han, T. (2023). Circulating tumor DNA: Current implementation issues and future challenges for clinical utility. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-1157>
- Hu, Z., Chen, H., Long, Y., Li, P., & Gu, Y. (2021). The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 157). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103166>
- Katsura, C., Ogunmwonyi, I., Kankam, H. K. N., & Saha, S. (2022). Breast cancer: Presentation, investigation and management. *British Journal of Hospital Medicine*, 83(2). <https://doi.org/10.12968/hmed.2021.0459>
- Kiavue, N., & Cabel, L. (2025). Benefits and limitations of circulating tumor DNA in breast cancer. In *Bulletin du Cancer*. John Libbey. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2024.12.016>
- Kim, H., & Park, K. U. (2023). Clinical Circulating Tumor DNA Testing for Precision Oncology. In *Cancer Research and Treatment* (Vol. 55, Issue 2, pp. 351–366). Korean Cancer Association. <https://doi.org/10.4143/crt.2022.1026>
- Li, W., Huang, X., Patel, R., Schleifman, E., Fu, S., Shames, D. S., & Zhang, J. (2024). Analytical evaluation of circulating tumor DNA sequencing assays. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54361-w>

- Licata, L., Mariani, M., Rossari, F., Viale, G., Notini, G., Naldini, M. M., Bosi, C., Piras, M., Dugo, M., & Bianchini, G. (2023). Tissue- and liquid biopsy-based biomarkers for immunotherapy in breast cancer. In *Breast* (Vol. 69, pp. 330–341). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2023.03.014>
- Liu, S. C. (2024). Circulating tumor DNA in liquid biopsy: Current diagnostic limitation. *World Journal of Gastroenterology*, 30(15), 2175–2178. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i15.2175>
- Løberg, M., Lousdal, M. L., Bretthauer, M., & Kalager, M. (2015). Benefits and harms of mammography screening. In *Breast Cancer Research* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0525-z>
- Ma, L., Guo, H., Zhao, Y., Liu, Z., Wang, C., Bu, J., Sun, T., & Wei, J. (2024). Liquid biopsy in cancer current: status, challenges and future prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 336. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02021-w>
- Magbanua, M. J. M., Gumusay, O., Kurzrock, R., van 't Veer, L. J., & Rugo, H. S. (2022). Immunotherapy in Breast Cancer and the Potential Role of Liquid Biopsy. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.802579>
- Mayrovitz, H. N. (2022). *Breast Cancer*. <https://doi.org/https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer>
- Melichar, B. (2024). Circulating tumor DNA measurement: a new pillar of medical oncology? In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/cclm-2024-0986>
- Merker, J. D., Oxnard, G. R., Compton, C., Diehn, M., Hurley, P., Lazar, A. J., Lindeman, N., Lockwood, C. M., Rai, A. J., Schilsky, R. L., Tsimberidou, A. M., Vasalos, P., Billman, B. L., Oliver, T. K., Bruinooge, S. S., Hayes, D. F., & Turner, N. C. (2018). JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol*, 36, 1631–1641. <https://doi.org/10.1200/JCO>
- Mesquita, A., Costa, J. L., & Schmitt, F. (2020). Utility of circulating tumor dna in different clinical scenarios of breast cancer. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 12, pp. 1–14). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12123797>
- Moding, E. J., Nabet, B. Y., Alizadeh, A. A., & Diehn, M. (2021). Detecting Liquid Remnants of Solid Tumors: Circulating Tumor DNA Minimal Residual Disease. In *Cancer Discovery* (Vol. 11, Issue 12, pp. 2968–2986). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0634>
- National Cancer Institute. (2025, February 14). *Breast Cancer Screening (PDQ®) – Patient Version*. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-screening-pdq>

- Neves Rebello Alves, L., Dummer Meira, D., Poppe Meriguetti, L., Correia Casotti, M., do Prado Ventorim, D., Ferreira Figueiredo Almeida, J., Pereira de Sousa, V., Cindra Sant'Ana, M., Gonçalves Coutinho da Cruz, R., Santos Louro, L., Mendonça Santana, G., Erik Santos Louro, T., Evangelista Salazar, R., Ribeiro Campos da Silva, D., Stefani Siqueira Zetum, A., Silva dos Reis Trabach, R., Imbroisi Valle Errera, F., de Paula, F., de Vargas Wolfgramm dos Santos, E., ... Drumond Louro, I. (2023). Biomarkers in Breast Cancer: An Old Story with a New End. In *Genes* (Vol. 14, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/genes14071364>
- Nikanjam, M., Kato, S., & Kurzrock, R. (2022). Liquid biopsy: current technology and clinical applications. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>
- Panet, F., Papakonstantinou, A., Borrell, M., Vivancos, J., Vivancos, A., & Oliveira, M. (2024). Use of ctDNA in early breast cancer: analytical validity and clinical potential. In *npj Breast Cancer* (Vol. 10, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41523-024-00653-3>
- Peng, Y., Mei, W., Ma, K., & Zeng, C. (2021). Circulating Tumor DNA and Minimal Residual Disease (MRD) in Solid Tumors: Current Horizons and Future Perspectives. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.763790>
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., & Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*, 24, S26–S35. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.008>
- Reinhardt, K., Stückerath, K., Hartung, C., Kaufhold, S., Uleer, C., Hanf, V., Lantzsch, T., Peschel, S., John, J., Pöhler, M., Bauer, M., Bürrig, F. K., Weigert, E., Buchmann, J., Kantelhardt, E. J., Thomssen, C., & Vetter, M. (2022). PIK3CA-mutations in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 196(3), 483–493. <https://doi.org/10.1007/s10549-022-06637-w>
- Sabit, H., Attia, M. G., Mohamed, N., Taha, P. S., Ahmed, N., Osama, S., & Abdel-Ghany, S. (2025). Beyond traditional biopsies: the emerging role of ctDNA and MRD on breast cancer diagnosis and treatment. In *Discover Oncology* (Vol. 16, Issue 1). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-01940-6>
- Sant, M., Bernat-Peguera, A., Felip, E., & Margelí, M. (2022). Role of ctDNA in Breast Cancer. In *Cancers* (Vol. 14, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers14020310>
- Sanz-Garcia, E., Zhao, E., Bratman, S. V., & Siu, L. L. (2022). HEALTH AND MEDICINE Monitoring and adapting cancer treatment using circulating tumor DNA kinetics: Current research, opportunities, and challenges. In *Sci. Adv* (Vol. 8).

- Schwarzenbach, H., & Pantel, K. (2015). Circulating DNA as biomarker in breast cancer. In *Breast Cancer Research* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0645-5>
- Silwal-Pandit, L., Langerød, A., & Børresen-Dale, A. L. (2017). TP53 mutations in breast and ovarian cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026252>
- Song, J. L., Chen, C., Yuan, J. P., & Sun, S. R. (2016). Progress in the clinical detection of heterogeneity in breast cancer. In *Cancer Medicine* (Vol. 5, Issue 12, pp. 3475–3488). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/cam4.943>
- Stadler, J. C., Belloum, Y., Deitert, B., Sementsov, M., Heidrich, I., Gebhardt, C., Keller, L., & Pantel, K. (2022). Current and Future Clinical Applications of ctDNA in Immuno-Oncology. In *Cancer Research* (Vol. 82, Issue 3, pp. 349–358). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1718>
- Vlataki, K., Antonouli, S., Kalyvioti, C., Lampri, E., Kamina, S., Mauri, D., Harissis, H. V., & Magklara, A. (2023). Circulating Tumor DNA in the Management of Early-Stage Breast Cancer. In *Cells* (Vol. 12, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells12121573>
- Wang, Y. H., Song, Z., Hu, X. Y., & Wang, H. S. (2021). Circulating tumor DNA analysis for tumor diagnosis. In *Talanta* (Vol. 228). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122220>
- Wolff, A. C., Somerfield, M. R., Dowsett, M., Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Mcshane, L. M., Saphner, T. J., Spears, P. A., & Allison, K. H. (2023). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, 41(22), 3867–3872. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.02864>
- Xu, J., Gao, H., Guan, X., Meng, J., Ding, S., Long, Q., & Yi, W. (2024). Circulating tumor DNA: from discovery to clinical application in breast cancer. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1355887>
- Yang, T., Li, W., Huang, T., & Zhou, J. (2023). Genetic Testing Enhances the Precision Diagnosis and Treatment of Breast Cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 23). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms242316607>
- Yin, H., Zhang, M., Zhang, Y., Zhang, X., Zhang, X., & Zhang, B. (2025). Liquid biopsies in cancer. *Molecular Biomedicine*, 6(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s43556-025-00257-8>
- Zavarykina, T. M., Lomskova, P. K., Pronina, I. V., Khokhlova, S. V., Stenina, M. B., & Sukhikh, G. T. (2023). Circulating Tumor DNA Is a Variant of Liquid Biopsy with Predictive and Prognostic Clinical Value in Breast Cancer Patients. In

International Journal of Molecular Sciences (Vol. 24, Issue 23). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms242317073>

Zhang, D., Jahanfar, S., Rabinowitz, J. B., Dower, J., Song, F., Wu, C. H., Hu, X., Tracy, P., Basik, M., Medford, A., Lin, P. H., Huang, C. S., Bidard, F. C., Renault, S., Pai, L., Buss, M., Parsons, H. A., & Schlam, I. (2025). Role of circulating tumor DNA in early-stage triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Research*, 27(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-025-01986-y>