

RELEVÂNCIA E ANÁLISE CORRELACIONAL DE MARCADORES TUMORAIS NO CARCINOMA DA MAMA

**Mariana Moreira Pires [1,2], João Mettelo [3], João Frade [3],
Bárbara Sepedes [4], João Paulo Figueiredo [1], Ana Valado [1,5,6]**

[1] Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra (Politécnico de Coimbra), Portugal

[2] Fac. de Medicina da U. Porto, Mestrado em Metabolismo, Biopatologia e Experimentação (MMBE), Portugal

[3] Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

[4] Serviço de Anatomia Patológica, Unidade Local de Saúde de Coimbra, Portugal

[5] Laboratório de Investigação Aplicada em Saúde (LabinSaúde), Portugal

[6] Centro de Ciências do Mar e do Ambiente (MARE), Fac. de Ciências e Tecnologia, U. Coimbra, Portugal

valado@estesc.ipc.pt

RESUMO

Enquadramento: O carcinoma da mama é um tumor maligno com grande incidência no sexo feminino, apresentando em 2020 mais de 2 milhões de novos casos a nível mundial e constituindo a segunda causa de morte associada ao cancro. A investigação de novos marcadores de prognóstico, visa melhorar o rastreio, fornecer opções menos invasivas e sensíveis, capazes de melhorar o mau prognóstico e a deteção de recidivas. **Objetivo:** Avaliar o impacto dos marcadores tumorais séricos CEA, CA 15.3, CA 125, e CA 72.4, bem como a sua correlação com dados anátomo-patológicos.

Métodos: Para dosear os marcadores tumorais séricos: CEA, CA 15.3, CA 125 recorreu-se à metodologia de quimioluminescência indireta (CMIA); e para o CA 72.4 utilizou-se o método de electroquimioluminescência (ECMIA). A marcação imunohistoquímica para o recetor de estrogénio (RE), o recetor de progesterona (RP), o recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e o índice de proliferação celular (Ki-67) realizou-se no equipamento *Roche Ventana BenchMark ULTRA IHC/ISH*. **Resultados:** Aplicando a estatística ANOVA, não se verificou qualquer alteração significativa dos valores de CA 15.3, ao longo de cada momento avaliativo ($p>0,05$), nem quando associados aos subtipos moleculares. Porém observou-se uma associação estatisticamente significativa entre o grau tumoral e o Ki-67 ($p\leq 0,05$; $p=0,05$). **Conclusões:** A associação estatisticamente significativa entre o índice de proliferação (Ki-67) e o grau de diferenciação tumoral, permitiu serem considerados indicadores de prognóstico. De acordo com os dados obtidos, as doentes em estudo poderão já ter respondido ao tratamento de quimioterapia (período pós-operatório).

Palavras-chave: Carcinoma da mama, CA 15.3, Follow-up, Biomarcador, Prognóstico.

RELEVANCE AND CORRELATIONAL ANALYSIS OF TUMOR MARKERS IN BREAST CARCINOMA

ABSTRACT

Background: Breast carcinoma is a malignant tumour with a high incidence in women, with more than 2 million new cases worldwide in 2020, making it the second leading cause of cancer-related death. The study of new prognostic markers aims to improve screening, providing less invasive and sensitive options to evaluate prognosis and detection of recurrences. **Objectives:** This study evaluates the impact of serum tumour markers CEA, CA 15.3, CA 125, and CA 72.4 levels, as well as its correlation with anatomopathological data. **Methods:** For the measurement of serum tumour markers: CEA, CA 15.3, CA 125 we used the indirect chemiluminescence methodology (CMIA); and for CA 72.4 the electrochemiluminescence methodology (ECMIA). The immunohistochemical labelling for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), Human Epidermal growth factor receptor type 2 (HER2), and cell proliferation index (Ki-67) were performed using the Roche Ventana BenchMark ULTRA IHC/ISH equipment. **Results:** According to the ANOVA statistics, there was no significant change in CA 15.3 values throughout each evaluative moment, neither when associated with molecular subtypes. However, we found a significant association between tumour grade and Ki-67 ($p \leq 0,05$; $p= 0,05$). **Conclusions:** The findings allowed us to consider Ki-67 and the tumour grade as prognostic indicators. The patients under study may have already responded to chemotherapy treatment (postoperative period).

Keywords: Breast Carcinoma, CA 15.3, Follow-up, Biomarker, Prognosis.

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma da mama é um tumor maligno com grande incidência no sexo feminino, apresentando em 2020 mais de 2 milhões de novos casos a nível mundial, constituindo a segunda causa de morte associada ao cancro (Globocan 2020, 2020; The Global Cancer Observatory, 2020). O seu aparecimento e progressão podem ser influenciados por fatores genéticos (mutações no gene *Breast Cancer* - BRCA1/2) e ambientais (obesidade, consumo de álcool, terapia de substituição hormonal). Porém a deteção precoce e a aplicação da terapia mais dirigida ao estado de cada doente, contribuem para a melhoria do prognóstico (Łukasiewicz et al., 2021). Devido à prevalência deste tumor e o seu mau prognóstico, surgiu a necessidade de implementar exames de rastreio como a mamografia, o exame clínico médico e o autoexame da mama, essenciais na deteção de quaisquer alterações e/ou nódulos mamários (Jafari et al., 2018; Weaver & Leung, 2018). O tratamento está associado a diversos fatores clínico-patológicos tais como: as dimensões do tumor, o envolvimento de gânglios linfáticos, a expressão de receptores hormonais e proteínas receptoras da membrana (Barzaman et al., 2020).

Classificação molecular

A nível molecular foi necessário encontrar marcadores genéticos/moleculares como o receptor de estrogénio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e índice de proliferação celular (Ki-67), para otimizar as estratégias de tratamento e de *follow-up* (Tarighati et al., 2023). De acordo com a Classificação Molecular estão descritos 5 subtipos: Luminal A, Luminal B (HER2 positivo e negativo), HER2 positivo e Basal/tríplo negativo (Cardoso et al., 2019).

Segundo a *European Society for Medical Oncology* (ESMO) os cinco subtipos moleculares de carcinoma da mama estão classificados de acordo com a expressão desses biomarcadores moleculares: Luminal A (ER positivo, HER2 negativo, PR positivo (elevada expressão) e Ki67 com índice baixo); Luminal B (ER positivo, HER2 positivo/negativo e PR positivo (baixa expressão) ou Ki67 índice elevado); HER2 positivo (ausência de ER e PR e HER2 positivo); Basal/tríplo negativo (ER, PR e HER2 negativos) (Cardoso et al., 2019). O biomarcador Ki-67 é uma proteína de proliferação celular, também designada “índice de proliferação celular”, cuja sobreexpressão está correlacionada com o aumento da massa tumoral, grau histológico avançado, com possível envolvimento dos nódulos linfáticos, ou seja, associado a um prognóstico mais reservado. Além disso, a expressão do Ki-67 é útil na subclassificação de tumores Luminal A (bom prognóstico) e Luminal B (mau prognóstico) e na seleção do tratamento mais adequado a cada doente (Tarighati et al., 2023).

Estadio tumoral

Os carcinomas de carácter invasivo são caracterizados mediante o seu crescimento e o grau de diferenciação que apresentam, estando o último relacionado com as semelhanças que as células tumorais demonstram em relação ao epitélio normal da mama. O grau histológico baseia-se numa avaliação das características morfológicas do tecido tumoral e, mediante o *Nottingham Grading System (NGS)*, avaliam-se 3 aspectos morfológicos: grau de formações tubulares e glandulares, pleomorfismo nuclear e contagem de mitoses (Rakha et al., 2010). Apesar deste sistema caracterizar de forma correta a agressividade do tumor, quando aplicado de forma monótona torna-se insuficiente para a predição do prognóstico e da resposta ao tratamento. Assim, a sua aplicação em conjunto com o sistema TNM (tumor, nódulos e metástases) permite descrever de uma forma mais rigorosa o tumor e o prognóstico associado. Acresce ainda o recurso a diversos fatores e o enquadramento em estadios mediante as características que o tumor demonstra (Cserni et al., 2018).

O sistema TNM inclui fatores anatomo-patológicos (presença de tumor primário, nódulos linfáticos e metástases), informação sobre a expressão dos biomarcadores tumorais (exemplo: ER, PR e HER2) e ensaios multigénicos (por exemplo: *Oncotype Dx®* e *Mammaprint®*) (Hortobagyi et al., 2018; Sawaki et al., 2019). Este estadiamento permite ao clínico prever dentro dos diferentes estadios, o prognóstico da doente e personalizar o tratamento. Essa abordagem é especialmente relevante nos tumores tríplo negativos, devido ao alto risco de recorrência e mortalidade. Nesse contexto, a FDA aprovou o Pembrolizumab (Keytruda®) em 2021 como imunoterapia combinada com quimioterapia para tratar tumores tríplo negativos metastáticos expressando PDL-1.

Marcadores Tumorais Séricos

A investigação de novos marcadores de prognóstico visa melhorar o rastreio, fornecer opções menos invasivas, sensíveis, capazes de melhorar o mau prognóstico e a deteção de recidivas. Como exemplo temos os marcadores tumorais séricos, que consistem em métodos não-invasivos de baixo custo, aplicados por rotina no diagnóstico, na monitorização do tratamento e no *follow-up* das doentes (Svobodova et al., 2018). Os marcadores CEA, CA 15.3, CA 125, CA 72.4 são glicoproteínas que apresentam perfis alterados, relativos à progressão tumoral em diversos tipos de cancro (S. Zhao et al., 2015). O抗ígeno carcinoembrionário (CEA) foi o primeiro marcador tumoral sérico a ser estudado, manifestando especificidade para a maioria dos tumores. Esta molécula é sobreexpresada na maioria dos tumores do colon, em cerca de 50% dos cancros da mama e cancro do pulmão de não-

pequenas células (S. Zhao et al., 2015). O CA 15.3 é uma glicoproteína transmembranar com uma expressão elevada em carcinomas de origem epitelial, incluindo cancro da mama, ovárico, pancreático e o mieloma múltiplo (S. Zhao et al., 2015). Este marcador deteta formas solúveis de mucina-1(MUC-1) que se encontram alteradas, estando associadas a carcinogénese e metástases, considerado um oncogene. Esta proteína é expressa no carcinoma da mama em níveis elevados à superfície e no citoplasma das células tumorais e está correlacionada com as dimensões do tumor, o envolvimento dos nódulos e o aparecimento de metástases (TNM) (Li et al., 2020; Li et al., 2018; Svobodova et al., 2018). Ao longo do tempo, o CA 15.3 tem demonstrado ser um marcador preditivo, bem como indicador de prognóstico extremamente importante para doentes com estadio avançado de carcinoma da mama (S. Zhao et al., 2015). Em vários estudos CEA e CA 15.3 mostraram-se um método eficaz de diagnóstico neste cancro (Fan et al., 2020; S. Zhao et al., 2015). A combinação destes marcadores, juntamente com a idade e a avaliação clínica, é recomendada para a distinção entre carcinoma da mama e tumor benigno (S. Zhao et al., 2015). Os níveis de CEA e CA 15.3 apresentam bons valores para avaliação de doentes, auxiliando como indicadores preditivos e intervindo na monitorização deste tumor (Chen et al., 2020; Svobodova et al., 2018; S. Zhao et al., 2015). Segundo Chen e colaboradores os níveis séricos são mais elevados em estadios tardios de carcinoma da mama, comparativamente a estadios mais precoces (Chen et al., 2020). Assim, estes marcadores revelam ter uma maior utilidade quando aplicados na monitorização de cancros em estadios mais avançados do que no diagnóstico precoce (Chen et al., 2020). O aumento ou diminuição da expressão do CEA poderá indicar a progressão ou a regressão do cancro. Assim, este marcador pode ser útil no *follow-up* destas doentes, para a deteção precoce de recidivas e monitorização da resposta ao tratamento (Chen et al., 2020; W. Zhao et al., 2021). O CA 72.4 é uma glicoproteína tumoral, com uma elevada especificidade para o cancro, mas sem grande sensibilidade de órgão encontrando-se expresso com níveis elevados no cancro colorretal, cancro gástrico e cancro ovárico (Mariampillai et al., 2017). O CA 125, codificado pelo gene MUC16, é descrito como um biomarcador para o cancro do ovário, mas tem vindo a revelar níveis elevados na maioria das doentes com metástases de carcinoma da mama (Li et al., 2020). As metástases ováricas são frequentemente observadas em doentes com fatores de mau prognóstico, como exemplo a elevada dimensão tumoral, nódulos linfáticos positivos, ou ainda tumor de elevado grau (Tian et al., 2019). Neste tipo de metástases poderá ser útil proceder ao doseamento dos marcadores séricos CEA, CA 15.3, CA 125 e CA 72.4. A maioria das metástases ováricas provenientes do carcinoma da mama são assintomáticas até surgirem, geralmente, massas tumorais pequenas, sólidas e bilaterais (Huang et al., 2022). Desta forma, a história clínica do carcinoma da mama e a presença de anomalias a nível dos ovários, os clínicos terão de se focar e decidir no diagnóstico diferencial, entre metástases ováricas e tumor primário do ovário (Tian et al., 2019). A combinação CA 15.3, CA 125 e CEA é realizada para monitorizar metástases ováricas e a distinção em relação ao tumor primário do ovário. Em doentes com carcinoma da mama, recentemente diagnosticados com cancro do ovário, verificou-se que os marcadores CA 15.3 e CEA mostraram níveis elevados e o CA 125 um ligeiro aumento, propenso de metástases ováricas (Tian et al., 2019). O CA 125 é um marcador que se destaca na presença de tumor primário do ovário podendo mostrar um ligeiro aumento em alguns carcinomas da mama (Tian et al., 2019). O carcinoma lobular invasivo da mama é um dos tipos de carcinoma mais frequente a originar metástases ováricas e a sua monitorização baseia-se na vigilância dos níveis de CA125 (Mansha et al., 2019; Tian et al., 2019). Na prática clínica atual, os marcadores tumorais CA 15.3 e CEA são considerados *gold standard* para a monitorização das doentes ao longo dos tratamentos oncológicos. Contudo, perante a necessidade de aprimorar os métodos de deteção e

follow-up, a combinação com outros marcadores, como o CA 72.4 e o CA 125, apresenta-se como uma abordagem promissora para explorar o potencial prognóstico de novos biomarcadores.

O objetivo geral do estudo foi avaliar se existe correlação estatística entre os marcadores tumorais CEA, CA 15.3, CA 125, e CA 72.4 e os marcadores imunohistoquímicos (ER, PR, HER2 e Ki-67), com especial foco para os subtipos moleculares, de modo a verificar a importância destes marcadores tumorais séricos como indicadores de prognóstico e de monitorização terapêutica. Além disso pretendeu-se avaliar: a existência de alguma correlação entre os níveis séricos e os subtipos moleculares com perfil mais agressivo; se CA125 e CA 72.4 apresentavam relevância como preditores de recidiva nas doentes submetidas a quimioterapia; se CA 15.3 e CEA são bons marcadores para monitorizar a terapêutica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho de estudo

O estudo consistiu numa avaliação retrospectiva de marcadores moleculares em doentes previamente diagnosticadas com carcinoma da mama em *follow-up* do tratamento de quimioterapia, seguidas numa Unidade Hospitalar (UH) da região centro de Portugal. Para tal procedeu-se à seleção e recolha na base de dados, via informática, limitando o espaço temporal aos anos 2018 e 2019, de doentes com carcinoma da mama e com os marcadores tumorais séricos: CEA, CA 15.3, CA 125 e CA 72.4 e ainda, informação da expressão de RE, PR, HER2 e Ki-67 (índice proliferativo) em cortes histológicos validados pelos princípios da imunohistoquímica e o grau tumoral (G1, G2, G3), para a classificação molecular e a caracterização tumoral das doentes em estudo.

2.1.1 População e amostra

Partindo de uma base de dados com um total de 5339 doentes com carcinomas e em *follow-up*, sendo aplicada uma primeira seleção com base nos marcadores tumorais séricos, RE, PR, HER2, índice proliferativo e grau tumoral. Selecionou-se uma população de 50 doentes, previamente diagnosticadas com carcinoma da mama, sujeitas a *follow-up* do tratamento com quimioterapia na UH. Definiram-se como critérios de inclusão: doentes do sexo feminino; diagnosticadas com carcinoma da mama e submetidas a quimioterapia; com doseamentos séricos de CA 15.3 e, por vezes, doseamento do CEA, do CA 125 e do CA 72.4; avaliação anátomo-patológica através de biópsia, tumorectomia ou mastectomia; com classificação molecular e grau histológico. Já os critérios de exclusão consistiram em: doentes do sexo masculino, doentes com menos de quatro doseamentos para CA 15.3 e sem informação sobre a avaliação dos marcadores imunohistoquímicos. Assim, para a seleção da amostra, recorremos a um método de amostragem não probabilístico pela técnica de amostragem por tipicidade. Este método apresenta algumas desvantagens, pelo facto da amostra eventualmente, não refletir a população como um todo e induzir algum viés nos resultados.

2.1.2 Instrumentos e recolha de dados

Antes do tratamento por quimioterapia, as doentes realizam análises sanguíneas para sua segurança e monitorização da efetividade do tratamento. O *follow-up* foi realizado em seis meses e cada doente foi submetida a ciclos de quimioterapia protocolares, sendo que cada ciclo ocorreu de 3 em 3 semanas, correspondendo a 3 ciclos por semestre. Como os marcadores séricos não refletem as alterações significativas em curtos períodos de tempo, a medição após 6 meses demonstra-se útil para estabelecer tendências dos níveis séricos correlacionando com a progressão ou estabilidade tumoral.

Sendo assim no *follow-up* as doentes integram até cinco momentos avaliativos, primeiro doseamento (M1), segundo doseamento (M2), terceiro doseamento (M3), quarto doseamento (M4) e quinto doseamento (M5).

Avaliação de marcadores tumorais séricos

Para avaliar os marcadores tumorais séricos foi efetuada uma punção venosa para tubo com gel. Após coagulação do sangue o tubo foi centrifugado a 1800x g durante 10 min e separado o soro. Este procedimento foi realizado antes de cada sessão de quimioterapia. A avaliação sérica dos marcadores tumorais das doentes em estudo efetuou-se nos autoanalisadores: *Abbott Alinity ci series* (*Abbott Laboratories, Chicago, USA*) que recorreu à metodologia de quimioluminescência indireta (CMIA) para o CEA, CA 15.3, CA 125 e o *Cobas E 411* (*Roche Diagnostics Laboratories, Basel, Switzerland*), que utilizou a metodologia de electroquimioluminescência (ECMIA), para o CA 72.4. Os resultados foram determinados através de uma curva de calibração gerada especificamente pelo analisador.

- Na quimioluminescência o marcador tumoral sérico presente na amostra ligou-se às micropartículas revestidas por anticorpos específicos. Após a lavagem, que removeu as micropartículas paramagnéticas não ligadas, procedeu-se à adição do conjugado de anticorpos específicos marcados com fluorocromo (acridina, por exemplo). De seguida, promoveu-se a reação de quimioluminescência, pela adição sequencial das soluções pré-ativadora seguida da ativadora. O resultado da reação mostra o valor da concentração do marcador, sendo este proporcional à quantidade da luz emitida, medida em unidades relativas de luz (RLUs).
- Na eletroquimioluminescência as amostras foram incubadas com um anticorpo monoclonal biotinilado específico e um anticorpo monoclonal específico marcado com complexo de ruténio. Estes anticorpos reagem entre si originando um complexo *sandwich*. De seguida, adicionaram-se as micropartículas revestidas com estreptavidina, permitindo a ligação do complexo formado à fase sólida pela interação biotina-estreptavidina. A mistura da reação foi aspirada para a célula de leitura, onde ocorre a fixação das micropartículas à superfície do elétrodo. Os elementos não ligados foram removidos da mistura. Finalmente, aplicou-se uma corrente elétrica ao elétrodo, induzindo uma emissão quimioluminescente medida por um fotomultiplicador.

Avaliação anátomo-patológica

O diagnóstico molecular foi definido mediante a expressão dos marcadores imunohistoquímicos: HER2, ER, PR e Ki-67. A marcação imunohistoquímica realizou-se com recurso ao equipamento *Roche Ventana BenchMark ULTRA IHC/ISH* (*Roche Diagnostics Laboratories, Basel, Switzerland*), obtendo-se as lâminas de histologia marcadas com o抗ígeno correspondente ao recetor presente ou não. A marcação imunohistoquímica do ER, PR e HER2 baseou-se num método indireto de reação抗ígeno-anticorpo. Nesta marcação, o corte histológico foi impregnado com anticorpos primários (*anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Antibody*, *anti-ER (SP1) Rabbit Monoclonal Antibody*, *anti-PR (1E2) Rabbit Monoclonal Antibody (IgG)*, *anti-Ki-67 (SP6) Rabbit Monoclonal Antibody*), que expressou ou não o抗ígeno a ser detetado, ocorrendo a ligação Ag-Ac. De seguida, foi realizada uma lavagem para remover os Ac que não se ligaram. Adicionou-se, depois um anticorpo secundário marcado com biotina, que reconhece as imunoglobulinas correspondentes à espécie do anticorpo primário. Por último, adicionou-se estreptavidina-HRP (conjugado), originando um complexo enzimático que, ao ligar-se ao substrato cromogéneo, promoveu a precipitação do produto da reação (tetracloreto de

diaminobenzidina (DAB), através do *ultraView Universal DAB Detection Kit*), visível nos locais onde ocorreu a ligação do antígeno aos anticorpos monoclonais aplicados. O precipitado cromogéneo de cor castanha, precipitou: dentro do núcleo das células tumorais na deteção de ER, PR e Ki-67; na deteção HER2, deve precipitar na membrana citoplasmática das células tumorais. Após a marcação é aplicada sobre o corte histológico uma solução de contraste e colocou-se a lamela, estando preparado o corte histológico para avaliação ao microscópio. Para a deteção do HER2, a intensidade da coloração pode ser classificada em (observado numa ampliação 40): **1+** quando se verificou a coloração parcial da membrana citoplasmática de fraca intensidade (em > 10% das células tumorais); utilizando as intensidades **2+** quando se verifica que, a coloração circunda de forma completa as membranas das células tumorais, mas a intensidade foi considerada fraca a moderada (em >10% das células tumorais); considerámos **3+** quando a coloração circunda completamente a membrana das células tumorais de forma intensa (em > 10% das células tumorais). Nos casos equívocos, a expressão de HER-2 foi considerada **2+**, por apresentarem padrões diferentes dos definidos. Neste tipo de situação foi recomendado, pelas *guidelines* da *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists*, proceder à reavaliação da expressão de HER-2 por hibridação *in situ* ou repetir o ensaio de IHC (Wolff et al., 2018). Para o diagnóstico molecular seguem-se as *guidelines* definidas pela *European Society for Medical Oncology* (ESMO) para a classificação de cada subtipo molecular. Para facilitar a análise da variável Ki-67 foram definidos três níveis de risco: baixo risco (Ki-67 ≤ 14%), risco intermédio (Ki-67 15%- 20%), risco elevado (Ki-67 >20%) (Lombardi et al., n.d.).

A equipa de investigação assegurou, ao longo de todo o trabalho, a confidencialidade e a anonimização de todos os resultados, seguindo as orientações da declaração de Helsínquia e as boas práticas laboratoriais.

2.1.3 Análise estatística

O Software utilizado foi o programa IBM-SPSS *Statistics 27*. Para avaliar os vários marcadores tumorais ao longo do tempo, recorreu-se ao modelo de Análise de Variância para Medidas Repetidas (1 fator). Os pressupostos para a aplicabilidade do modelo anterior foram garantidos: “Simetria Composta” da matriz de covariância; Distribuição Normal Univariada; pressuposto de esfericidade de *Mauchly*. Na presença de diferenças significativas ao longo dos momentos temporais, recorreu-se ao teste de comparações múltiplas *Bonferroni* corrigido.

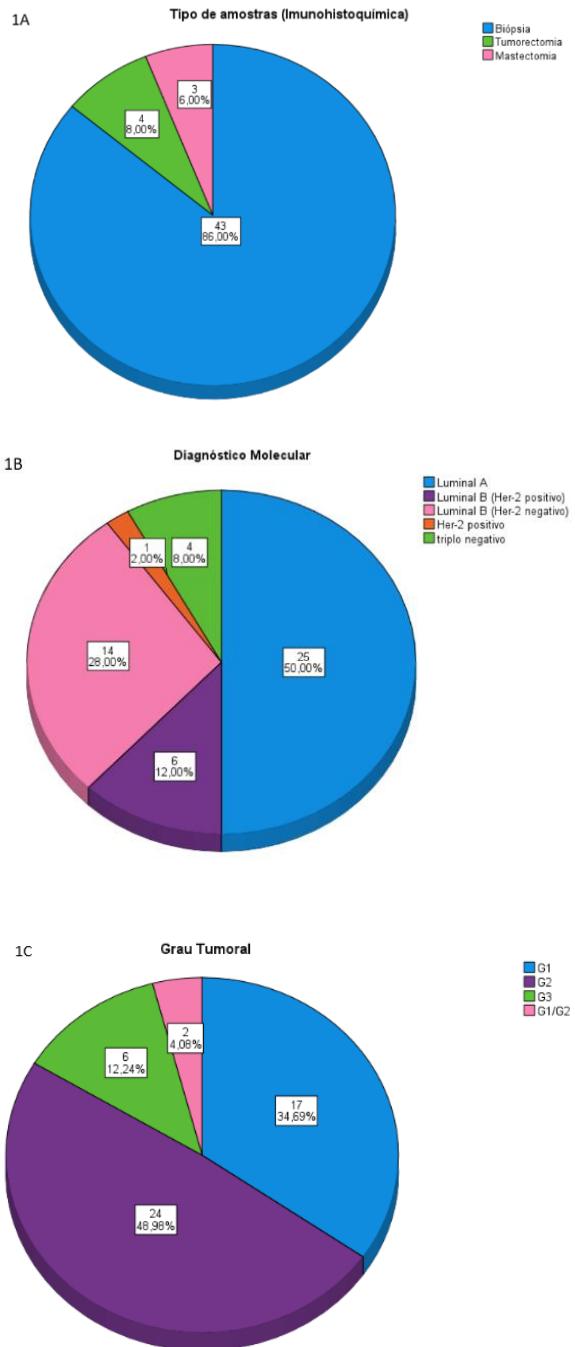
Já quanto ao estudo da associação entre variáveis de interesse, recorreu-se ao teste de Qui-quadrado de *Pearson*. Para a inferência estatística assumiu-se um nível de confiança de 95% para um erro aleatório até 5% ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS

Os dados clínicos compilados das 50 doentes com carcinoma invasivo da mama NST (*not special type*) foram analisados segundo uma avaliação retrospectiva, apresentando uma idade média de $59,06 \pm 11,78$ anos. De entre os momentos avaliativos (M1 a M5) de cada marcador tumoral sérico, o CA 15.3 atingiu o seu valor máximo em M3 com $129,20 \pm 21,09$ (excedendo o *cut-off*). Os restantes marcadores tumorais, ao longo dos momentos avaliativos, apresentaram valores máximos dentro do *cut-off* definido. O diagnóstico molecular foi atribuído de acordo com a marcação imunohistoquímica realizada através de: biópsias ($n = 43$ (86,0%)), tumorectomia ($n = 4$ (8,0%)) e mastectomia ($n = 3$ (6,0%)) (Figura 1A).

Na análise do diagnóstico molecular observou-se que: cerca de 50% apresentaram o subtipo luminal A, 12% possuem o subtipo luminal B (HER2 positivo), 28% apresentam luminal B (HER2 negativo), 2,0% possuem sobreexpressão de HER2 e 8% apresentavam o subtipo triplo negativo (Figura 1B). Quanto ao Grau de diferenciação tumoral, 34,7 % estão em G1, 49% em G2, 12,2 % em G3 e 4,1% estão entre G1 e G2 (Figura 1C).

Figura 1 (A, B e C) – Distribuição dos tipos de amostra, com recurso a técnicas de Imunohistoquímica (1A); diagnóstico Molecular (1B); grau tumoral (1C).



Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para estimar o comportamento de cada marcador tumoral sérico, ao longo de cada momento avaliativo, tentando estabelecer alguma associação com os subtipos

moleculares. O teste ANOVA foi realizado apenas para o marcador tumoral CA15.3, conforme indicado na tabela 1, devido à baixa distribuição amostral dos demais marcadores.

Definiu-se a hipótese nula (h_0) como: a variação dos valores de CA 15.3 é independente dos diferentes momentos avaliativos; a hipótese alternativa (h_1) definiu-se como: existem diferenças nos valores de CA 15.3 ao longo de cada momento avaliativo em doentes com carcinoma da mama. Verificou-se, então, que os valores médios de CA 15.3 se encontram dentro do *cut-off* definido, porém ocorre um aumento progressivo de M1 ($20,11 \pm 8,64$) até M3 ($21,76 \pm 10,72$). Após M3 os valores começam a diminuir até M5 (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1 – Distribuição dos valores de CA 15.3 ao longo dos momentos avaliativos

	n	Doseamentos de CA 15.3
M1	15	$20,11 \pm 8,64$
M2	15	$20,47 \pm 7,39$
M3	15	$21,76 \pm 10,72$
M4	15	$19,69 \pm 10,27$
M5	15	$19,03 \pm 9,26$

M1, M2, M3, M4, M5: momentos avaliativos

Segundo o teste estatístico ANOVA para medidas repetidas, pode concluir-se que os valores de CA 15.3 não diferem significativamente ao longo do tempo ($p\text{-value} > 0,05$; $p\text{-value} = 0,242$) aceitando a hipótese nula (h_0). Verificou-se um *effect-size* 7,8% na variação média dos valores de CA 15.3 ao longo dos momentos avaliativos, de M1 a M5 (Tabela 1). Recorrendo ao método Bonferroni, verificámos que não existem diferenças significativas entre os grupos de doseamento, mas evidencia-se uma tendência progressiva entre os doseamentos M1 a M3 (Figura 2).

Para correlacionar os níveis de CA 15.3 com os subtipos moleculares, limitou-se a amostra aos 4 momentos avaliativos para abranger uma amostra maior. Desta forma, recorreu-se ao teste ANOVA e obtiveram-se os seguintes resultados (Quadro 1 e Figura 3): não houve diferenças significativas ($p > 0,05$; $p = 0,176$) dos níveis de CA 15.3 ao longo dos vários momentos. Entre as doentes com o subtipo luminal A, observou-se um aumento progressivo de M1 ($17,01 \pm 8,49$) para M3 ($21,60 \pm 27,71$), diminuindo até M4 ($19,83 \pm 25,88$) (os valores estão dentro do *cut-off*); no subtipo luminal B (HER2 positivo) verificou-se que os valores médios de CA 15.3 sofreram um decréscimo desde M1 ($20,88 \pm 6,83$) até M4 ($16,77 \pm 5,61$); para o subtipo luminal B (HER2 negativo) os valores médios de CA 15.3 mostraram aumento de M1 ($20,52 \pm 8,58$) até M3 ($21,62 \pm 7,72$) e decréscimo até M4 ($20,76 \pm 7,10$), tal como no subtipo luminal A; o subtipo triplo negativo comporta-se como o subtipo luminal B (HER2 Negativo) com decréscimo até M4 ($17,10 \pm 1,27$). De seguida, através de uma tabela de contingência (Quadro 2), avaliou-se se existiria alguma correlação entre o grau tumoral e o índice de proliferação (Ki-67). Perante a tabela de contingência, verificou-se que um estadio mais avançado com G3 estará associado a uma taxa de proliferação mais elevada ($n = 4$, $fi\% = 26,70$) e, consequentemente, a um prognóstico mais reservado. Quanto a G1 encontra-se associado a uma taxa de proliferação celular mais baixa e, consequentemente, a um tumor de baixo risco (bom prognóstico). Verificou-se que existe uma associação significativa entre o grau de diferenciação tumoral e Ki-67, desta forma, estas variáveis podem ser indicadores de prognóstico ($p \leq 0,05$; $p = 0,05$).

Quadro 1 –Associação entre o diagnóstico molecular e os momentos avaliativos

Diagnóstico Molecular					
CA 15.3 (U/mL)		Luminal A	Luminal B (HER2 positivo)	Luminal B (HER2 negativo)	Triple Negativo
M1	Média	17,01 ± 8,49	20,88 ± 6,83	20,52 ± 8,58	23,15 ± 12,52
	n	19	4	10	2
M2	Média	20,67 ± 22,92	19,10 ± 6,33	20,85 ± 6,62	22,80 ± 10,75
	n	19	4	10	2
M3	Média	21,60 ± 27,71	18,69 ± 7,52	21,62 ± 7,72	16,90 ± 1,27
	n	19	4	10	2
M4	Média	19,83 ± 25,88	16,78 ± 5,61	20,76 ± 7,10	17,10 ± 1,27
	n	19	4	10	2

M1- primeiro doseamento; M2- segundo doseamento; M3- terceiro doseamento;
M4- quarto doseamento; n- número de casos.

Quadro 2 – Associação entre estadio tumoral e o índice de proliferação celular (Ki-67)

Grau tumoral		Classe do índice de proliferação celular			Total
		Risco Baixo	Risco Intermédio	Risco elevado	
G1	n	10	2	4	16
	% linha	62,5%	12,5%	25,0%	100,0%
	% coluna	45,5%	22,2%	26,7%	34,8%
G2	n	9	7	7	23
	% linha	39,1%	30,4%	30,4%	100,0%
	% coluna	40,9%	77,8%	46,7%	50,0%
G3	n	1	0	4	5
	% linha	20,0%	0,0%	80,0%	100,0%
	% coluna	4,5%	0,0%	26,7%	10,9%
G1/G2	n	2	0	0	2
	% linha	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
	% coluna	9,1%	0,0%	0,0%	4,3%

G1- grau um; G2- grau dois; G3- grau três.

Figura 2 – Comportamento dos valores de CA15.3 ao longo do tempo.

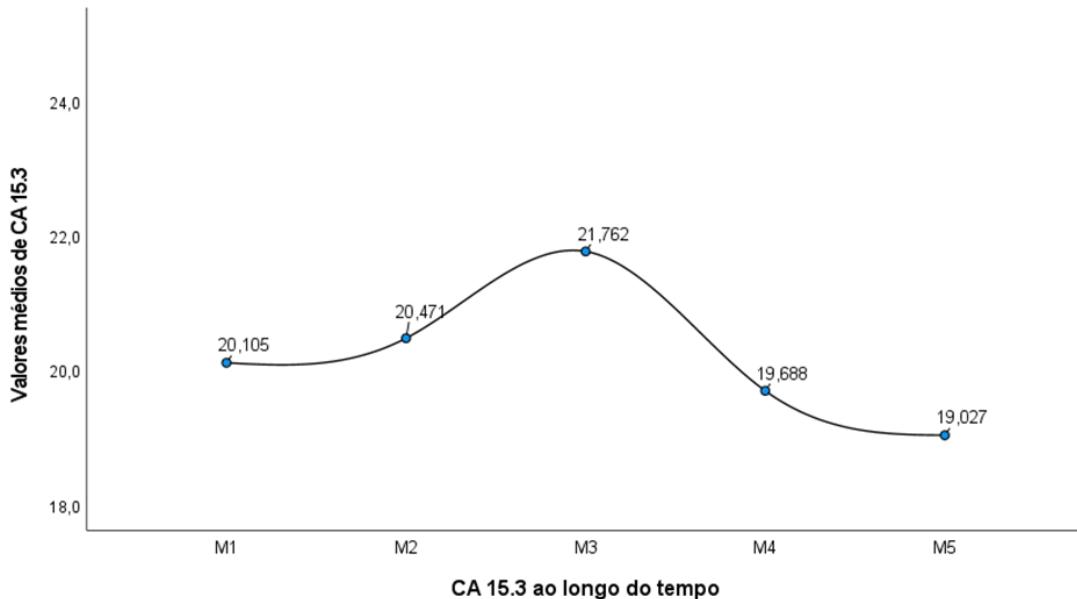
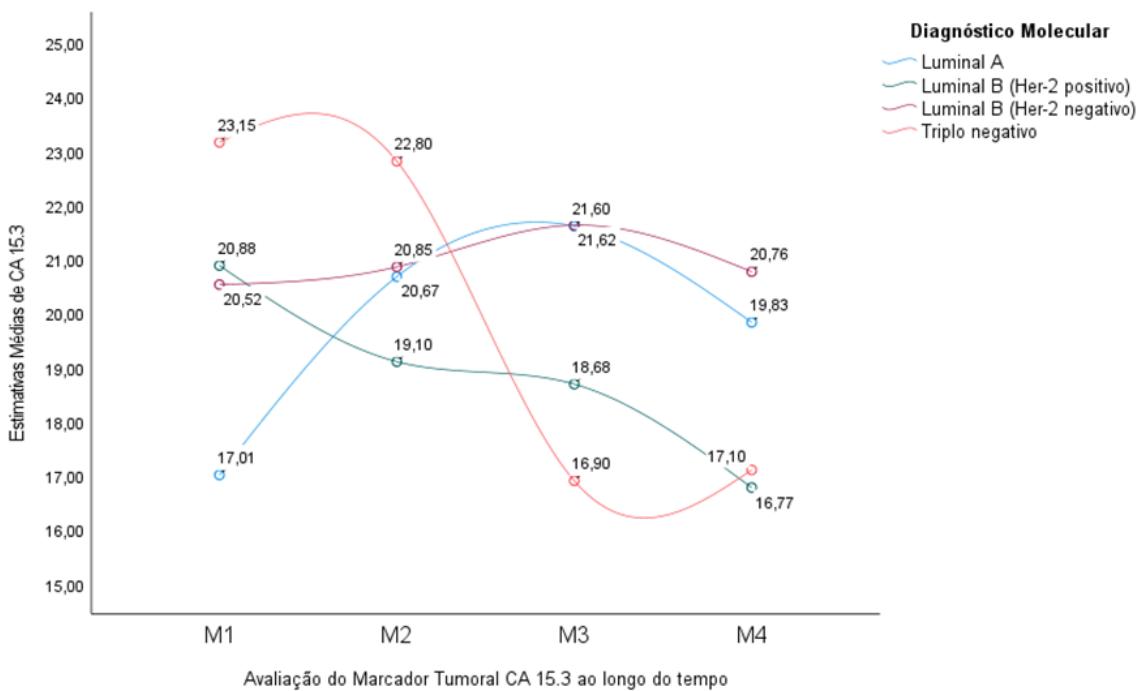


Figura 3 – Valores médios de CA15.3 associados a cada diagnóstico molecular



DISCUSSÃO

Neste estudo procedeu-se à avaliação dos marcadores tumorais CA 15.3, CEA, CA 125 e CA 72.4 em 50 amostras séricas (em cada momento avaliativo) de doentes do sexo feminino, com idade média de 59 anos, previamente diagnosticadas com carcinoma da mama e a realizar sessões de quimioterapia. Os nossos resultados demonstraram a quantificação de CA 15.3 entre 13,0 e 27,0 U/ml, consideradas nos

limites de referência, atingindo um pico em M3 ($21,76 \pm 10,72$) e diminuindo os seus valores até M5 ($19,03 \pm 9,26$). Apesar do comportamento nos diversos momentos avaliativos, não se verificaram alterações significativas ($p = 0,242$) nos valores de CA 15.3 durante o período de avaliação. De seguida, analisou-se a distribuição de CA 15.3 em cada um dos subtipos moleculares e também não se observou qualquer diferença significativa entre os níveis de CA 15.3 e os subtipos moleculares ($p = 0,176$). Porém, na relação entre Ki-67 e o estadio tumoral, as doentes registaram níveis de Ki-67 de “Risco elevado” estando estatisticamente associadas a um grau de diferenciação mais elevado como G3, com ($p = 0,05$), podendo constituir um indicador de mau prognóstico. Os investigadores sugerem que alguns fatores podem estar na origem dos resultados inconclusivos, no que respeita à avaliação do valor preditivo dos marcadores tumorais séricos, tais como: a alteração da estratégia de tratamento aplicada aquando do doseamento dos marcadores tumorais, a quantificação pode ter ocorrido já num período pós-operatório, com modificações na prevalência dos marcadores tumorais e no período de *follow-up* (Li et al., 2020). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram-se limitantes na avaliação do impacto que os valores de CA 15.3 apresentam quanto à predição do prognóstico das doentes, bem como qualquer associação com os subtipos moleculares. Segundo *De Cock et al.* (2021) nas *guidelines* atuais, o CA 15.3 é útil quando utilizado por rotina no *follow-up* de doentes diagnosticadas recentemente com carcinoma da mama, visto este marcador poder ser útil na deteção de recidivas, mas a sua relevância clínica ainda não está bem esclarecida (De Cock et al., 2021). Contudo, alguns estudos observaram uma redução significativa dos valores de CA 15.3 após intervenção cirúrgica (pós-operatório), sendo que os valores de CA 15.3 no período pré-operatório poderão ser úteis, em conjunto com outros fatores, para a monitorização e progressão da atividade tumoral (Khushk et al., n.d.; X. Li et al., 2018). O doseamento do CA 15.3 tem feito parte da rotina clínica, sendo possível, com base nos seus valores e nas dimensões do tumor, predizer o prognóstico de doentes que não responderam à quimioterapia neoadjuvante (NAC). Assim, os níveis de CA 15.3 e a dimensão tumoral podem constituir indicadores estimativos da taxa de sobrevida livre de doença (Fujimoto et al., 2018). Apesar deste marcador possuir uma baixa sensibilidade, o seu aumento poderá predizer um mau prognóstico, em situações como o aparecimento de metástases primárias, com mais sensibilidade de deteção (comparativamente à deteção de recidivas) ou a predição de recidivas (Heylen et al., 2022; Study & Al-bayati, 2018). Em contraste com os nossos resultados, registou-se que doentes com valores de CA 15.3 e CEA elevados mostravam uma taxa de sobrevida livre de doença mais reservada no subtipo luminal A, podendo constituir indicadores úteis no prognóstico desses doentes (Li et al., 2020). De acordo com *Aman et al.* é descrita a associação entre o Ki-67 e o grau de diferenciação tumoral, sendo que um tumor mal diferenciado apresentará um índice proliferativo mais elevado e, consequentemente, o possível aparecimento de metástases, bem como, uma taxa de sobrevida mais reservada (Aman et al., 2019).

Os autores reconhecem algumas limitações ao estudo que passam a comentar. O tamanho reduzido da amostra parece constituir uma limitação à deteção de associações estatisticamente significativas entre os marcadores tumorais e os parâmetros avaliados, especialmente na análise de subtipos moleculares. Além disso, a recolha de dados em contexto predominantemente pós-terapêutico pode ter influenciado os resultados, uma vez que os níveis de CA 15.3 estavam controlados devido à resposta terapêutica. Essa condição reduz a sensibilidade do marcador como indicador de prognóstico ou progressão tumoral, alinhando-se a evidências que sugerem uma maior relevância do período pré-operatório para o tipo de análises do estudo ou durante a transição para o período pós-operatório (X. Li et al., 2018). Os nossos resultados podem ser explicados pelo facto de as doentes já terem respondido ao tratamento de quimioterapia para carcinoma invasivo (pós-operatório). Durante a

recolha dos dados, observou-se que a maioria dos diagnósticos havia sido realizada em anos anteriores ao período de 2018-2019. Na avaliação dos doseamentos, verificámos que os valores de CA 15.3 das doentes estavam controlados (dentro do *cut-off* definido). Torna-se importante salientar a relevância da monitorização constante para a predição de recidivas, razão pela qual os investigadores consideram que, apesar dos resultados não terem demonstrado significância, a avaliação do CA 15.3 no prognóstico das doentes é essencial. Além disso os valores de CA 15.3 não revelaram uma grande amplitude em relação ao esperado, uma vez que o *follow-up* realizado foi no âmbito de uma estratégia de vigilância, visando a deteção de possíveis recidivas.

CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstrou o comportamento dos níveis de CA 15.3 ao longo dos diferentes momentos avaliativos, evidenciando um pico em M3, correspondente aos subtipos luminal A e luminal B. No âmbito do índice de proliferação (Ki-67) e do grau de diferenciação tumoral constatámos associações estatisticamente significativas, apontando-os como indicadores de prognóstico. Apesar de nos marcadores tumorais séricos não se registarem associações significativas, é possível que fatores como a possível alteração da estratégia de tratamento aquando do doseamento e o período de pós-operatório, induzam variações na prevalência dos marcadores tumorais durante o período de *follow-up*. Relativamente aos objetivos propostos, os achados deste estudo sugerem que o Ki-67 e o CA15.3, no que concerne aos subtipos luminal A e Luminal B, podem ter utilidade prognóstica.

No âmbito desta temática serão necessários mais estudos, para melhorar e desenvolver métodos não-invasivos indicativos de prognóstico. Em perspetivas futuras sugere-se a avaliação do valor de prognóstico do CA 15.3 em doentes de fase pré-operatória, recorrendo a uma maior amostragem, para entender se poderá ser um bom indicador de prognóstico e se existe associação com os subtipos moleculares. De forma a melhorar esta avaliação, podemos recorrer a outros marcadores moleculares como a p53, que consiste num gene supressor tumoral, frequentemente mutado neste tipo de carcinoma para o qual têm sido desenvolvidos compostos capazes de reativar as suas propriedades, como por exemplo, a sua atividade anti-tumoral. Para completar a validação do valor prognóstico e melhorar as estratégias terapêuticas, podemos apostar também na somatostatina (SST). Esta molécula é um inibidor da hormona de crescimento, cuja ligação aos diferentes subtipos SSTR produz um efeito citostático/citotóxico na regulação da proliferação celular, favorecendo uma redução da toxicidade associada ao tratamento do cancro da mama(Gabbard, 2014).

CONFLITOS DE INTERESSE

A investigadora Mariana Pires e a sua equipa não manifestam qualquer conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

Aman, N. A., Doukoure, B., Koffi, K. D., Kou, B. S., Traore, Z. C., Kouyate, M., Toure, I., & Effi, A. B. (2019). Immunohistochemical evaluation of Ki-67 and comparison with clinicopathologic factors in breast carcinomas. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(1), 73–79. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.1.73>

Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., & Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, 84(April), 106535. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>

Cardoso, F., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rubio, I. T., Zackrisson, S., & Senkus, E. (2019). Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(8), 1194–1220. <https://doi.org/10.1093/annonc/MDZ173>

Chen, R., Jiang, C., Zhu, Q., You, S., Li, Y., Li, S., Ding, L., Meng, H., Yang, Y., Zha, X., & Wang, J. (2020). Combining the tumor abnormal protein test with tests for carcinoembryonic antigens, cancer antigen 15-3, and/or cancer antigen 125 significantly increased their diagnostic sensitivity for breast cancer. *Medicine*, 99(29), e21231. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021231>

Cserni, G., Chmielik, E., Cserni, B., & Tot, T. (2018). The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv*, 472(5), 697–703. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2301-9>

De Cock, L., Heylen, J., Wildiers, A., Punie, K., Smeets, A., Weltens, C., Neven, P., Billen, J., Laenen, A., & Wildiers, H. (2021). Detection of secondary metastatic breast cancer by measurement of plasma CA 15.3. *ESMO Open*, 6(4), 100203. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100203>

Fan, Y., Chen, X., & Li, H. (2020). Clinical value of serum biomarkers CA153, CEA, and white blood cells in predicting sentinel lymph node metastasis of breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 13(11), 2889–2894. www.ijcep.com/

Fujimoto, Y., Higuchi, T., Nishimukai, A., Miyagawa, Y., Kira, A., Ozawa, H., Bun, A., Imamura, M., & Miyoshi, Y. (2018). High levels of serum CA15-3 and residual invasive tumor size are associated with poor prognosis for breast cancer patients with non-pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Surgical Oncology*, 118(1), 228–237. <https://doi.org/10.1002/jso.25125>

Globocan 2020. (2020). Estimated number of deaths in 2020, worldwide, females, all ages. 996, 2020. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=170&key=asr&sex=2&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&i

Heylen, J., Punie, K., Smeets, A., Neven, P., Weltens, C., Laenen, A., & Wildiers, H. (2022). Elevated CA 15.3 in Newly Diagnosed Breast Cancer: A Retrospective Study. *Clinical Breast Cancer*, 22(6), 579–587. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2022.04.007>

Hortobagyi, G. N., Edge, S. B., & Giuliano, A. (2018). New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 38(38), 457–467. https://doi.org/10.1200/EDBK_201313

Huang, P. C., Wu, R. C., Juan, Y. H., Ho, H. Y., Lin, Y. C., Huang, Y. T., Ng, S. H., Lai, C. H., Chao, A., & Lin, G. (2022). Diagnostic Accuracy of Whole-Body Computed Tomography for Incidental Ovarian Tumors in Patients with Prior Breast Cancer. *Diagnostics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020347>

Jafari, S. H., Saadatpour, Z., Salmanejad, A., Momeni, F., Mokhtari, M., Nahand, J. S., Rahmati, M., Mirzaei, H., & Kianmehr, M. (2018). Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. *Journal of Cellular Physiology*, 233(7), 5200–5213. <https://doi.org/10.1002/jcp.26379>

Khushk, M., Khan, A., Rehman, A., Sheraz, S., Tunio, Y. M., Rehman, K., Rehman, D., Ahmed, M., Abbas, K., & Khan, M. E. (n.d.). *The Role of Tumor Markers: Carcinoembryonic Antigen and Cancer Antigen 15-3 in Patients With Breast Cancer*. <https://doi.org/10.7759/cureus.16298>

Li, J., Liu, L., Feng, Z., Wang, X., Huang, Y., Dai, H., Zhang, L., Song, F., Wang, D., Zhang, P., Ma, B., Li, H., Zheng, H., Song, F., & Chen, K. (2020). Tumor markers CA15-3, CA125, CEA and breast cancer survival by molecular subtype: a cohort study. *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*, 27(4), 621–630. <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01058-3>

Li, X., Dai, D., Chen, B., Tang, H., Xie, X., & Wei, W. (2018). Determination of the prognostic value of preoperative CA15-3 and CEA in predicting the prognosis of young patients with breast cancer. *Oncology Letters*, 16(4), 4679–4688. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9160>

Lombardi, A., Lazzeroni, R., Bersigotti, L., Vitale, V., & Amanti, C. (2021). *The Proper Ki-67 Cut-Off in Hormone Responsive Breast Cancer: A Monoinstitutional Analysis with Long-Term Follow-Up*. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S305440>

Łukasiewicz, S., Czeczelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). *Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review*. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>

Mansha, M., Gill, A., & Thomson, P. C. (2019). Potential risk factors of ovarian cancer and analysis of CA125, a biomarker used for its monitoring and diagnosis. *Molecular Biology Reports*, 46(3), 3325–3332. <https://doi.org/10.1007/S11033-019-04794-8>

Mariampillai, A. I., Cruz, J. P. Dela, Suh, J., Sivapiragasam, A., Nevins, K., & Hindenburg, A. A. (2017). Cancer Antigen 72-4 for the Monitoring of Advanced Tumors of the Gastrointestinal Tract, Lung, Breast and Ovaries. *Anticancer Research*, 37(7), 3649–3656. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.11735>

Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., Baehner, F., Dabbs, D. J., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Richardson, A. L., Schnitt, S. J., Schmitt, F. C., Tan, P.-H., Tse, G. M., Badve, S., & Ellis, I. O. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Research : BCR*, 12(4), 207. <https://doi.org/10.1186/bcr2607>

Sawaki, M., Shien, T., & Iwata, H. (2019). TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 49(3), 228–231. <https://doi.org/10.1093/jco/hyy182>

Study, A. O., & Al-bayati, M. R. (2018). Utility of CA 15-3 in diagnosis of Breast Cancer Recurrence . *Al-Qadisiyah University*, 14(25), 41–49. https://qmed.iraqjournals.com/article_162770.html

Svobodova, S., Kucera, R., Fiala, O., Marie, K., Narsanska, A., Zedníková, I., Treska, V., Slouka, D., Milena, R., Topolcan, O., & Finek, J. (2018). CEA, CA 15-3, and TPS as Prognostic Factors in the Follow-up Monitoring of Patients After Radical Surgery for Breast Cancer. *Anticancer Research*, 38(1), 465–469. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.12245>

Tarighati, E., Keivan, H., & Mahani, H. (2022). A review of prognostic and predictive biomarkers in breast cancer. In *Clinical and Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s10238-021-00781-1>

The Global Cancer Observatory. (2020). Estimated number of new cases in 2020, Mexico, both sexes, all ages. *World Health Organization*, 291, 1. <http://gco.iarc.fr/today>

Tian, W., Zhou, Y., Wu, M., Yao, Y., & Deng, Y. (2019). Ovarian metastasis from breast cancer: a comprehensive review. In *Clinical and Translational Oncology* (Vol. 21, Issue 7, pp. 819–827). <https://doi.org/10.1007/s12094-018-02007-5>

Weaver, O., & Leung, J. W. T. (2018). Biomarkers and Imaging of Breast Cancer. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 210(2), 271–278. <https://doi.org/10.2214/AJR.17.18708>

Wolff, A. C., Elizabeth Hale Hammond, M., Allison, K. H., Harvey, B. E., Mangu, P. B., Bartlett, J. M. S., Bilous, M., Ellis, I. O., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., McShane, L. M., & Dowsett, M. (2018). Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/ college of American pathologists clinical practice guideline focused update. *Journal of Clinical Oncology*, 36(20), 2105–2122. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.8738>

Zhao, S., Mei, Y., Wang, Y., Zhu, J., Zheng, G., & Ma, R. (2015). Levels of CEA, CA153, CA199, CA724 and AFP in nipple discharge of breast cancer patients. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(11), 20837. /pmc/articles/PMC4723853/

Zhao, W., Li, X., Wang, W., Chen, B., Wang, L., Zhang, N., Wang, Z., & Yang, Q. (2021). Association of Preoperative Serum Levels of CEA and CA15-3 with Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Disease Markers*, 2021, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/5529106>