

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Vitória Camile da Silva Santos

**A EPIGENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA: O PAPEL DOS miRNAs E DA
METILAÇÃO DO DNA**

São Paulo

2023

Vitória Camile da Silva Santos

**A EPIGENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA: O PAPEL DOS miRNAs E DA
METILAÇÃO DO DNA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof^ª. Dra. Marjorie Mendes Marini e Souza, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2023

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Santos, Vitória Camile da Silva

A epigenética do câncer de mama: o papel dos mirnas e da metilação do DNA / Vitória Camile da Silva Santos. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.

54 p.

Orientação de Marjorie Mendes Marini e Souza.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2023.

1. Medicina concierge 2. Metilação 3. MicroRNAs 4. Neoplasias da mama I. Souza, Marjorie Mendes Marini e II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 573.21

Vitória Camile da Silva Santos

**A EPIGENÉTICA DO CÂNCER DE MAMA: O PAPEL DOS miRNAs E DA
METILAÇÃO DO DNA**

São Paulo, 25 de Outubro de 2023.

Professora orientadora (Marjorie Mendes Marini e Souza)

Professor examinador (Heder Frank Gianotto Estrela)

Banca externa (Thafne Plastina Astro)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer a Deus, que tanto me oferta e suporta.

Toda minha família merece meus agradecimentos, por todo apoio e dedicação para que eu cumprisse esta jornada. Minha mãe, Maria, em especial, é minha referência de força e determinação, em quem eu sempre me inspirei para concluir o que fosse necessário, inclusive este projeto.

Amigos especiais foram essenciais durante este processo: Bianca, que viveu comigo os desafios da graduação, me acompanhou, amparou e acalmou; Roger, que por toda a vida compartilhou dos meus sonhos e expectativas, acreditou no meu potencial e, principalmente, o estimulou; E Luiz, meu namorado, que esteve comigo nos dias difíceis e nos dias gloriosos, se preocupou, participou e tornou mais leves os momentos de tensão.

À minha professora e orientadora, Marjorie, que se disponibilizou a me acompanhar nesta trajetória. Esclareceu ideias complicadas com calma e destreza, muita didática e admirável bagagem científica. Além de todos os meus professores, que tiveram contribuições essenciais para minha formação acadêmica.

Ao professor Heder e à professora Thafne, que compuseram a banca avaliadora durante minha apresentação e contribuíram consideravelmente para lapidação deste trabalho.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

A metodologia de pesquisa adotada neste projeto foi a revisão bibliográfica narrativa, com foco para artigos científicos publicados principalmente nas bases de dados PubMed e Scielo entre os anos de 2010 e 2023. A estimativa para a incidência do câncer de mama em 2023 no Brasil foi de 73.610 casos. Isso corresponde uma taxa de incidência ajustada de 41,89 casos a cada 100.000 mulheres brasileiras. Apesar de muitos estudos na área, devido a heterogeneidade da doença, o tratamento e acompanhamento ainda é de difícil assertividade. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi a discussão do papel da epigenética numa abordagem personalizada do acompanhamento e tratamento. O desenvolvimento, em concordância com o objetivo, foi pautado em tópicos importantes para a garantia de melhores resultados e qualidade de vida à paciente. Nos últimos anos, a ciência tem explorado os mecanismos epigenéticos do câncer de mama, o que tem se mostrado promissor para ampliar a aplicação da medicina personalizada, através do conhecimento das características moleculares da doença. Assim, como considerações finais, foi possível entender que, pesquisando o câncer a nível molecular, a ciência evidenciou que manifestações clínicas e tipos histológicos não são informações suficientes para fornecer o melhor apoio médico ao tratamento do câncer de mama, pois os mecanismos epigenéticos como a metilação e os miRNAs têm participação importante em casos esporádicos da doença, não hereditários e não relacionados à mutação. Dessa forma, nos últimos anos essa área tem contribuído consideravelmente para melhoria da qualidade de vida das pacientes, possibilitando melhor direcionamento do tratamento medicamentoso por subtipo tumoral, de forma personalizada e precisa.

Palavras-chave: câncer de mama; medicina personalizada; miRNA; metilação.

ABSTRACT

The research methodology adopted in this project was a narrative bibliographic review, focusing on scientific articles published mainly in the PubMed and Scielo databases between 2010 and 2023. The estimate for the incidence of breast cancer in 2023 in Brazil was 73,610 cases. This corresponds to an adjusted incidence rate of 41.89 cases per 100,000 Brazilian women. Despite many studies in the area, due to the heterogeneity of the disease, treatment and monitoring are still difficult to assert. In this context, the objective of the work was to discuss the role of epigenetics in a personalized approach to monitoring and treatment. The development, in accordance with the objective, was based on important topics to guarantee better results and quality of life for the patient. In recent years, science has explored the epigenetic mechanisms of breast cancer, which has shown promise for expanding the application of personalized medicine, through knowledge of the molecular characteristics of the disease. Thus, as final considerations, it was possible to understand that, researching cancer at a molecular level, science has shown that clinical manifestations and histological types are not enough information to provide the best medical support for the treatment of breast cancer, as epigenetic mechanisms such as Methylation and miRNAs play an important role in sporadic cases of the disease, not hereditary and not related to mutation. Thus, in recent years this area has contributed considerably to improving patients' quality of life, enabling better targeting of drug treatment by tumor subtype, in a personalized and precise manner.

Keywords: breast cancer; personalized medicine; miRNA; methylation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número estimado de mortes em 2020, Mundo, Mulheres, Todas as idades.....	18
Figura 2 - Sinais e sintomas do câncer de mama.....	20
Figura 3 - Sigla para Breast Imaging Reporting and Data System.....	21
Figura 4 - Regulação do Ciclo celular: CDKs, Ciclinas e Inibidores.....	24
Figura 5 - Influência dos miRNAs e da metilação do DNA nos pontos de controle de expressão.....	26
Figura 6 - Estrutura química da citosina e esquema do processo de metilação catalisado por DNMT.....	27
Figura 7 - Distribuição de correlações negativas e positivas significativas entre a expressão gênica e o estado de metilação do DNA em diferentes regiões gênicas.....	29
Figura 8 - Correlação entre a metilação do DNA e a expressão gênica dos oito genes selecionados para construção do modelo de pontuação de prognóstico.....	31
Figura 9 - Biogênese canônica de microRNAs.....	32
Figura 10 - Ligação do miRNA maduro ao 3'-UTR complementar do mRNA direcionado.....	33
Figura 11 - Genes BRCA.....	37
Figura 12 - Perfil molecular dos tumores de mama.....	39

Figura 13 - Inmuno-histoquímica de carcinoma de mama invasivo luminal A.....	42
Figura 14 - Inmuno-histoquímica de carcinoma de mama invasivo luminal B.....	43
Figura 15 - Inmuno-histoquímica de carcinoma de mama invasivo HER2.....	44
Figura 16 - Inmuno-histoquímica de carcinoma de mama invasivo triplo negativo.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resumo dos complexos ciclina/CDKs.....	23
TABELA 2 - Correlações significativas entre metilação de regiões gênicas e nível de expressão entre genes prognósticos.....	30
TABELA 3 - Tipos selecionados de miRNAs no câncer de mama com sua função na progressão da doença.....	34
TABELA 4 - Resumo de painéis de miRNAs testados em LB para diagnóstico precoce de CM com sensibilidade acima de 90%.....	36
TABELA 5 – Perfis imunofenotípicos dos subtipos moleculares.....	40
TABELA 6 - Painéis de miRNA por subtipo tumoral.....	41
TABELA 7 - Painéis de miRNA por presença de receptor.....	41
TABELA 8 - Genes aberrantemente hipermetilados envolvidos na resistência a drogas em BC.....	47

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AGO2 - Argonauta 2;

BI-RADS - *Breast Imaging-Reporting and Data System*;

BRCA - *Breast Cancer Gene*;

CDC - *Cell Division Cycle 6*;

CDKs - Quinase Dependentes de Ciclina;

cfDNA - DNA Livre das Células;

CK5 - Citoceratina 5;

CM - Câncer de Mama;

ctDNA - DNA Tumoral Circulante;

DNA - Ácido Desoxirribonucleico;

DNMT - *DNA Methyltransferase*;

ECmiRNAs - miRNA Circulantes;

EV-mRNA - RNA Extracelular Encapsulado por Vesículas;

HER2 - *Human Epidermal Growth factor Receptor Type 2*;

miRNA - micro RNA;

mRNA- RNA Mensageiro;

PCR MSP - *Methylation Specific polymerase chain reaction*;

RB - Retinoblastoma;

RE - Receptor de Estrogênio;

RH - Receptor Hormonal;

RISC - *RNA Induced Silencing Complex*;

RNA - *Ácido Ribonucleico;*

RP - *Receptor de Progesterona;*

TGFBI - *Transforming Growth Factor Beta Induced;*

TNRC6 - *Trinucleotide Repeat Containing 6;*

TSS - *Transcription Start Site;*

UTR - *Untranslated Region.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO.....	16
3 METODOLOGIA.....	17
4 DESENVOLVIMENTO.....	18
4.1 O CÂNCER DE MAMA.....	16
4.2 O CICLO CELULAR.....	21
4.3 A EPIGENÉTICA: METILAÇÃO E miRNA.....	25
4.3.1 Metilação do DNA.....	27
4.3.2 miRNAs.....	32
4.4 EPIGENÉTICA: GENES SUPRESSORES DE TUMOR E ONCOGENES.....	36
4.5 OS SUBTIPOS DE TUMORES DE MAMA.....	38
4.5.1 Subtipos RH+ e HER2-/.....	41
4.5.2 Subtipos RH- e HER2+.....	44
4.5.3 Subtipos RH- e HER2-.....	45
4.6 TRATAMENTO DIRECIONADO POR CARACTERÍSTICAS MOLECULARES...	46
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é um dos mais comuns e mais diagnosticados entre as mulheres no mundo, apresentando ainda alto índice de mortalidade. Essa neoplasia, na maior parte das vezes, é causada por um tumor esporádico, o qual não tem relação com uma mutação específica, mas sim com uma alteração de regulação epigenética no gene (Rodrigues *et al.*, 2019).

Nesse sentido, quando falamos em metilação do DNA, é possível estabelecer uma relação com o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama, uma vez que a metilação se associa inversamente à capacidade transcricional do gene, especialmente em genes supressores de tumor, de modo que são menos transcritos quando estão intensamente metilados e, assim, não exercem sua função primária, aumentando a propensão ao desenvolvimento de tumor. Nesse caso, a hipermetilação desses genes causa o silenciamento deles, enquanto a hipometilação de oncogenes leva a sua hiperexpressão. Logo, genes supressores de tumor intensamente metilados são silenciados e, por isso, podem servir como biomarcadores no diagnóstico e prognóstico do câncer de mama. (Wu, Tang, Zhou, 2021).

Os genes BCRA1 e BCRA2 são supressores de tumor e desempenham a função de impedir que células normais se transformem em células tumorais, codificando proteínas as quais estão envolvidas no reparo de quebras da molécula de DNA. O BCRA1 está localizado no cromossomo 17 e está relacionado com a ativação de checkpoint e reparo de quebras de DNA, já o BCRA2 está localizado no cromossomo 13 e age no controle do mecanismo de recombinação homóloga. Assim, quando transcritos, ambos os genes são capazes de gerar proteínas que garantem proteção ao genoma através dos reparos e das respostas aos danos no DNA, por isso, a metilação desses genes compromete a sobrevivência da paciente (Rodrigues *et al.*, 2019).

Além disso, o papel dos miRNAs na busca de biomarcadores para um tratamento mais individualizado também merece destaque para aplicação à medicina personalizada, uma vez que estão relacionados com o prognóstico e

direcionamento terapêutico para a neoplasia. Trata-se de sequências mais curtas de RNAs não codificadores, que podem ligar-se ao mRNA e encaminhá-lo ao seu destino: silenciamento pós-transcricional ou degradação, exercendo assim papel crucial para manutenção do ciclo celular e homeostase (Davey *et al.*, 2021).

Os miRNAs podem atuar em diferentes funções biológicas: desenvolvimento, proliferação, diferenciação e morte celular. A desregulação dos miRNAs pode discriminar diferentes subtipos de câncer de mama, estando associada ao seu avanço desde a tumorigênese até a metástase. Além disso, eles podem ser usados como alvos para o desenvolvimento de novas terapias, levando-se em consideração que podem prever a resposta do CM a tratamentos sistêmicos, a depender do seu status de expressão (Rodrigues *et al.*, 2019).

Dessa forma, o entendimento da epigenética mostra-se de grande importância para evolução do conhecimento científico acerca do câncer, oferecendo uma abordagem precisa e individualizada no contexto da medicina de precisão e permitindo que o acompanhamento e tratamento se tornem cada vez mais humanizados para as portadoras dessa condição. Certamente, a implantação da medicina personalizada como padrão de acompanhamento de pacientes com câncer requer novos estudos e investimentos, no entanto a regulação epigenética é um campo de estudo o qual tem muito para contribuir para o avanço científico (Bhat *et al.*, 2019).

2 OBJETIVO

Síntese, análise e discussão de informações relevantes sobre a epigenética do câncer de mama, abordando o papel dos miRNAs e da metilação do DNA para aplicação da medicina personalizada no estudo dessa neoplasia.

3 METODOLOGIA

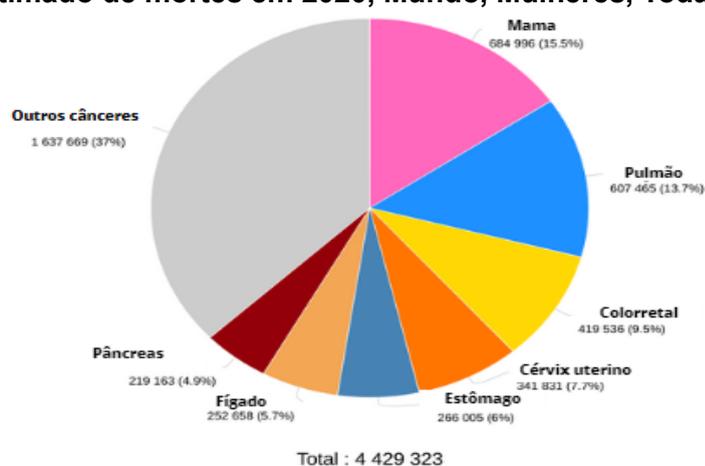
Este trabalho constitui uma revisão bibliográfica feita a partir da pesquisa de artigos publicados em português e inglês entre os anos de 2010 e 2023, encontrados nas bases de dados Pubmed e Scielo principalmente, utilizando-se as seguintes palavras-chave: Câncer de Mama, Epigenética, Medicina Personalizada, miRNA, Metilação. Ao todo, foram utilizadas 39 referências, em maioria artigos científicos, mas também sites governamentais de promoção à saúde, cujas informações foram cuidadosamente selecionadas para atender o objetivo do trabalho.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 O CÂNCER DE MAMA

Câncer, segundo o Instituto Nacional do Câncer, é um nome usado para denominar um conjunto de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. Assim, devido ao crescimento rápido e desordenado, essas células se tornam incontrolláveis e agressivas, formando tumores capazes de se espalhar por outras partes do corpo. Quando as células afetadas são de tecidos epiteliais, como é o caso do CM, o câncer se denomina carcinoma (INCA, 2022c). Este câncer em específico, é um dos mais incidentes entre as mulheres em todo o mundo, tendo como população de risco mulheres mais velhas, em média acima dos 50 anos de idade, sendo ainda a causa mais frequente de morte por câncer na população feminina (15,5% dos óbitos por câncer em mulheres em 2020, conforme a figura 1 abaixo). No entanto, atualmente, com uma melhor compreensão dos processos moleculares envolvidos no desenvolvimento da doença, tem sido possível o aprimoramento do tratamento personalizado. Assim, a sobrevivência de pacientes com essa condição tem melhorado consideravelmente (World Health Organization, 2020).

Figura 1 - Número estimado de mortes em 2020, Mundo, Mulheres, Todas as idades



Fonte: Adaptado de World Health Organization, 2020.

Nota: Em 2020, o câncer de mama foi a causa de morte de 15,5% das mortes por cancer em mulheres, um total de 684 996 óbitos.

Geralmente, o processo de carcinogênese, como é denominada a formação do câncer, costuma ser lento. Dessa forma, em alguns casos, leva-se anos até que uma célula alterada se prolifere a ponto de formar um tumor. Nesse sentido, para que um tumor se forme, o ciclo celular precisa ser alterado: inicialmente é necessário que alguma desordem seja estabelecida no organismo e modifique alguma sequência (em casos de mutação) ou atividade gênica (em caso de desregulação epigenética), essa primeira fase da formação do tumor é o estágio de iniciação, quando ainda não é possível detectar a doença clinicamente, mas a célula já é "iniciada" para o câncer. O próximo estágio é chamado de promoção, no qual a célula "iniciada" sofre a ação de agentes oncopromotores, como por exemplo hormônios, e em caso de exposição contínua ao agente, é transformada em célula maligna. O estágio seguinte é chamado de progressão e se caracteriza pela multiplicação incontrolável das células alteradas e formação do tumor (INCA, 2022a).

Os tumores correspondentes ao CM geralmente são de origem epitelial e se desenvolvem no interior dos ductos e lóbulos mamários. Sendo assim, como classificação histológica, existem os carcinomas *in situ* e os invasivos. O primeiro grupo se divide em carcinoma ductal *in situ*, o qual representa a maior parte dos carcinomas *in situ* e é constantemente detectado pela mamografia, e carcinoma lobular *in situ*, que é menos frequente, não está associado a calcificações ou reação estromal e é sempre um achado casual em uma biópsia realizada por outra razão. Já os carcinomas invasivos são adenocarcinomas, divididos em ductal infiltrativo, que representa a maior parte dos carcinomas invasivos, e lobular infiltrativo, menos comum que o anterior (FEMAMA, 2019a)

O início da doença costuma ser assintomático e o diagnóstico precoce é de extrema importância para um bom prognóstico e taxa de sobrevivência, para tanto, recomenda-se que o autoexame e os exames de rastreamento, como a mamografia, sejam feitos rotineiramente, uma vez que a prevenção é ainda um grande desafio (Sun *et al.*, 2017). A manifestação clínica mais conhecida desse tipo de câncer é o nódulo palpável, mas vale destacar outros sinais e sintomas que também são importantes para o diagnóstico precoce: retrações de pele e do mamilo, vermelhidão da pele, saída de secreção aquosa ou sanguinolenta pelo mamilo e ainda pequenos

nódulos palpáveis nas axilas e/ou pescoço. Podendo ocorrer ainda a inversão do mamilo, inchaço e/ou dor local. Os sinais e sintomas mais frequentes estão representados abaixo pela figura 2 (INCA, 2021).

Figura 2 - Sinais e sintomas do câncer de mama



Fonte: Autoria própria.

Nota: Nem sempre o nódulo será palpável, em mamas mais volumosas, por exemplo, pode ser mais difícil encontrar o nódulo durante o auto-exame. Os outros sinais físicos e sensoriais ilustrados se tornam importantes e extremamente úteis nestes casos.

Assim, é de grande importância a atenção pessoal aos sinais e sintomas, além da realização de consultas e exames de rastreamento rotineiramente. No que tange os exames de rastreamento, um ponto importante de se entender é a classificação bi-rads (Sistema Breast Imaging Reporting and Data System), que classifica exames como ultrassonografia, ressonância magnética e mamografia em em categorias de 0 a 6, demonstradas na figura 3 abaixo. Essa classificação, segundo o hospital o A.C Camargo, auxilia na investigação do câncer de mama, avaliando, em porcentagem, a possibilidade uma lesão encontrada ser ou não um câncer, mas não é capaz de avaliar o potencial de crescimento e nem o subtipo

tumoral. De modo geral, a classificação propõe uma impressão diagnóstica e fornece uma recomendação de períodos de tempo para a realização de novos exames.

Figura 3 - Sigla para Breast Imaging Reporting and Data System

Categoria	Impressão diagnóstica	Recomendação	Risco de câncer (%)
0	Exame inconclusivo	Complementar o estudo	Exame incompleto
1	Normal	Exame de rotina anual	0
2	Achado benigno	Exame de rotina anual	0
3	Achado provavelmente benigno	Realizar controle precoce (em 6, 12, 24 e 36 meses)	≤2
4	Achado suspeito	Prosseguir investigação: realizar biópsia	3 - 94%
5	Achado altamente suspeito	Prosseguir investigação: realizar biópsia	≥95
6	Achado investigado previamente e com resultado positivo (câncer)	Tratamento adequado	100

Fonte: A. C. Camargo Cancer Center, 2022.

Nota: A escala Bi-rads fornece apoio ao diagnóstico e tratamento do câncer de mama, possibilitando um acompanhamento com periodicidade adequada a cada caso, como forma de acompanhar o desenvolvimento de uma lesão mamária.

Desta forma, o CM é uma doença importante, prevalente no Brasil e no mundo, que apesar de muito estudada, ainda precisa de atenção científica devido sua heterogeneidade e letalidade acentuada. A medicina personalizada, como forma de focar no tratamento individual, precisa ser explorada e aplicada, tendo em vista que representa uma forma de melhorar a qualidade de vida das pacientes diagnosticadas (Rodrigues *et al.*, 2019).

4.2 O ciclo celular

O câncer, oriundo de um distúrbio na replicação celular, tem sua formação intimamente ligada ao ciclo celular, e este, por sua vez, é uma sequência organizada de eventos em que uma célula duplica seu conteúdo, possibilitando a passagem da

informação genética para a próxima geração de células. De forma geral, a principal função do ciclo celular é duplicar o DNA e segregar as cópias para as células filhas, uma vez que a única forma de formar uma nova célula é duplicando uma célula já existente. Desde que todas as etapas ocorram normalmente, a replicação das células não compromete a homeostase do organismo, porém, falhas em alguma etapa do ciclo celular de uma célula pode levar a sua multiplicação descontrolada, causando a formação de um tumor, por exemplo (Thu *et al.*, 2018).

Nesse sentido, o ciclo celular é composto geralmente por quatro fases: a G1, a Síntese, a G2 e Fase M, quando ocorre a mitose e a citocinese. A fase G1 corresponde ao momento de crescimento celular, é a mais longa do ciclo e, pode seguir para fase G0, o que significa que a célula ficará estagnada na fase G1, sem seguir as demais fases do ciclo celular. A fase S (síntese), sucede a fase G1 e corresponde ao momento de duplicação dos cromossomos da célula. A fase G2 sucede a fase de síntese e corresponde ao momento de síntese proteica, quando também ocorre crescimento celular e checagem dos processos que antecederam esta fase (Thu *et al.*, 2018).

O ciclo celular é bem regulado, uma vez que há um sistema de controle para desencadear os principais eventos, o mesmo conta com um conjunto de proteínas envolvidas e depende de sinais intra e extracelulares. O tempo de um ciclo celular também é regulado, com controle de cada uma das etapas, que precisam receber o chamado “start” para que sejam iniciadas, ou seja, há um mecanismo para assegurar que cada evento ocorra uma única vez e no momento certo, no modelo de sistema não binário, o que significa que eventos uma vez iniciados devem ser completos e irreversíveis. Esse sistema de controle do ciclo celular é dependente de proteínas-quinase dependentes de ciclina (CDKs) e funciona como uma rede de interruptores bioquímicos. A ciclina, ao formar um complexo com uma proteína quinase, a ativa para fosforilação de proteínas regulatórias do ciclo celular e promove a sua progressão. Nesse sentido, S-ciclins ajudam a estimular a replicação e M-ciclins estimulam o início da mitose (Thu *et al.*, 2018).

Diferentes ciclins e CDKs regulam as diferentes fases do ciclo celular, que costuma ser interrompido ou bloqueado por pontos de verificação, também

chamados de checkpoints, os quais acontecem para reparo de danos ao DNA. Dois desses pontos de verificação acontecem antes e depois da síntese de DNA, nas fases G1 e G2, via ponto de verificação quinase 2 (CHK2) e p53 na fase G1 ou via ponto de verificação quinase 1 (CHK1) na fase S ou G2 (Ding *et al.*, 2020).

Células que entram em estado quiescente, na fase G0, são reguladas pelo complexo ciclina C/CDK3. Células que não entram nessa fase ou as que estão em estado quiescente reversível recebem sinais extracelulares que levam à síntese de ciclina D e estimula CDK4/6, o que leva à entrada no ciclo celular. CDK4/6, quando ativa, leva à fosforilação da proteína RB e libera o fator de transcrição E2F, que por sua vez leva a expressão das ciclinas E, A e B. A ciclina E ativa a CDK2 e auxilia a fosforilação adicional da proteína RB e, assim, leva a célula para a fase S do ciclo celular. Chegando ao fim da síntese de DNA, a ciclina E é removida pela ciclina A, para formação do complexo ciclina A/CDK2, o qual fosforila CDC6 e E2F1, levando ao fim da fase S e conduzindo a transição para a fase G2. Após isso, a CDK1 é ativada pela ciclina A, o que leva a célula à fase M e esta fase é regulada pelo complexo ciclina B/CDK1. A inativação da CDK1 permite a separação cromossômica e a conclusão da citocinese. Esses complexos ciclina/CDK e seus respectivos estágios de atuação no ciclo celular estão demonstrados na tabela 1 a seguir (Ding *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Resumo dos complexos ciclina/CDKs.

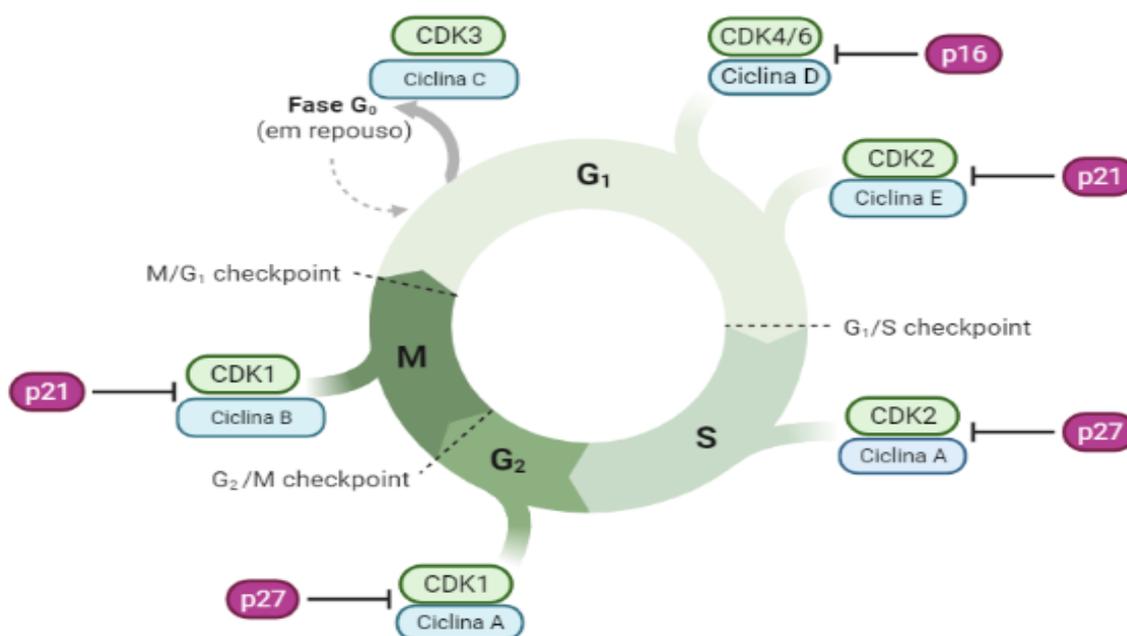
Complexo	Estágio do Ciclo
Ciclina C/CDK3	Fase G0
Ciclina D/CDK4/6	Progressão G1
Ciclina E/CDK2	Entrada S
Ciclina A/CDK2	Progressão S
Ciclina A/CDK1	Progressão G2
Ciclina B/CDK1	Fase M

Fonte: Autoria própria.

Nota: Para que o ciclo celular aconteça de maneira adequada, os conjuntos de ciclina/CDK precisam funcionar como uma rede de interruptores bioquímicos. Eles controlam o início e o fim de cada fase, garantindo que ocorram na ordem certa e que sejam corretamente finalizadas.

Quando há a perda do controle do ciclo celular, as células com informações genéticas defeituosas podem se dividir e proliferar, levando ao câncer, caso não haja um mecanismo de reconhecimento e interrupção desse erro. Como forma de interromper a proliferação dessas células, temos os inibidores do ciclo, que inclusive podem ser utilizados como terapia alvo no tratamento de alguns subtipos do câncer de mama. Nesse sentido, os inibidores INK4 (p15, p16, p18 e p19), CIP/KIP (p21, p27 e p57) e CDK4/6 (palbociclib, ribociclib e abemaciclib) inibem a atividade dos complexos CDK/ciclina. Parte desse processo fisiológico está representado pela figura 4 abaixo (Ding *et al.*, 2020).

Figura 4 - Regulação do Ciclo celular: CDKs, Ciclinas e Inibidores



Fonte: Autoria própria.

Nota: As fases do ciclo celular devem acontecer em ordem, no tempo certo e todos os seus eventos precisam ser finalizados após iniciados, ocorrendo uma única vez. Os Inibidores do ciclo regulam as suas fases, promovendo a inativação dos complexo ciclina/CDK, para que a próxima fase do ciclo prossiga.

Dessa forma, o entendimento do ciclo celular é importante quando se busca entender a formação dos tumores de mama, tendo em vista que falhas no ciclo podem comprometer as células e sua proliferação. Além disso, o uso dos inibidores

do ciclo para tratamento tem sido benéfico para as portadoras do câncer, desde que se defina o subtipo molecular do tumor a ser tratado, visto que essa não é a primeira escolha para todos eles. Entender o funcionamento habitual do ciclo celular é importante quando se estuda a multiplicação descontrolada de células tumorais. Por isso, a medicina personalizada entra novamente como ponto chave para a objetividade no acompanhamento de cada caso da doença (Ding *et al.*, 2020; Thu *et al.*, 2018).

4.3 A epigenética: Metilação e miRNA

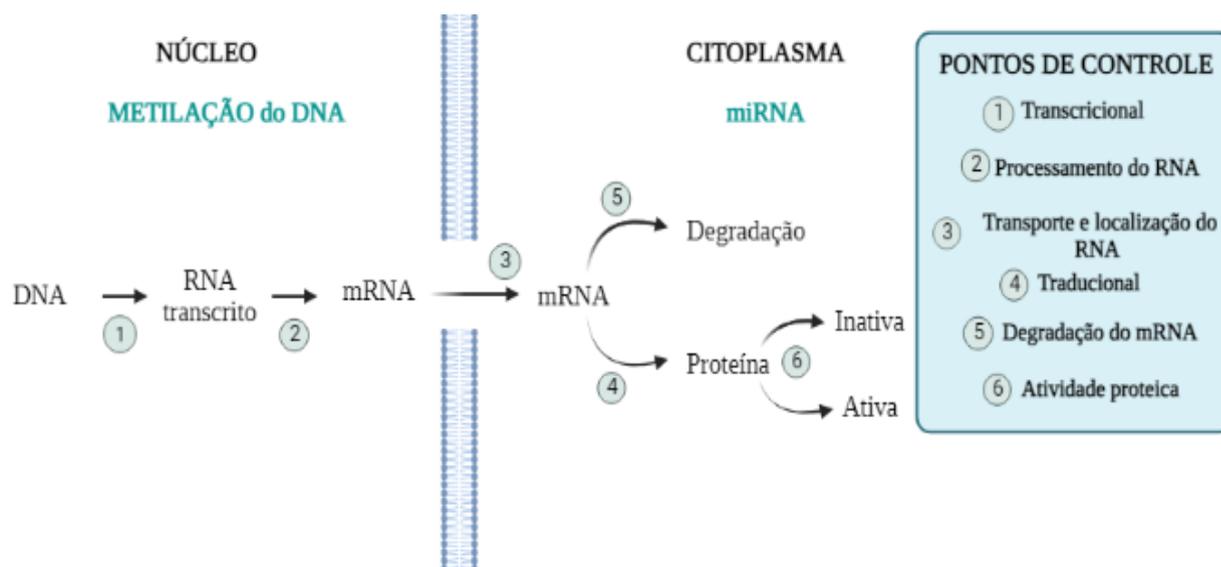
A epigenética é um conjunto de processos capazes de alterar a atividade gênica sem modificar a sequência de DNA. Atualmente, a maior parte dos casos de CM são de tumores esporádicos, que são aqueles os quais não têm relação com hereditariedade, mas sim com fatores externos, como a regulação epigenética, não estando relacionados com mutações específicas. Logo, tumores esporádicos decorrem de eventos não mutacionais, em especial desregulação nos miRNAs e na metilação de proto-oncogenes e genes supressores tumorais (Rodrigues *et al.*, 2019).

De modo geral, os proto-oncogenes são genes presentes fisiologicamente em nossas células, que atuam na regulação do crescimento e diferenciação celular. Estes genes, quando hipometilados, dão origem aos oncogenes, que por sua vez são responsáveis pela transformação da célula saudável em cancerosa, em um contexto epigenético. Em contrapartida, os genes supressores tumorais são responsáveis por retardar a divisão celular, reparar erros no DNA e indicar o momento exato da célula entrar em apoptose. Estes genes, quando hipermetilados, deixam de exercer a função de inibição da proliferação das células cancerosas, devido sua inativação, o que propicia a formação do tumor (Davey *et al.*, 2021)

Nesse sentido, pensando nos mecanismos epigenéticos expostos acima, todos eles fazem parte do controle da expressão gênica em eucariotos, como mostra a figura 5 abaixo, e quando alterados podem se associar ao desenvolvimento da doença, desde a tumorigênese até a metástase, levando a formação de tumores que podem ser classificados de acordo com as suas características moleculares,

conforme demonstrado na figura 12 (Davey *et al.*, 2021). Infelizmente, são inúmeros os fatores de risco para o desenvolvimento do tumor esporádico, como sexo, envelhecimento, reposição hormonal e contracepção, estilo de vida pouco saudável e afins, todos eles capazes de iniciar um célula saudável para seguir os demais estágios mencionados anteriormente (INCA, 2022b).

Figura 5 - Influência dos miRNAs e da metilação do DNA nos pontos de controle de expressão



Fonte: Autoria Própria.

Nota: O controle da expressão gênica em eucariotos é complexo e ocorre em algumas etapas, chamadas de ponto de controle. Tanto os miRNAs quanto a metilação do DNA podem interferir nesses pontos de controle, de forma que, a depender da alteração que causam, interferem na atividade proteica do gene transcrito. A metilação do DNA, ainda no núcleo celular, pode definir se um gene será ou não transcrito. Os miRNAs, no citosol da célula, podem interferir na tradução do mRNA para um proteína ativa ou inativa.

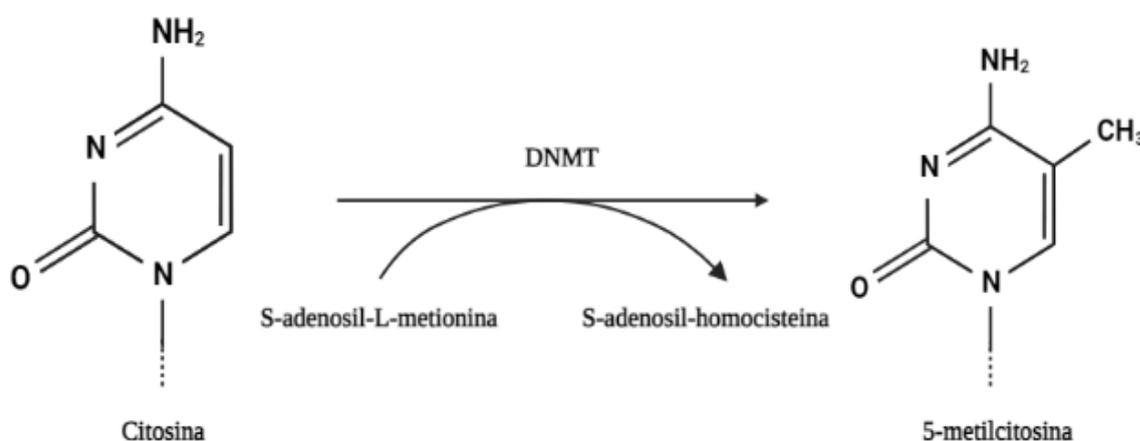
Assim, como ilustrado acima, a metilação do DNA pode, no núcleo celular, interferir no controle transcricional e de processamento do mRNA. Dessa forma, é capaz de alterar a atividade gênica e, conseqüentemente, alguma função no organismo também será alterada. O desfecho vai depender do gene em questão e do seu papel fisiológico alterado. De modo semelhante, os miRNAs também podem interferir em pontos de controle da expressão gênica em eucariotos, mas nesse caso acontece no citoplasma da célula, com o no mRNA já transcrito, ou seja, pode haver interferência no controle traducional e etapas seguintes. Dessa forma, é reforçada a

importância do contexto molecular no estudo do câncer de mama: tanto a metilação do DNA quanto os miRNAs podem atuar como biomarcadores para aplicação da medicina personalizada, auxiliando no diagnóstico e prognóstico (Davey *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2019).

4.3.1 Metilação do DNA

Nesse sentido, como esquematizado na figura 6, a metilação é um mecanismo que leva a transferência de um grupo metil para a posição C5 da citosina para formar 5-metilcitosina, através de uma enzima chamada de DNA metiltransferase (DNMT), responsável por metilar as ilhas CpG localizadas na região promotora. Dessa forma, quanto mais grupos metis são ligados às citosinas do DNA, mais inativo ele fica, por isso o gene metilado não é transcrito (Lewandowska, Bartoszek, 2011).

Figura 6 - Estrutura química da citosina e esquema do processo de metilação catalisado por DNMT



Fonte: Autoria própria.

Nota: Transformação da Citosina em 5-metilcitosina, através da metilação no carbono C5. Processo possível pela ação da enzima DNMT.

As alterações de metilação do DNA preponderam no CM esporádico, alterando o grau de expressão dos genes e, desta maneira, interfere em diferentes processos, tais como: diferenciação celular, controle da transcrição, reparação do

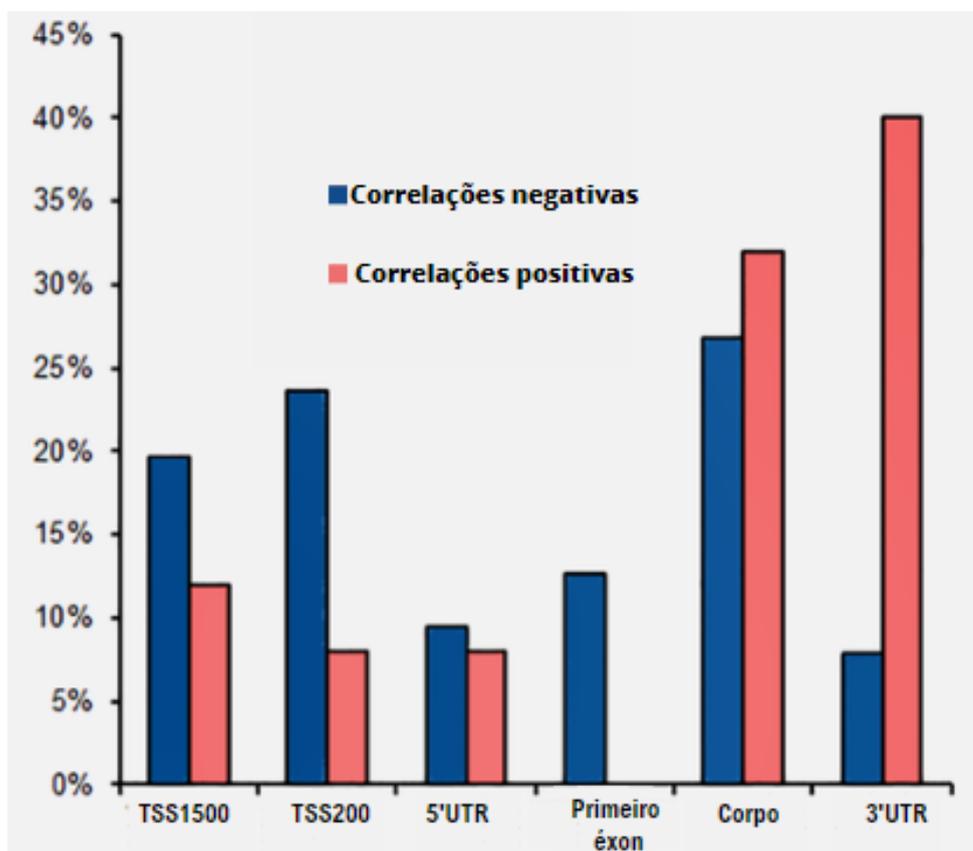
DNA, controle do ciclo celular, adesão celular, apoptose e metabolismo da célula. Essas alterações podem ocorrer devido a hipometilação global do DNA ou hipermetilação de regiões específicas (Jeschke, Collignon, Fuks, 2015).

De modo geral, a metilação do DNA tem importância no desenvolvimento do câncer de mama, desde a carcinogênese até a progressão do tumor, ou seja, compromete a homeostase. Assim, tanto a hipometilação quanto a hipermetilação podem contribuir para o curso da doença, a depender da situação envolvida. (Wu, Tang, Zhou, 2021). Nesse sentido, a hipometilação é esperada para regiões pobres em genes, raramente acontecendo em genes promotores, onde é mais comum o fenômeno de hipermetilação, que leva a menor expressão de tais genes (Jeschke, Collignon, Fuks, 2015).

Uma meta-análise em larga escala publicada em por Györfy *et al.* (2016) identificou vários genes cuja metilação pode estar ligada ao prognóstico no CM como forma de biomarcadores. O estudo analisou o valor prognóstico de 144 genes metilados em diferentes subtipos moleculares do CM (ER+/HER2-, HER2+ e ER-/HER2-) abordados no item 4.5 do presente trabalho. Foi analisada também a correlação entre a metilação do DNA e a expressão gênica em 104 pacientes com o câncer, de forma que foi possível demonstrar que 88 dos 144 genes totais têm sua expressão significativamente relacionada à metilação em pelo menos uma região gênica, além disso, demonstrou-se também que a expressão de um gene pode depender do nível de metilação de diversas regiões gênicas diferentes.

Na figura 7 abaixo, está esquematizado graficamente, em porcentagem, o que se observou na correlação positiva e negativa entre a metilação do DNA por região gênica e a expressão gênica. Neste caso, o status de metilação de 127 regiões gênicas se correlacionou negativamente com a expressão de 67 genes, enquanto a metilação de 50 regiões gênicas se correlacionou positivamente à expressão de 38 genes.

Figura 7 - Distribuição de correlações negativas e positivas significativas entre a expressão gênica e o estado de metilação do DNA em diferentes regiões gênicas



Fonte: Adaptado de Györfy *et al.*, 2016.

Nota: A maior parte das correlações negativas se concentrou nas regiões TSSs metiladas, já as correlações positivas se concentraram nas regiões 3'UTR.

Nesse sentido, aproximadamente 40% das correlações negativas foram encontradas nas regiões TSSs metiladas, enquanto somente cerca de 20% das correlações positivas se deviam à metilação dessas regiões. As correlações positivas foram mais encontradas nas regiões 3'UTR metiladas (cerca de 40%) e foram ausentes quando em relação à metilação do primeiro éxon (Györfy *et al.*, 2016).

Na mesma meta-análise, um banco de dados foi construído para análise transcriptômica para estudo da relação entre a metilação de alguns genes e o prognóstico do câncer de mama, a partir de estudos envolvendo pelo menos 30 pacientes e, para cada um delas, os status de RE e HER2 foram determinados por *microarray*. Assim, foi analisada a correlação entre metilação e expressão de genes

prognósticos. Foram identificados 48 genes prognósticos, dos quais 32 tinham seu grau de expressão relacionado com a metilação de pelo menos uma região gênica; 23 destes genes foram prognósticos para o subtipo RE+/HER2-, alguns dos exemplos são: BRCA1, CDO1, CHD9, CKM, DAAM1, entre outros descritos na meta-análise; Os genes CD3G , CD79B , ICOS e LCK se correlacionam significativamente a sobrevida de pacientes com o subtipos RE-/HER2-; O trabalho identificou outros genes prognósticos relacionados a diferentes subtipos do câncer de mama, os mesmos constam na Tabela 2 abaixo, que foi adaptada para demonstrar estas relações gene prognóstico/subtipo mais detalhadamente (Györfy *et al.*, 2016).

Tabela 2 - Correlações significativas entre metilação de regiões gênicas e nível de expressão entre genes prognósticos

Subtipo Tumoral	Genes Prognósticos
RE+/HER2-	BRCA1, CDO1, CHD9, CKM, DAAM1, DIRAS3, ETS1, FAM110A, FANCC, FLRT2, FOXC1, GBE1, LAMA1, SFRP1, STMN1, SYDE1, TAC1, TUBB3 e UBASH3A
RE+/HER2- e RE-/HER2-	KLK10 e PTCH1
RE-/HER2-	CD3G, CD79B, ICOS, LCK e PPP2R2B
RE-/HER2- e HER2+	CD3D, HCLS1, HLA-A e SIT1
RE+/HER2-, RE-/HER2- e HER2+	CD6 e LAX1

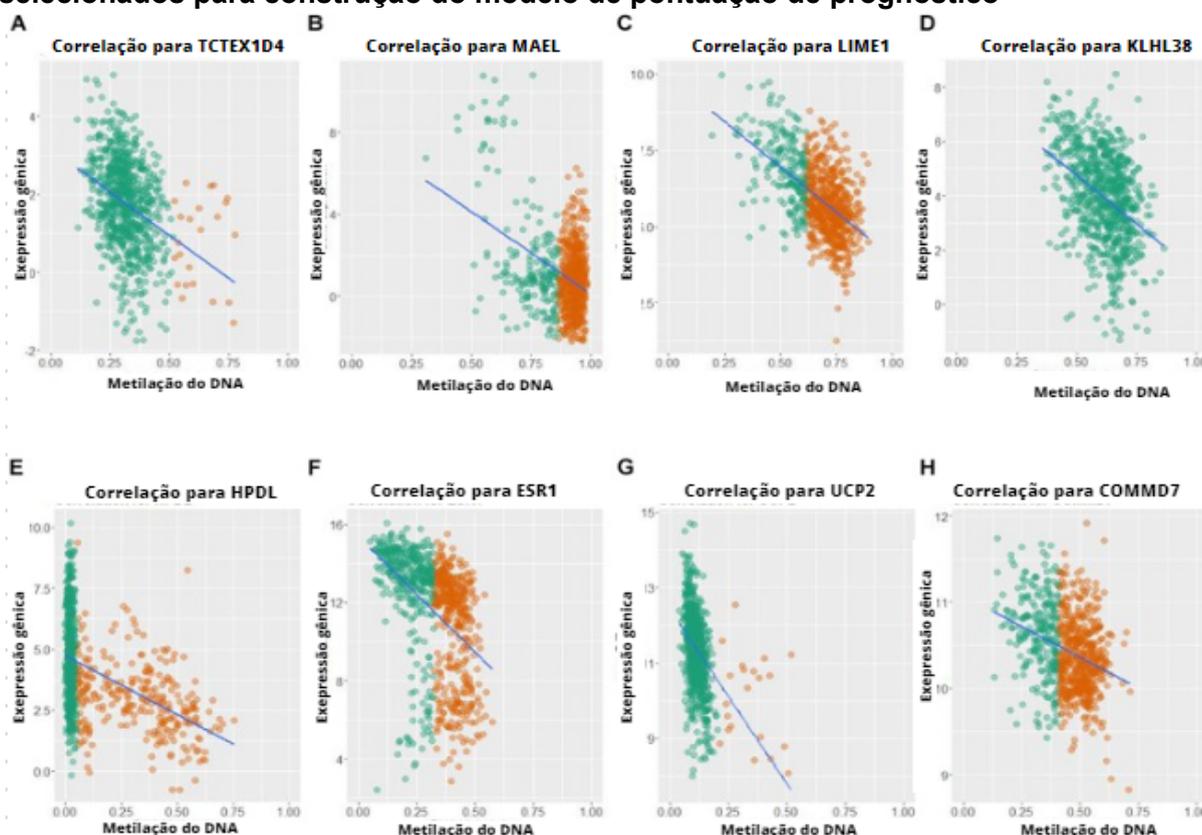
Fonte: Adaptado de Györfy *et al.*, 2016.

Nota: A metilação de alguns genes ocorre com frequência em diferentes subtipos tumorais. São chamados genes prognósticos, sua metilação apresenta correlação com seu nível de expressão.

Outro estudo, publicado por Kuang *et al.* (2020), identificou um outro painel de oito genes prognósticos para o câncer de mama, sendo eles: TCTEX1D4 , MALE, LIME1 , KLHL38 , HPDL , ESR1 , UCP2 e COMMD7. O estudo confirmou que não há relação direta entre a assinatura de metilação dos genes, e construiu gráficos como os da figura 8 abaixo para demonstrar a correlação entre a assinatura de metilação dos oito genes e seu grau de expressão, sendo que os pontos verdes representam a hipometilação, enquanto os pontos em laranja representam a

hipermetilação. Na imagem, conforme aumenta-se a metilação, diminui-se a expressão de todos os genes.

Figura 8 - Correlação entre a metilação do DNA e a expressão gênica dos oito genes selecionados para construção do modelo de pontuação de prognóstico



Fonte: Adaptado de KUANG *et al.*, 2020.

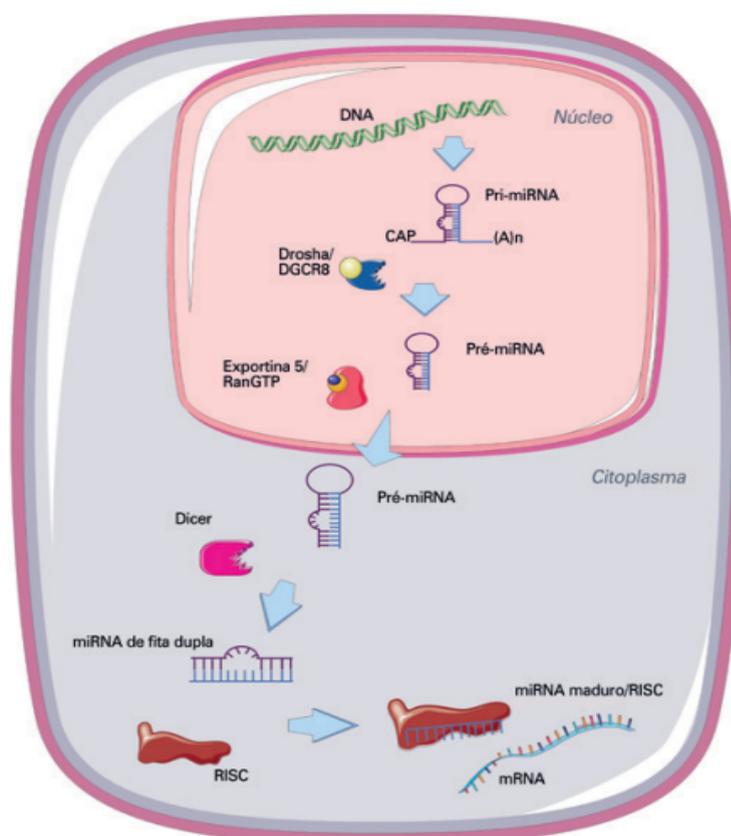
Nota: A expressão gênica foi inversamente proporcional à metilação do DNA em todos os gráficos apresentados, ou seja, todos os genes tiveram sua expressão reduzida com o aumento da metilação.

Assim, é possível reforçar o fato de que a análise da metilação do DNA é de grande valia para aplicação da medicina personalizada. Os painéis de metilação são capazes de identificar biomarcadores. O avanço da biologia molecular vem possibilitando, como declarado também por Kuang *et al.* (2020), o início de uma era revolucionária para o tratamento do câncer de mama, de forma personalizada e precisa.

4.3.2 miRNAs

Os miRNAs, são sequências curtas de RNAs não codificadores que regulam a expressão gênica pelo bloqueio ou indução da tradução de mRNAs. Dessa forma, podem atuar com papéis similares ao dos genes supressores de tumor, quando bloqueiam a tradução de proteínas de efeito oncogênico, e dos oncogenes, quando induzem a tradução destas proteínas. Sendo assim, considerados importantes biomarcadores durante a pesquisa e tratamento da doença. São encontrados nas superfícies dos tumores, no entanto, também existem os circulantes que se mostram alterados desde o início da formação do tumor e podem ser encontrados em saliva, soro, plasma e urina, por exemplo, possibilitando a realização de biópsias líquidas (BL). (Cava, Bertoli, Castiglioni, 2015; Weidle *et al.*, 2018; Zubor *et al.*, 2018).

Figura 9 - Biogênese canônica de microRNAs

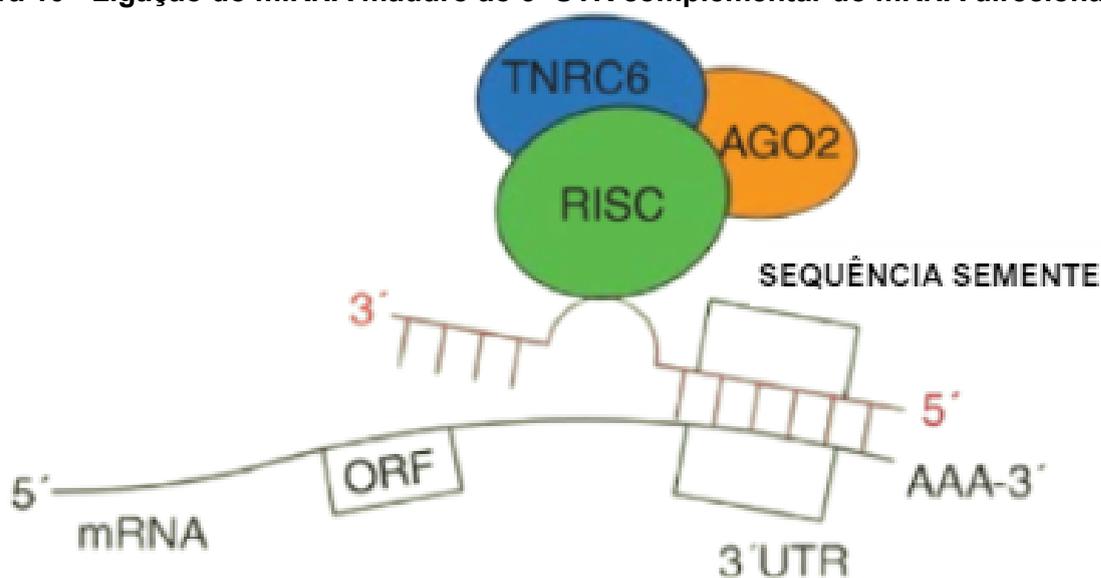


Fonte: Jorge *et al.*, 2021.

Nota: A biogênese canônica do miRNA conta com algumas etapas, dentre elas há a formação de: Pri-miRNA, Pré-miRNA, miRNA dupla fita e miRNA maduro.

A síntese dos miRNAs pela via canônica é a mais estudada atualmente e se inicia no núcleo celular, onde são primeiramente traduzidos como pri-miRNAs, como mostra a figura 9 acima. A enzima nuclear Drosha é responsável pelo processamento da molécula e sua transformação em pré-miRNA, uma molécula menor que é exportada para o citoplasma com auxílio da exportina-5. No citoplasma da célula, a enzima Dicer é responsável pelo processamento do pré-miRNA, o que gera a molécula de miRNA de dupla fita, capaz de se acoplar ao complexo protéico silenciador induzido por RNA (RISC) que contém as proteínas AGO e TNRC6. Quando ocorre essa associação, as duas fitas do RNA de dupla fita são separadas e, dessa forma, o miRNA fica em sua forma madura, capaz de ligar-se a mRNAs para a inibição da sua tradução (Jorge *et al.*, 2021). Nesse sentido, o miRNA se liga ao mRNA devido a complementariedade entre a “sequência semente” do miRNA, contendo entre 2 a 8 pares de base e localizada na sua extremidade 5’, e a região 3’UTR do mRNA alvo, processo ilustrado na figura 10 abaixo (Zubor *et al.*, 2018).

Figura 10 - Ligação do miRNA maduro ao 3'-UTR complementar do mRNA direcionado



Fonte: Adaptado de ZUBOR *et al.*, 2018.

Nota: A ligação do miRNA ao mRNA se dá pelo pareamento da sequência semente do miRNA à região 3'UTR do mRNA.

Como demonstrado anteriormente pelas figuras 5 e 10, os miRNAs possuem papel importante para o controle de expressão gênica na fase pós transcricional em eucariotos, uma vez que a partir da interação com mRNA eles alteram o padrão de

tradução das proteínas. Para exercer seu papel biológico, os miRNAs se ligam aos mRNAs-alvo por reconhecimento e complementariedade das sequências de aminoácidos, pareando-se total ou parcialmente à molécula, de modo que a duração da interação das duas moléculas é proporcional a complementariedade entre ambas. A interação entre as moléculas pode levar a degradação do mRNA, que é clivado por uma endonuclease presente no RISC. Ou seja, é dessa forma que a tradução de um mRNA é inibida por um miRNA. (Jorge, *et al.*, 2021) Nesse sentido, a tabela 3 abaixo mostra alguns exemplos de miRNAs com papel supressor tumoral e outros com papel oncogênico, identificados por Zubor, *et al* (2018).

Tabela 3 - Tipos selecionados de miRNAs no CM com sua função na progressão da doença

miRNAs oncogênicos	miRNAs supressores de tumor
miR-10b	Família Let-7
miR-17-92 cluster	miR-145
miR-125b	miR-15a
miR-18	miR-16
miR-19a	
miR20a	
mir-155	
miR-569	

Fonte: Adaptado de Zubor *et al.*, 2018.

Nota: miRNAs oncogênicos são aqueles que possuem características de oncogenes, ou seja, estimulam a tradução de proteínas com efeitos oncogênicos. Os miRNAs supressores de tumor, no entanto, têm atividade contrária, como os genes supressores de tumor.

Uma vez desregulada a expressão dos miRNAs, suas funcionalidades são comprometidas. A função que predomina para os miRNAs, é a já citada anteriormente: diminuir a expressão dos mRNAs alvo, bloqueando sua tradução para proteínas ativas, independente da função fisiológica dessa proteína. Além disso, alguns miRNAs, como o miR-10b, miR-21 e miR-155, são classificados como oncomiRs, pois regulam negativamente os genes supressores de tumor, de forma que corroboram para a tradução de proteínas de efeito oncogênico (Shah *et al.*,

2016; Van Schooneveld *et al.*, 2015). É válido ressaltar que alguns do oncomiRs podem ser chamados também metastamiRs, por estarem relacionados à agressividade do câncer, como é o caso do miR-10b, do miR-21 e do miR-373 (Van Schooneveld *et al.*, 2015)

Tendo em vista o dinamismo dos miRNAs discutido acima, percebe-se a importância de se investigar suas funções e padrões de atividade, a fim de identificar-se diferentes perfis de acordo com cada caso de CM. Logo, enxerga-se aí a necessidade de atenção para a presença de painéis conhecidos de miRNAs em cada paciente com CM, pois esse ponto pode ser crucial para garantia de maior assertividade no tratamento e da qualidade de vida de cada paciente (Shah *et al.*, 2016).

Além dos miRNAs tumorais, também existem os livres circulantes em fluidos biológicos diversos (ECmiRNAs). Estas moléculas podem ser reconhecidas por diferentes receptores, o que possibilita que alterem a expressão de mRNAs mesmo em células distantes e, assim, esta comunicação intercelular contribui para a metástase. Dadas essas características, de uma forma pouco invasiva, pode-se ter acesso aos ECmiRNAs, os quais excelentes são biomarcadores para detecção e tratamento da doença (Shah *et al.*, 2016; Sohel, 2016; Zubor *et al.*, 2018).

Nesse sentido, uma revisão sistemática que foi publicada por Duque *et al.*, (2022), com base em 136 artigos e 17.709 pacientes, concluiu que a biópsia líquida se mostra um método útil para determinação de biomarcadores do câncer de mama, contribuindo com alta sensibilidade para o diagnóstico precoce em estágios iniciais da doença, somadas aos exames de imagem. Além dos miRNAs, outros componentes celulares podem ser identificados pelo exame, como ácidos nucleicos tumorais circulantes (ctDNA), RNA extracelular encapsulado por vesículas (EV-mRNA) e outros. O trabalho publicado por Duque *et al.*, (2022), foi capaz de identificar dentre todos os artigos estudados, diversos painéis testados em BL para diagnóstico precoce do câncer de mama, nestes painéis estão presentes determinados genes, status de metilação e, em peso, os miRNAs. A tabela 4 abaixo foi adaptada da revisão sistemática para exemplificar alguns dos painéis de miRNAs identificados com sensibilidade superior a 90% em sangue periférico.

Tabela 4 - Resumo de painéis de miRNAs testados em BL para diagnóstico precoce de CM com sensibilidade acima de 90%

Fluido Corporal	Painéis de Biomarcadores
Sangue Periférico	miR-451, miR-148a, miR-27a, miR-30b
	miR let-7b-5p, miR-122-5p, miR-146b-5p, miR-210-3p, miR-215-5p
	miR1246, miR1307-3p, miR4634, miR6861-5p, miR6875-5p
	miR21, miR-221, miR-210
	miR-1246, miR6, miR-24, miR-373
	miR-21-3p, miR-21-5p, miR-99a-5p

Fonte: Adaptado de Duque *et al.*, 2022.

Nota: Painéis somente de miRNAs, com alta sensibilidade para o diagnóstico do câncer de mama, testados em BL.

Assim, os miRNAs são considerados biomarcadores, sendo úteis para o delineamento do prognóstico de cada caso da doença (Weidle *et al.*, 2018; Zubor *et al.*, 2018). Portanto, a busca pelo perfil de miRNA individualizado é um ponto fundamental para a medicina personalizada aplicada ao câncer de mama.

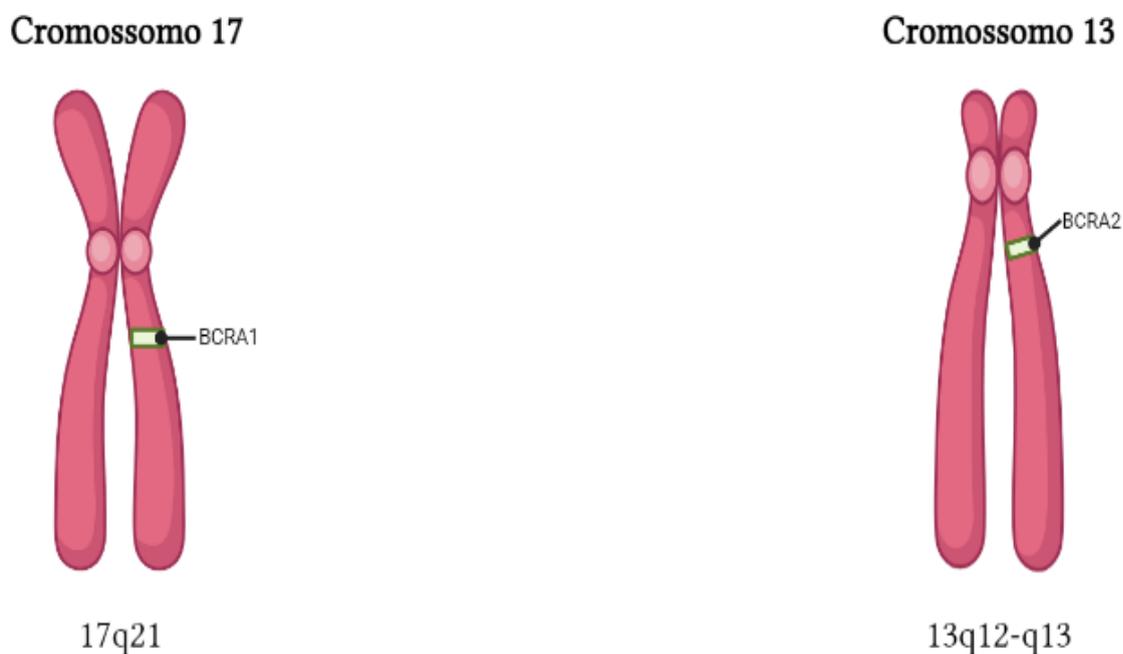
4.4 Epigenética: genes supressores de tumor e oncogenes

A determinação do status de metilação de genes supressores de tumor, mais especificamente dos seus sítios promotores, tem sido usada atualmente como uma importante estratégia para seleção de tratamentos para pacientes com câncer de mama. Nesse sentido, genes supressores de tumor muito estudados atualmente são os genes BRCA 1 e 2 e a determinação dos seus status de metilação também contribui como marcadores prognósticos da terapia ao câncer (Lobanova *et al.*, 2021).

O gene BRCA1, representado na figura 11, foi o primeiro gene de susceptibilidade ao CM identificado, e está localizado no cromossomo 17, na posição 17q21. O gene BRCA2 foi identificado na sequência como um segundo gene de susceptibilidade, localizado no cromossomo 13, na posição 13q12-q13. Ambos os genes são exemplos de supressores de tumor, que possuem funções

relacionadas com o controle do ciclo celular e manutenção da integridade do DNA (Davalos, Martinez-Cardus, Esteller, 2017).

Figura 11 - Genes BRCA



Fonte: Autoria própria.

Nota: Os genes BRCA são conhecidos como supressores de tumor no câncer de mama. Não estando localizados no mesmo cromossomo, sendo do BRCA1 encontrado no cromossomo 17 e o BRCA2 encontrado no cromossomo 13.

Tratando-se de epigenética, o silenciamento dos genes BRCA1 e BRCA2 devido a hipermetilação dos seus promotores é comum nos casos de CM esporádico. Nesses casos, tais genes, originalmente participantes da reparação celular, não estão expressos para desempenhar essa atividade, de modo que há um aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento da doença. Esses casos geralmente estão relacionados com o fenótipo triplo negativo do tumor de mama (Davalos, Martinez-Cardus, Esteller, 2017). A deficiência do gene BRCA1 leva à perda do checkpoint no ciclo celular, anormalidades na duplicação do centrôssomo e, por vezes, apoptose. A expressão do gene BRCA1 pode ser inibida, além da metilação, pelos miRNAs miR-10b e miR-26a. Enquanto o miR-153 estimula sua expressão (Temian *et al.*, 2018).

O estudo de caso-controle de título “Epigenetic modulation of BRCA-1 and MGMT genes, and histones H4 and H3 are associated with breast tumor” foi publicado em 2019, realizado em 27 pacientes com CM e 36 pacientes com tumor de mama benigno, no Irã. Neste estudo, amostras de biópsia foram usadas para avaliar a metilação do DNA, através de PCR MSP (metilação-específico). O promotor do gene BRCA-1 encontrou-se hipermetilado em 44,4% dos tumores malignos e em somente 9,7% dos tumores benignos, a metilação do promotor presente nos tumores benignos pode ser sugestiva de risco ao desenvolvimento do câncer. A sobrevida global do promotor metilado foi de 18,6 e a do não metilado foi 24,9, o que segundo o estudo sugere que a metilação do promotor BRCA-1 se associa à pior sobrevida de pacientes com CM (Paydar *et al.*, 2019).

No mais, as informações sobre metilação do DNA, contidas no item 4.3.1 do presente trabalho também são importantes para o estudo destes genes. Como supressores de tumor relacionados à suscetibilidade ao câncer de mama, devem ser ponto de atenção durante o acompanhamento de pacientes com tumor esporádico, principalmente os RE+/HER2-, como demonstrado anteriormente pela tabela 2.

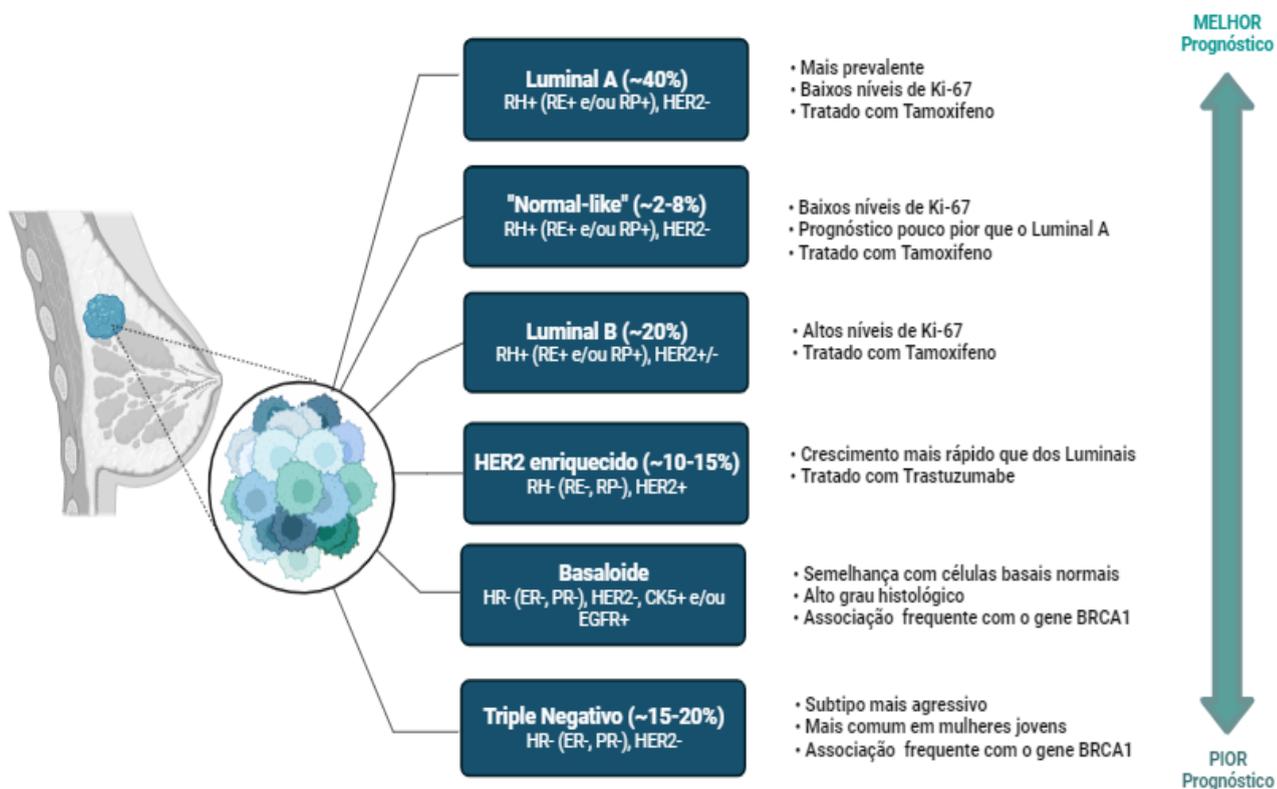
4.5 Os subtipos de tumores de mama

A assinatura genômica pode ser entendida como o conjunto de características moleculares dos genes que compõem cada tumor do câncer de mama, a sua análise é de suma importância para a aplicação da medicina personalizada, que nada mais é do que uma forma de conduzir com individualidade cada tratamento e acompanhamento médico levando em consideração as características de cada paciente e cada tumor (Mueller *et al.*, 2018).

Dada a heterogeneidade da doença, nos últimos tempos foram identificados seis subtipos moleculares que compõem a assinatura genômica do câncer de mama: Luminal A, Luminal B, HER2 enriquecido, Basalóide, Mama-normal símile e Triplo negativo representados pela figura 12 abaixo. O entendimento desses subtipos moleculares é de grande importância para a aplicação da medicina

personalizada ao caso de cada paciente, devido aos fatores prognósticos e preditivos que cada um deles apresenta (Ding *et al.*, 2020).

Figura 12 - Perfil molecular dos tumores de mama



Fonte: Autoria própria.

Nota: Dentre os 6 subtipos tumorais, o Luminal A apresenta o melhor prognóstico, enquanto o Triplo negativo, o pior. Entre os dois, em ordem ao pior prognóstico, estão o "Normal-Like", Luminal B, HER2 enriquecido e Basaloide.

Dessa maneira, o câncer de mama é uma doença complexa e apresenta grande heterogeneidade histológica, molecular e, conseqüentemente, clínica. Em contrapartida, mesmo tumores mamários com histologia e manifestação clínica semelhantes, podem apresentar diferentes alterações moleculares, o que leva a diferentes prognósticos e diferentes padrões de resposta aos tratamentos terapêuticos. Assim, vem daí a necessidade de entender-se bem a assinatura genômica de cada caso (Bhat *et al.*, 2019).

No Brasil, a técnica de imuno-histoquímica é amplamente empregada para identificação dos subtipos moleculares. Essa técnica avalia a expressão de

proteínas morfológicas de cada tumor em amostras de biópsia (Cirqueira et al., 2011). A tabela 5 abaixo, evidencia os receptores presentes em cada um desses subtipos. Mas vale lembrar que os perfis específicos de miRNAs podem também diferenciar os subtipos Luminal A, Luminal B, Basaloide, Mama Normal-Símile e HER2 positivo (Zubor *et al.*, 2018).

Tabela 5 – Perfis imunofenotípicos dos subtipos moleculares

Subtipo Molecular	Classificação com índice de Ki-67 de 14% por imunomarcção
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
Normal Like	ER+ e/ou PR+ HER2-
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 \geq 14% OU RE+ e/ou RP+, HER2+ (Luminal HER2)
Superexpressão de HER2	RE-, RP- e HER2+
Basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo-Negativo não basiloide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

Fonte: Adaptado de Cirqueira, 2011.

Nota: Por Imuno-histoquímica, um método muito presente na oncologia diagnóstica, é possível detectar a presença dos receptores. Sendo HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR: receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; CK5: citoceratina 5.

Além de todas essas características imunohistoquímicas, a análise dos miRNAs também é capaz de identificar os subtipos, e conseqüentemente contribui para o direcionamento terapêutico, esse ponto é muito importante para o benefício das pacientes, principalmente portadoras de tumores RH+ e HER2+, que podem ser tratadas com terapia direcionadas à presença de receptor. A tabela 6 abaixo foi adaptada de Orrantia-Borunda *et al.* (2022), para demonstrar alguns painéis de miRNA possíveis de serem encontrados por subtipo tumoral. No entanto, é válido esclarecer que este é um assunto em desenvolvimento progressivo na ciência, revolucionário, mas ainda em processo de descobertas, por isso, muitos outros

painéis são descritos. Em 2018, por exemplo, Zubor, *et al.*(2018) identificou outros painéis, por presença de receptor, demonstrados na tabela 7.

Tabela 6 - Painéis de miRNA por subtipo tumoral

Luminal A	Luminal B	HER 2	TNBC
Let-7f, Let-7c, miR-10, miR-29a, miR-181a, miR-223 and miR-652	miR155, miR-93, miR-18a, miR-135b, miR-718, miR-4516, miR-210, and miR-125b-5p	miR-150 and miR-142-3p	miR-153, miR-10b, miR-26a, and miR146a

Fonte: Adaptado de Orrantia-Borunda *et al.*, 2022.

Nota: Os miRNAs são úteis para a identificação de subtipo tumoral e, dessa forma, são úteis para o direcionamento do tratamento. Nesse caso, a definição de painéis específicos tem importância significativa para a melhoria da qualidade de vida das pacientes diagnosticadas.

Tabela 7 - Painéis de miRNA por presença de receptor

RE+	RP+	HER2+
miR-135b, miR-190, miR-217, miR-218, miR-299 e miR-342	miR-377, miR-520g, miR-520f -520c e miR-527-518a	miR-30e, miR-181c, miR-302c, miR-376b e miR-520d

Fonte: Adaptado de Zubor *et al.*, 2018.

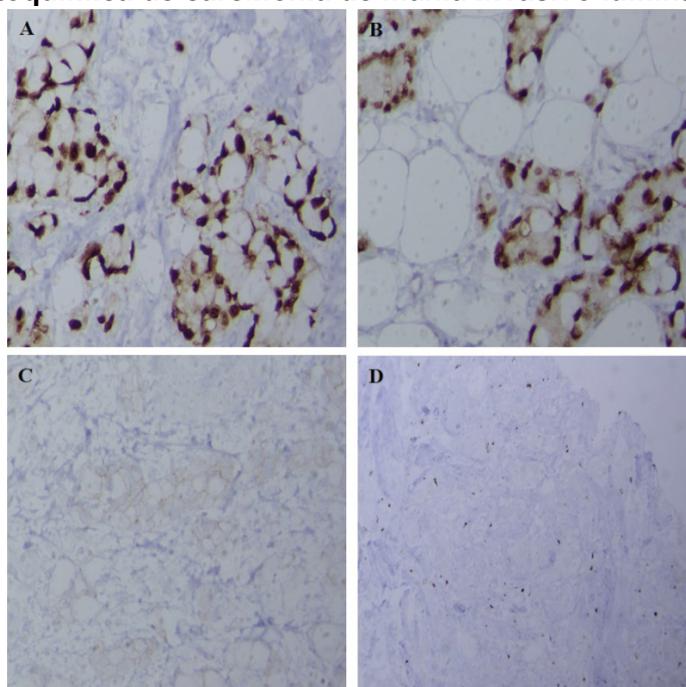
Nota: Os miRNAs são úteis para a identificação de subtipo tumoral e, dessa forma, são úteis para o direcionamento do tratamento. Nesse caso, a definição de painéis específicos tem importância significativa para a melhoria da qualidade de vida das pacientes diagnosticadas.

4.5.1 Subtipos RH+ e HER2-/+

Os subtipos luminais recebem esse nome devido a semelhança com as células normais que ficam em contato com o lúmen dos ductos mamários. O subtipo Luminal A, demonstrado na figura 13, corresponde a cerca de 40% de todos os carcinomas e tem melhor prognóstico quando comparado aos demais subtipos, apresentando receptor estrogênico e/ou progesterogênico positivo e baixo grau histológico, além de serem negativos para superexpressão de HER2 (receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano). Estudos recentes têm mostrado que esse subtipo apresenta índice de Ki-67 inferior a 14% em avaliação por

imuno-histoquímica. O Ki-67 é um marcador de proliferação celular o qual está expresso em todas as fases do ciclo celular, com exceção da fase G0. Em geral, altos níveis de Ki-67 correlacionam-se com mal prognóstico, uma vez que é uma substância liberada durante a divisão celular, ou seja, frequentemente alto quando há intensa divisão e proliferação tumoral. Os tumores luminais são os mais metilados a nível de promotores (Cirqueira *et al.*, 2011; Yamanouch, Kuba, Eguchi, 2019).

Figura 13 - Imuno-histoquímica de carcinoma de mama invasivo luminal A



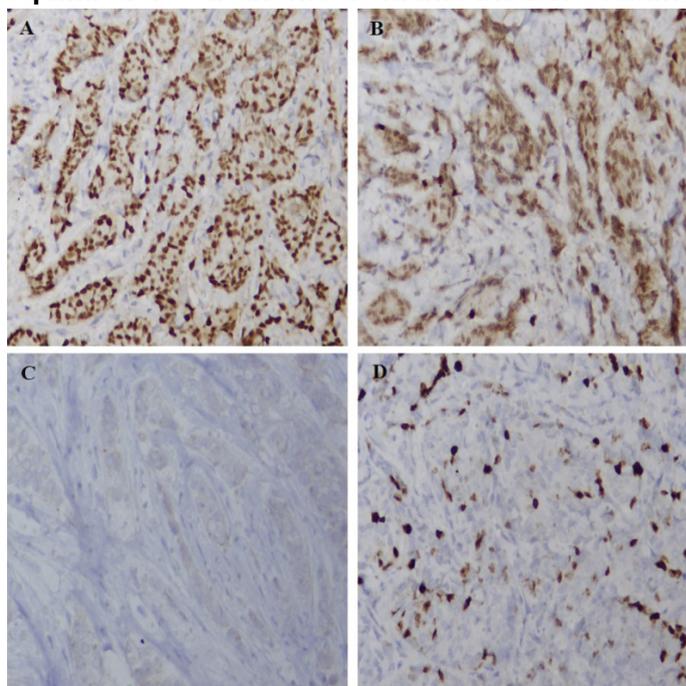
Fonte: Orrantia-Borunda, *et al.*, 2022.

Nota: Sendo “A” receptor de estrogênio positivo, coloração nuclear; “B” receptor de progesterona positivo, coloração nuclear; “C” HER-2 1+ negativo, coloração de membrana; “D” Ki-67 positivo 3%, coloração nuclear.

Os tumores Luminal B, demonstrado na figura 14, na maioria das vezes, apresentam receptores hormonais positivos, os quais podem ser expressos em baixos níveis e ainda apresentarem alto índice proliferativo. Apresentam um pior prognóstico com relação ao subtipo Luminal A, devido a expressão de genes associados ao HER2 e um maior número de genes de proliferação celular, que inclui a expressão de genes Ki-67. Para distinção dos dois subtipos luminais usa-se a

expressão de RE (Receptor de Estrogênio), RP (Receptor de Progesterona), HER2 e mais recentemente Ki-67. Assim como o subtipo Luminal A, o subtipo Luminal B também costuma ser mais metilado a nível de promotor (Cirqueira *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2015, Orrantia-Borunda *et al.*, 2022).

Figura 14 - Imuno-histoquímica de carcinoma de mama invasivo luminal B



Fonte: Orrantia-Borunda *et al.*, 2022.

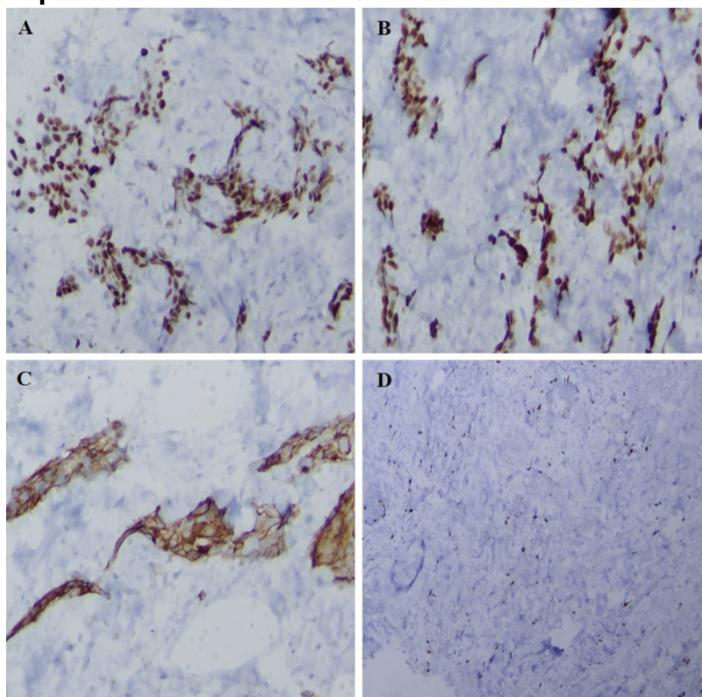
Nota: Sendo “A” receptor de estrogênio positivo, coloração nuclear; “B” receptor de progesterona positivo, coloração nuclear; “C” HER2 1+ negativo, coloração de membrana; “D” Ki-67 positivo 30%, coloração nuclear.

Outro subtipo é chamado de mama normal símile e apresenta elevação na expressão de genes comuns às células epiteliais, adiposas e estromais mamárias normais, apresenta negatividade para marcadores tumorais usuais, podendo ser uma contaminação com tecido mamário normal (Cirqueira *et al.*, 2011).

4.5.2 Subtipos RH- e HER2+

O subtipo HER2 enriquecido, demonstrado na figura 15, apresenta elevada expressão da oncoproteína HER2 e negatividade para receptores hormonais, detendo o segundo pior prognóstico dentre todos os demais. No caso de carcinomas de mama invasivos, tem-se como padrão a realização de imuno-histoquímica para superexpressão dessa proteína, que funciona como um receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), uma glicoproteína de superfície que participa das etapas de proliferação e invasão celular (Cirqueira *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2017).

Figura 15 - Imuno-histoquímica de carcinoma de mama invasivo HER2



Fonte: Orrantia-Borunda *et al.*, 2022.

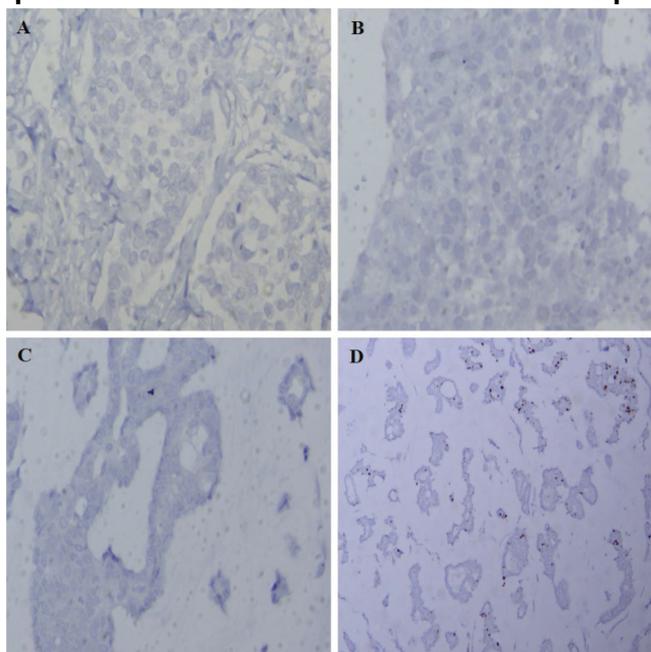
Nota: Sendo "A" receptor de estrogênio positivo, coloração nuclear; "B" receptor de progesterona positivo, coloração nuclear; "C" HER2 3+ positivo, coloração de membrana; "D" Ki-67 positivo 5%, coloração nuclear.

4.5.3 Subtipos RH- e HER2-

Por sua vez, o subtipo basalóide é caracterizado pela expressão de genes expressos em células basais/mioepiteliais normais, apresenta prognóstico associado a menor sobrevida livre da doença e global. Com negatividade para os receptores hormonais e para superexpressão de HER2, apresentando alto grau histológico com elevado índice mitótico, presença de necrose central e infiltrado linfocitário. No geral, quase todos os tumores de mama associados a uma alteração BRCA1, seja esporádica ou hereditária, tem fenótipo basalóide triplo-negativo (negativo para RE, RP e HER2, positivo para o receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico e/ou citoceratina 5) devido metilação do gene promotor que leva a baixa expressão do gene BRCA1 (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022; Davalos, Martinez-Cardus, Esteller, 2017).

Por fim, o subtipo que apresenta o pior prognóstico é o dos tumores triplos-negativos, demonstrado na figura 16. São os que menos apresentam metilação a nível de promotores, mas ainda são alvo de estudo para melhor se entender suas características epigenéticas, devido à sua heterogeneidade. O estado de metilação dos promotores de alguns genes, tal como o BRMS1, está relacionado ao prognóstico ruim desse tipo de tumor. O gene em questão é um supressor de tumor relacionado com metástases em gânglios linfáticos e encontra-se tipicamente metilados em tumores triplos-negativos e, por isso, em baixos níveis de expressão (Temian *et al.*, 2018). Frequentemente, o miRNA miR-342 está diminuído nos tumores triplo-negativos (Zubor *et al.*, 2018). Além disso, os miR-145 e miR-205 também estão reduzidos, diferentemente de células normais (Cava, Bertoli, Castiglioni, 2015). Infelizmente, apesar dos avanços científicos terem contribuído muito para prevenção do CM nos últimos anos, ainda há uma grande carência de terapias eficazes para o tratamento do subtipo triplo negativo, uma vez que as drogas direcionadas para receptores hormonais e HER2 não são úteis para o seu tratamento dada a ausência dos mesmos, assim, ainda é o mais agressivo e resulta em baixa taxa de sobrevida em até 5 anos (Sun *et al.*, 2017).

Figura 16 - Imuno-histoquímica de carcinoma de mama invasivo triplo negativo



Fonte: Orrantia-Borunda *et al.*, 2022.

Nota: Sendo “A” receptor de estrogênio negativo; “B” receptor de progesterona negativo; “C” HER2 0+ negativo, coloração de membrana; “D” Ki67 positivo 10%, coloração nuclear.

4.6 Tratamento direcionado por características moleculares

Uma revisão sistemática de tratamentos adjuvantes e neoadjuvantes do CM foi realizada por Kerr, *et al.* (2022). Segundo este trabalho, os tratamentos adjuvantes são iniciados após uma intervenção principal para retirada do tumor, seja ela cirúrgica ou radioterapia, com o objetivo de acabar com vestígios de células anormais restantes. Já os tratamentos neoadjuvantes são iniciados antes dessa intervenção principal, com o objetivo de diminuir a extensão do tumor. No entanto, apesar de reduzir a mortalidade pelo câncer, essas opções de tratamento muitas vezes podem aumentar a mortalidade não relacionada ao câncer, a depender de cada caso, podendo gerar quadros de doenças cardíacas, leucemias e outros cânceres.

Ainda sobre a revisão sistemática citada acima, feita com base em dados dos Estados Unidos, Europa e Reino Unido, essas opções de tratamento englobam a quimioterapia com antraciclina, taxano, platina e capecitabina; Terapia

anti-HER2 com trastuzumabe, pertuzumabe, trastuzumabe entansina e neratinibe; Terapia endócrina com tamoxifeno, inibidor de aromatase, ablação ovariana; Bisfosfonatos; e radioterapia após cirurgia (Kerr *et al.*, 2022).

De forma geral, a base de tratamento adjuvante para os tumores de mama RH+ é a terapia endócrina. Em pacientes com câncer de mama RE+, essa terapia bloqueia a ligação do estrogênio com o receptor. A resistência a este tipo de tratamento, no contexto da epigenética, se deve à hipermetilação do receptor de estrogênio 1 (ESR1) no DNA livre das células (cfDNA). Quando a hipermetilação é do promotor do fator de transcrição tipo spalt 2 (SALL2), conseqüentemente, têm-se resistência ao tamoxifeno (terapia endócrina). No caso de paciente com câncer de mama HER2+, no geral, o trastuzumabe (anticorpo monoclonal/quimioterapia) é o medicamento direcionado escolhido, porém há grande resistência ao tratamento por pacientes portadoras de hipermetilação do gene TGFBI. A tabela 8 abaixo foi adaptada de Ma L, *et al.* (2023) a fim de demonstrar a relação entre esses e outros genes com a resistência ao tratamento medicamentoso do CM (Palomeras *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2023).

Tabela 8 - Genes aberrantemente hipermetilados envolvidos na resistência a drogas em BC

Genes	Resistência à droga
TGFBI	Trastuzumabe
BMP6	Doxorrubicina
RASSF10	Docetaxel
SALL2	Tamoxifeno
GCS	Doxorrubicina
PAX2	Oftamoxifeno
ESR1	Endócrino, Cisplatina

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

Nota: Alguns genes, quando hipermetilados, levam à resistência aos medicamentos usados para tratamento do câncer de mama, incluindo terapia endócrina, taxanos e demais quimioterapias.

Tendo em vista as características particulares de cada subtipo molecular discutidos acima é possível estabelecer com mais clareza a linha de tratamento para cada paciente, como forma de se aplicar a medicina personalizada ao tratamento do câncer de mama. Pensando nisso, mais recentemente os inibidores de CDK4/6 foram aprovados para uso combinado terapia endócrina, sendo direcionado mais especificamente para o tratamento do câncer avançado com tumores com receptor hormonal positivo e HER2 negativo. Normalmente, como mostra a figura 4, CDK4/6 é inibida pela proteína p16 em um ciclo celular normal, no entanto, no câncer de mama, essa regulação pode ser interrompida. Nesse sentido, os medicamentos Palbociclibe, Ribociclibe e Abemaciclibe atuam para a inibição da progressão descontrolada do ciclo celular no câncer de mama, então, uma vez que inibem CDK4/6 e, assim, interrompem a fosforilação de RB e levam ao sequestro do fator de transcrição E2F com inibição da progressão descontrolada do ciclo (FEMAMA, 2019b).

Em relação aos tumores triplo negativos, devido à ausência de receptores hormonais e de HER2, as terapias endócrinas e direcionadas se tornam ineficazes para o tratamento, de forma que a quimioterapia é a abordagem habitual para esse subtipo tumoral. Infelizmente, a eficácia é relativamente baixa e eventualmente há recorrência do tumor devido às lesões metastáticas residuais após tratamento. Segundo recomendações National Comprehensive Cancer Network (NCCN), regimes combinados a base de taxano, antraciclina, ciclofosfamida, cisplatina e fluorouracila devem ser considerados para o tratamento dos TNBC com quimioterápicos adjuvantes e neoadjuvantes, que possuem efeito citotóxico para células tumorais, com inibição da síntese proteica e/ou da divisão celular. No entanto, para a aplicação desse regime combinado é imprescindível o estudo molecular do tumor, uma vez que existem alguns subtipos de TNBC, os quais apresentam certas particularidades importantes (Yin, *et al.*, 2020).

Dessa forma, essas são algumas das características relevantes a serem analisadas para o delineamento do tratamento de pacientes com câncer de mama. É dessa forma que a medicina personalizada se mostra essencial para melhoria da

qualidade de vida: direciona para tratamentos mais eficazes e reduz desacertos, este se torna o ponto inicial (Bhat *et al.*, 2019).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dada a incidência do CM no Brasil e no mundo, da sua heterogeneidade clínica, histológica e molecular e do número significativo de mortes causadas pela doença, se torna imprescindível o aprimoramento do acompanhamento e tratamento médico das pacientes. Para tanto, a compreensão do controle epigenético sobre o desenvolvimento do câncer é imprescindível, uma vez que em meio a tamanha heterogeneidade, a personalização oferece eficácia e precisão ao tratamento, com grande aumento da qualidade de vida das pacientes em tratamento.

Nesse sentido, a medicina personalizada se mostra promissora para uma revolução científica nessa área. De modo que, com base em painéis de metilação de determinados genes, painéis de miRNAs, conhecimento e domínio das características moleculares e dos subtipos de tumor que constituem o câncer de mama, dentre todos os outros pontos moleculares levantados neste trabalho, é possível contribuir consideravelmente para a melhoria da qualidade de vida das pacientes diagnosticadas e em tratamento para o câncer de mama.

Além disso, o diagnóstico de câncer de mama, de modo geral, causa grande impacto emocional em uma mulher. A causa disso é a ideia, infelizmente até o momento correta, de que nunca se encontrou “a cura” do câncer e o fato de que este é o câncer que mais mata mulheres. Encontrar “a cura”, realmente é um trabalho difícil, e em termos científicos, já ficou claro que não funcionará desta maneira, uma vez que o CM não é uma doença só. O CM é heterogêneo em múltiplas facetas, o que significa que a forma que deve ser tratado também é heterogênea e, mais do que isso, precisa ser personalizada para que seja eficiente.

Nesse sentido, dominando as características moleculares e conhecendo a importância da epigenética no desenvolvimento da doença, a medicina avançará cada vez mais para proporcionar, se não a cura, a melhoria da qualidade de vida, a humanização e a precisão do tratamento para as mulheres diagnosticadas com câncer de mama.

Dessa forma, é imprescindível que a medicina personalizada seja aplicada em casos de câncer de mama. Para que isso se torne um padrão, certamente são necessários novos estudos e investimentos a longo prazo. De qualquer forma, o domínio da regulação epigenética, com estudo e conhecimento de painéis de metilação e de miRNAs prognósticos, são pontos chave para que cada paciente receba um acompanhamento e tratamento objetivo e preciso.

REFERÊNCIAS

- A. C. CAMARGO CANCER CENTER. São Paulo, 2022. Disponível em: <https://accamargo.org.br/sobre-o-cancer/noticias/bi-rads-entenda-esta-classificacao-que-estima-os-riscos-de-um-cancer-de-mama>. Acesso em: 29 de maio de 2023.
- Bhat SA, *et al.*, Diagnostic utility of epigenetics in breast cancer - A review. **Cancer Treat Res Commun.**, [s.l.], 2019 Feb. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2019.100125>. Acesso em: 02 de março de 2023.
- Cava C, Bertoli G, Castiglioni I. Integrating genetics and epigenetics in breast cancer: biological insights, experimental, computational methods and therapeutic potential. **BMC Syst Biol.**, [s.l.], 2015 Sep. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12918-015-0211-x>. Acesso em: 15 de julho de 2023.
- CIRQUEIRA, M. B. *et al.* Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, [s. l.], v. 10, n. 39, p. 499-503, out. 2011. Acesso em 09 de fevereiro de 2023.
- DAI, X. *et al.* Molecular portraits revealing the heterogeneity of breast tumor subtypes defined using immunohistochemistry markers. **Sci. Rep.**, [s.l.], p. 1-10, 2015 Sep. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep14499>. Acesso em: 01 de setembro de 2023.
- Davalos V, Martinez-Cardus A, Esteller M. The Epigenomic Revolution in Breast Cancer: From Single-Gene to Genome-Wide Next-Generation Approaches. **Am J Pathol.**, [s.l.], p 1-10, 2017 Jul. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.07.002>. Acesso em: 05 de Julho de 2023.
- Davey MG, *et al.* The Role of MicroRNA as Clinical Biomarkers for Breast Cancer Surgery and Treatment. **Int J Mol Sci.**, [s.l.], 2021 Aug 1. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22158290>. Acesso em: 29 de agosto de 2023.
- Ding L, *et al.* The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. **Int J Mol Sci.**, [s.l.], 2020 Mar 13. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21061960>. Acesso em 26 de março de 2023.
- Duque G, *et al.* Albarracín L. Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy for Early Detection of Breast Cancer: A Systematic Review. **Clin Med Insights Oncol.**, [s.l.], 2022 Nov 2. DOI: <https://doi.org/10.1177/11795549221134831>. Acesso em: 28 de julho de 2023.
- BRASIL. Federação Brasileira De Instituições Filantrópicas De Apoio à Saúde Da Mama. **Tipos de câncer de mama**. FEMAMA: Rio Grande do Sul, 2019a. Disponível em: <https://femama.org.br/site/blog-da-femama/tipos-de-cancer-de-mama/>. Acesso em: 20 de agosto de 2023.
- BRASIL. Federação Brasileira De Instituições Filantrópicas De Apoio à Saúde Da Mama. **Entenda o que são inibidores de CDKs e qual seu papel no câncer de mama**. FEMAMA: Rio Grande do Sul, 2019b. Disponível em:

<https://femama.org.br/site/blog-da-femama/entenda-o-que-sao-inibidores-de-cdks-e-qual-seu-papel-no-cancer-de-mama/>. Acesso em: 10 jun. 2023.

Győrffy B, *et al.* Aberrant DNA methylation impacts gene expression and prognosis in breast cancer subtypes. **Int J Cancer.**, [s.l.], 2016 Jan 1. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.29684>. Acesso em: 15 de setembro de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Como surge. Como surge o câncer?**. Rio de Janeiro: INCA, 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>. Acesso em: 15 maio 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer de mama: saiba como reconhecer os 5 sinais de alerta**. Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/prevencao-ao-cancer/cancer-de-mama-saiba-como-reconhecer-os-5-sinais-de-alerta>. Acesso em: 14 de maio de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Fatores de risco**. Rio de Janeiro: INCA, 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/fatores-de-risco>. Acesso em: 19 de maio de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **O que é câncer?**. Rio de Janeiro: INCA, 2022c. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 07 de maio de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer today**. Lyon: WHO, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 10 de maio de 2023.

Jeschke J, Collignon E, Fuks F. DNA methylome profiling beyond promoters – taking an epigenetic snapshot of the breast tumor microenvironment. **FEBS Journal.**, [s.l.], 2015 May. DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.13125>. Acesso em: 06 de Agosto de 2023.

Jorge AL, *et al.* MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. **Einstein** (São Paulo). 2021. DOI: [10.31744/einstein_journal/2021RB5996](https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2021RB5996). Acesso em: 04 de abril de 2023.

Paydar P, *et al.* Epigenetic modulation of BRCA-1 and MGMT genes, and histones H4 and H3 are associated with breast tumors. **J Cell Biochem.**, [s.l.], 2019 Apr. doi: <https://doi.org/10.1002/jcb.28645>. Acesso em 12 de setembro de 2023.

Kuang Y, *et al.* Genome-Wide Analysis of Methylation-Driven Genes and Identification of an Eight-Gene Panel for Prognosis Prediction in Breast Cancer. **Front Genet.**, [s.l.], 2020 Apr 21. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00301>. Acesso em: 21 de agosto de 2023.

Kerr AJ, *et al.* Adjuvant and neoadjuvant breast cancer treatments: A systematic review of their effects on mortality. **Cancer Treat Rev.**, [s.l.], 2022 Apr. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102375>. Acesso em: 24 de maio de 2023.

Lewandowska J, Bartoszek A. DNA methylation in cancer development, diagnosis and therapy--multiple opportunities for genotoxic agents to act as methylome disruptors or remediators. **Mutagenesis.**, [s.l.], 2011 Jul. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/ger019>. Acesso em: 12 de agosto de 2023.

Lobanova OE, *et al.* Prevalence of BRCA1 and BRCA2 genes promoter hypermethylation in breast cancer tissue. **Exp Oncol.**, [s.l.], 2021 Mar. DOI: [10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-1.15703](https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-1.15703). Acesso em: 13 de junho de 2023.

Ma L, *et al.* The Mechanism of DNA Methylation and miRNA in Breast Cancer. **Int J Mol Sci.**, [s.l.], 2023 May 27. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24119360>. Acesso em: 19 de setembro de 2023.

Mueller C, *et al.* Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research. **Expert Rev Proteomics.**, [s.l.], 2018 Feb. DOI: <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1421071>. Acesso em 24 de junho de 2023.

ORRANTIA-BORUNDA, Erasmo, *et al.* Subtypes of Breast Cancer. In: Mayrovitz HN. **Breast Cancer.** ed. Breast Cancer. Brisbane (AU): Exon Publications; August 6, 2022. p. 31-42.

Palomeras S, *et al.* Epigenetic silencing of TGFBI confers resistance to trastuzumab in human breast cancer. **Breast Cancer Res.**, [s.l.], 2019 Jul 5. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1160-x>. Acesso em: 02 de julho de 2023.

Rodrigues, A. H., *et al.* Mecanismos epigenéticos no câncer de mama: o papel dos biomarcadores e da medicina personalizada. **Revista InterScientia.**, [s.l.], Dez 2019. DOI: <https://doi.org/10.26843/interscientia.v7i2.976>. Acesso em: 14 de julho de 2023.

Shah MY, *et al.* microRNA Therapeutics in Cancer - An Emerging Concept. **EBioMedicine.**, [s.l.], 2016 Oct. DOI: [10.1016/j.ebiom.2016.09.017](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.017). Acesso em: 10 de setembro de 2023.

Sun YS, *et al.* Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **Int J Biol Sci.**, [s.l.], 2017 Nov 1. DOI: [10.7150/ijbs.21635](https://doi.org/10.7150/ijbs.21635). Acesso em: 19 de abril de 2023.

Temian DC, *et al.* The Epigenetics of Triple-Negative and Basal-Like Breast Cancer: Current Knowledge. **J Breast Cancer.**, [s.l.], 2018 Sep. DOI: <https://doi.org/10.4048/jbc.2018.21.e41>. Acesso em: 20 de setembro de 2023.

Thu KL, *et al.* Targeting the cell cycle in breast cancer: towards the next phase. **Cell Cycle.**, [s./], 2018 May. DOI: <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1502567>. Acesso em: 12 de Agosto de 2023.

VAN SCHOONEVELD, Eliani *et al.* Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. **Breast Cancer Res.**, [s. /], n. 17, p. 1-15, fev. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0526-y>. Acesso em: 20 de julho de 2023.

Weidle UH, *et al.* The Role of micro RNAs in Breast Cancer Metastasis: Preclinical Validation and Potential Therapeutic Targets. **Cancer Genomics Proteomics.**, [s./], 2018 Jan-Feb. DOI: 10.21873/cgp.20062. Acesso em: 12 de fevereiro de 2023.

Wu YS, *et al.* Epigenetics in Metastatic Breast Cancer: Its Regulation and Implications in Diagnosis, Prognosis and Therapeutics. **Curr Cancer Drug Targets.**, [s./], 2019. DOI: [10.2174/1568009618666180430130248](https://doi.org/10.2174/1568009618666180430130248). Acesso em: 23 de maio de 2023.

Wu ZH, Tang Y, Zhou Y. DNA Methylation Based Molecular Subtypes Predict Prognosis in Breast Cancer Patients. **Cancer Control.**, [s./], 2021 Jan-Dec. DOI: <https://doi.org/10.1177/1073274820988519>. Acesso em: 26 de junho de 2023.

Yin L, *et al.* Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Res.**, [s./], 2020 jun 9. DOI:<https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>. Acesso em: 29 de maio de 2023.

Zubor P, *et al.* miRNA in a multiomic context for diagnosis, treatment monitoring and personalized management of metastatic breast cancer. **Future Oncol.**, [s./], 2018 Aug. DOI: <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0061>. Acesso em: 16 de maio de 2023.