



Centro Universitário de Brasília – UniCEUB
Faculdade de Ciências da Saúde e da Educação – FACES
Graduação em Biomedicina

ANA LUIZA PEIXOTO SCHUMANN

**ASPECTOS EPIGENÉTICOS DO CÂNCER DE MAMA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DOS
MECANISMOS ENVOLVIDOS NA CARCINOGENESE MAMÁRIA E BIOMARCADORES
PARA A SUA DETECÇÃO PRECOCE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em
forma de artigo ao curso de Biomedicina do UniCEUB,
sob orientação do Professor Dr. Paulo Roberto Martins
Queiroz

BRASÍLIA

2020

Aspectos epigenéticos do câncer de mama: revisão bibliográfica dos mecanismos envolvidos na carcinogênese mamária e biomarcadores para a sua detecção precoce.

Ana Luiza Peixoto Schumann ¹
Paulo Roberto Martins Queiroz ²

Resumo

O câncer de mama é uma das principais doenças neoplásicas que afetam a população feminina do Brasil e do mundo, estabelecendo uma crescente demanda para o desenvolvimento de novas abordagens para o diagnóstico precoce. Os mecanismos epigenéticos envolvidos na carcinogênese, como as modificações de histonas e a metilação de DNA aberrante, resultam na expressão alterada de miRNAs, os quais se demonstram promissores e úteis como biomarcadores não invasivos para o diagnóstico precoce e manejo da doença, sendo detectáveis em amostras de soro e/ou plasma. A presente revisão bibliográfica exploratória descreve as alterações epigenéticas envolvidas no desenvolvimento da neoplasia mamária, bem como os biomarcadores epigenéticos mais promissores para o seu diagnóstico precoce, com ênfase nos biomarcadores de miRNA circulante.

Palavras-chave: Biomarcadores epigenéticos. Câncer de mama. Diagnóstico precoce.

Breast cancer epigenetics: epigenetic mechanisms involved in carcinogenesis and early detection biomarkers, a literature review.

Ana Luiza Peixoto Schumann ¹
Paulo Roberto Martins Queiroz ²

Abstract

Breast cancer is one of the main neoplastic diseases that affect the female population in Brazil and the world, establishing a growing demand for the development of new approaches for early diagnosis. The epigenetic mechanisms involved in carcinogenesis, such as histone modifications and aberrant DNA methylation, result in altered miRNA expression, which are promising and useful as non-invasive biomarkers for the early diagnosis and management of the disease, being detectable in samples of serum and / or plasma. This exploratory bibliographic review describes the epigenetic changes involved in the development of breast cancer, as well as the most promising epigenetic biomarkers for its early diagnosis, with an emphasis on circulating miRNA biomarkers.

Keywords: Epigenetic Biomarkers. Breast Cancer. Early Detection.

¹ Acadêmica do curso de Biomedicina do UniCEUB

² Professor do UniCEUB

1. INTRODUÇÃO

A epigenética pode ser definida como o conjunto de fatores que afetam a expressão gênica e o desenvolvimento de fenótipos celulares que não são resultantes da alteração da sequência do Ácido Desoxirribonucleico (DNA). Os determinantes epigenéticos do fenótipo melhor compreendidos incluem a metilação de DNA em resíduos de citosina, adição de grupamentos acetil e metil nas proteínas histonas e a expressão do Ácido Ribonucleico (RNA) não codificante (WERNER; KELLY; ISSA, 2017).

O estado epigenético intracelular é rigidamente controlado para manter um estado de diferenciação adequado. No câncer, essa refinada programação genômica é interrompida, levando à divisão celular descontrolada, defeitos de diferenciação e resistência à apoptose (KELLY; ISSA, 2016).

Tendo em vista as progressivas taxas de incidência e mortalidade do câncer no cenário mundial, estabelece-se uma crescente demanda do desenvolvimento de biomarcadores apurados para aperfeiçoar o diagnóstico e o manejo das neoplasias (COSTA-PINHEIRO et al., 2015). Dentre as principais neoplasias que afetam a população feminina no Brasil e no mundo, está o câncer de mama, que apresenta altos índices de incidência e mortalidade (BRAY et al., 2018).

Só no Brasil, em 2020, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que haverão 66.280 novos casos de câncer de mama, sendo que em 2017 foram estimados cerca de 16.724 óbitos decorrentes da doença (INCA, 2020).

De forma geral, a detecção precoce das doenças malignas implica diretamente em maiores chances de sucesso terapêutico além da utilização de uma ampla variedade de intervenções terapêuticas (DUMITRESCU, 2018).

Desde a descoberta das alterações epigenéticas envolvidas na carcinogênese, suas causas tornaram-se um foco importante na pesquisa oncológica nos últimos 40 anos. Demonstrou-se que as alterações do epigenoma impactam as etapas de formação, progressão e tratamento do tumor, sendo os principais alvos para detecção, diagnóstico, classificação e intervenção terapêutica das malignidades (WERNER; KELLY; ISSA, 2017).

As alterações epigenéticas vêm sendo propostas como possíveis biomarcadores, uma vez que, padrões específicos podem ser detectados em inúmeros fluidos corporais facilmente obtidos, incluindo amostras de plasma e/ou soro, aspirados de fluido mamilar, fluido vaginal e urina, importantes para o uso clínico de biomarcadores de metilação de DNA (WERNER; KELLY; ISSA, 2017; DUMITRESCU, 2018).

Além disso, essas alterações são biomarcadores inovadores devido à sua estabilidade, frequência, reversibilidade e acessibilidade nos fluidos corporais, implicando grande potencial de desenvolvimento de ensaios clínicos para aprimorar o manejo dos pacientes (COSTA-PINHEIRO et al., 2015).

Atualmente, o diagnóstico do câncer de mama é baseado principalmente na mamografia, que inegavelmente demonstra alta eficácia na redução da mortalidade relacionada à doença, por meio da implantação de programas de rastreamento. Entretanto, a técnica apresenta limitações, tais como resultados falsos positivos e falsos negativos, excesso de biópsias, a irradiação relacionada ao emprego da mamografia, assim como a eficiência reduzida da técnica para pacientes que apresentem tecido mamário denso. Além do método requerer abordagens diagnósticas complementares, tais restrições intensificam a necessidade de desenvolvimento de abordagens alternativas e não invasivas para o diagnóstico precoce do câncer de mama para auxiliar o manejo dos pacientes (ZUBOR et al., 2019).

A análise de marcadores específicos de metilação de DNA tumoral apresenta inúmeras vantagens, como: (1) maior sensibilidade; (2) menor proporção de falsos positivos; (3) estabilidade química e biológica à medida que os padrões de metilação não são afetados pelas condições de coleta e transporte de amostras; (4) a detecção de metilação de DNA ser positiva em amostras de pacientes oncológicos e; (5) os benefícios de projetos de ensaios, pois os marcadores epigenéticos são mais facilmente identificados do que as alterações genéticas encontradas em genes específicos, com a possibilidade de adaptação dos ensaios às plataformas comerciais e às tecnologias de alto rendimento (WITTENBERGER et al., 2014).

Mudanças no padrão de metilação são amplamente descritas no desenvolvimento do câncer de mama, e inúmeros estudos focaram em mudanças detectáveis na carcinogênese precoce da mama (BAYLIN; JONES, 2011; LOCKE; CLARK, 2012). Exemplos dessas alterações incluem a hipermetilação de promotores de ilhas CpG descrita em múltiplos genes supressores tumorais no câncer de mama, como *BRCA1*, *BRCA2* e *RASSF1A* (KLOTEN et al., 2013), modificações pós-traducionais de histonas (DALVAI; BYSTRICKY, 2010), e os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificantes que estão envolvidos na regulação gênica pós-transcricional, descritos como principais reguladores da carcinogênese (BOTTANI; BANFI; LOMBARDI, 2019).

Dentre os marcadores de ácidos nucleicos circulantes no sangue periférico, os miRNAs estão sendo cada vez mais reconhecidos como biomarcadores promissores, dada a facilidade com que eles podem ser isolados e sua estabilidade estrutural sob diferentes condições de processamento, além de demonstrarem potencial para auxiliar o diagnóstico precoce, prognóstico da neoplasia e predição da resposta ao tratamento (ZUBOR et al., 2019).

O presente trabalho objetiva descrever as alterações epigenéticas envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama, bem como os biomarcadores epigenéticos mais promissores para o diagnóstico precoce da doença, considerando a necessidade do

desenvolvimento de novos métodos de rastreio e de diagnóstico que sejam menos invasivos e mais sensíveis para a detecção do câncer de mama, tendo em vista as limitações dos métodos diagnósticos convencionais.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado na forma de uma revisão narrativa da bibliografia, que segundo Cordeiro *et al.* (2007), pode ser classificada como uma revisão tradicional ou exploratória da literatura, sem que haja uma delimitação de critérios explícitos e por meio da seleção arbitrária dos artigos, não havendo uma seleção sistemática, em que o autor seleciona os documentos conforme seu viés, de forma que não há a intenção de esgotar as fontes de informação.

A revisão bibliográfica foi realizada com o auxílio dos bancos de dados disponíveis no *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), que compreende as bases de dados da PubMed e PubMed Central. As palavras-chave empregadas foram “*Epigenetic biomarker*” e “*Breast cancer*”, “*Histone modifications*” e “*Breast cancer*”, e, por fim, “*Blood based biomarker*”, “*breast cancer*” e “*early diagnosis*”, associadas entre si por meio da utilização do operador booleano “*and*”, compreendendo artigos no idioma Inglês e com período de 20 anos de publicação.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Conceitos básicos de epigenética e mecanismos epigenéticos relacionados à carcinogênese mamária

As alterações epigenéticas foram recentemente compreendidas como fatores-chave para a gênese tumoral e o prognóstico do câncer, graças ao crescente conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos na expressão gênica. O termo epigenética se refere às mudanças herdáveis na expressão gênica que ocorrem sem que hajam alterações na sequência de DNA, fornecendo informações sobre os efeitos da conformação da cromatina na regulação transcricional (KARSLI-CEPPIOGLU *et al.*, 2014).

Dessa forma, o câncer de mama é induzido pelo acúmulo de regulação gênica alterada, a qual pode ocasionar crescimento e expansão celular anormal. Assim como as mutações genéticas, a epigenética também é um fator importante na gênese tumoral da neoplasia de mama, devido a alterações como metilação aberrante de DNA (KARSLI-CEPPIOGLU *et al.*, 2014).

O nucleossomo é a subunidade básica estrutural da condensação da cromatina (JENUWEIN; ALLIS, 2001; SINGH *et al.*, 2018), e sua estrutura consiste na ligação de um filamento de 147 pares de bases de DNA ao redor do octâmero de histonas, que é composto

pelo dímero das proteínas histonas organizadas no tetrâmero das Histonas H2A, H2B, H3 e H4 (AUDIA; CAMPBELL, 2016). Os nucleossomos conectam entre si por meio das Histonas H1 (SZERLONG; HANSEN, 2011), e a estrutura formada pela junção estrutural do nucleossomo ao filamento de DNA *linker* e à Histona H1, é denominada cromatossomo (MCGINTY; TAN, 2015).

O nucleossomo é composto por duas partes: uma altamente estruturada, denominada domínio principal, e as partes desestruturadas N- e C-terminais, que se estendem do domínio principal do nucleossomo (KHAN et al., 2012).

As caudas do terminal amina das histonas estão sujeitas a muitas modificações pós traducionais, existindo três principais modificações epigenéticas, que são a metilação de DNA, uma modificação covalente que se estabelece na posição 5' dos anéis de Citosina do dinucleotídeo CpG, as modificações de histonas, que são pós-traducionais e ocorrem na cauda N-terminal de quatro histonas do domínio principal e o silenciamento gênico mediado por RNA que, por sua vez, pode alterar a expressão gênica por direcionar mRNAs à degradação ou por impedir sua tradução. Estes mecanismos moleculares epigenéticos quando desregulados demonstram-se potencialmente danosos à célula levando à tumorigênese (KARSLI-CEPPIOGLU et al., 2014).

3.1.1 Metilação de DNA

A metilação de DNA é a adição covalente de um grupamento metil em resíduos de Citosina do molde de DNA, frequentemente no contexto do dinucleotídeo simétrico CG (CpG) (JANKOWSKA; MILLWARD; CALDWELL, 2015).

As enzimas DNA Metiltransferases (DNMT) são as principais ativadoras do mecanismo de metilação do DNA, estabelecendo a metilação do DNA hemimetilado ou catalisando a metilação *de novo*. A família de proteínas DNMT apresentam inúmeras representantes conhecidas nos mamíferos, entretanto, apenas três delas exercem a função de metiltransferases catalisadoras, sendo estas a DNMT1, DNMT3A e DNMT3B (VEECK; ESTELLER, 2010).

A família de proteínas Metil-CpG-Ligantes (MBP) media o silenciamento de genes supressores tumorais, juntamente às DNMTs. Essas proteínas reconhecem o DNA metilado contendo regiões de ilhas CpG e se ligam especificamente a essas regiões com seu domínio de ligação Metil-CpG. As MBPs estabelecem uma conexão entre a metilação de DNA e enzimas modificadoras de histonas associadas à repressão transcricional. A família das MBPs é composta por cinco proteínas, MaCP2, MBD1, MBD3 e MBD4, que estão relacionadas à hipermetilação de genes supressores tumorais em ilhas CpG e seu silenciamento (KHAN et al., 2012).

A metilação aberrante exerce um papel importante na carcinogênese da neoplasia de mama. A hipometilação de DNA foi demonstrada em uma escala genômica na pesquisa oncológica, enquanto regiões hipermetiladas de DNA de certos genes, especialmente as ilhas CpG normalmente não metiladas, são frequentemente reportados (KARSLI-CEPPIOGLU et al., 2014).

Algumas das funções fisiológicas da metilação de DNA estão compreendidas em mecanismos associados à integridade genômica e expressão gênica, exercendo também um papel importante na ativação transcricional (KARSLI-CEPPIOGLU et al., 2014) além do silenciamento de elementos transponíveis, inativação de sequências virais, manutenção da integridade cromossômica, inativação do cromossomo X e supressão transcricional de um grande número de genes. Em células saudáveis, os padrões de metilação são transmitidos às células filhas após a divisão celular; todavia, têm sido demonstrado que esses padrões se alteram com o envelhecimento e em doenças (JANKOWSKA; MILLWARD; CALDWELL, 2015).

A alteração epigenética mais frequentemente descrita durante a carcinogênese é a hipermetilação de regiões promotoras (DUMITRESCU, 2018), onde são encontradas grande parte das regiões de ilhas CpG. Em células normais, as ilhas CpG não estão normalmente metiladas, tornando-se hipermetiladas em células cancerígenas que reprimem a transcrição de genes supressores tumorais. Em contraponto, essas regiões também podem se tornar hipometiladas, levando a ativação transcricional de genes normalmente reprimidos, como oncogenes e retrotransposons (KARSLI-CEPPIOGLU et al., 2014).

Os supressores tumorais são genes envolvidos no controle do ciclo celular, evitando a proliferação tumoral, por meio do bloqueio da multiplicação celular desordenada que leva ao câncer (JORDE; CAREY; BAMSHAD, 2017).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são dois supressores tumorais bem conhecidos, envolvidos em muitos processos celulares implicados na manutenção da integridade do genoma, logo, variações patogênicas nesses genes podem afetar importantes funções biológicas, permitindo o acúmulo de alterações genéticas e, conseqüentemente, aumentando a susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama (PESSÔA-PEREIRA, et al., 2020).

O gene *BRCA1* localiza-se no braço longo do cromossomo 17, na posição 21, codificando a proteína *BRCA1*, composta pelo resíduo de 1.863 aminoácidos, enquanto o gene *BRCA2* fica localizado no braço longo do cromossomo 13, na posição 12.3, codificando a proteína *BRCA2*, de 3.418 resíduos de aminoácidos. Tais proteínas estão envolvidas no processo de reparo da quebra da dupla fita de DNA, por meio da regulação do processo de recombinação homóloga, um mecanismo altamente eficiente de reparo do DNA, que usa como molde para o reparo a combinação das cromátides irmãs. Dessa forma,

esse processo está ativo durante as fases S e G2 do ciclo celular, fases em que as cromátides irmãs estão disponíveis para a recombinação homóloga (GORODETSKA; KOZERETSKA; DUBROVSKA, 2019).

A função de supressão tumoral desses genes é exercida através do reparo de bases de DNA que possam estar alteradas durante o processo supracitado, e as proteínas por eles codificadas interagem com outros complexos proteicos para reparar as quebras de DNA; entretanto, quando essa interação não acontece, essas proteínas induzem a apoptose (COELHO et al., 2018).

Um número crescente de estudos têm focado em genes hipermetilados no câncer de mama, os quais exercem papéis cruciais na regulação do ciclo celular, apoptose, invasão de tecidos e metástase, angiogênese e sinalização hormonal. Perfis de metilação aberrante desses genes estão associados ao estadiamento do câncer de mama e seu prognóstico e, por isso, têm sido propostos como biomarcadores diagnósticos (HOLM et al., 2010).

Em um estudo, Esteller et al. (2001) investigaram perfis de hipermetilação de 12 genes supressores tumorais submetidos à inativação epigenética em tumores humanos. De acordo com seus resultados, os genes *BRCA1* e *p16*, ambos supressores tumorais, foram encontrados hipermetilados em amostras de tumores da mama.

Entre os portadores das mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, amostras de tumores mamários dos pacientes portadores da mutação em *BRCA2* foram significativamente mais metilados do que os portadores da mutação em *BRCA1* (HOLM et al., 2010).

O silenciamento epigenético do gene *RASSF1A*, supressor tumoral localizado no braço curto do cromossomo 3, na posição 21.3 (HONORIO et al., 2003), é causado por hipermetilação do promotor e observado em um número considerável de cânceres e é amplamente investigado no câncer de mama. Em estudos recentes, a metilação do promotor de *RASSF1A* foi encontrada em alta frequência em tumores de câncer de mama e a sua expressão desregulada foi relatada como concordante ao seu estado de metilação (ALVAREZ et al., 2013).

Determinou-se associação significativa entre a hipermetilação de *RASSF1A* e o estado do receptor hormonal, mais especificamente que tumores positivos para o Receptor de Estrogênio (ER) apresentam mais frequentemente metilação do gene *RASSF1A* do que tumores negativos para o ER (ALVAREZ et al., 2013; KAJABOVA et al., 2013; XU et al., 2012).

Além de tumores ER+ apresentarem hipermetilação extensiva (FACKLER et al., 2011), 40 *loci* de ilhas CpG associaram-se aos subtipos ER+ e, de acordo com essa evidência, Fang *et al.* (2011) observaram que a metilação de ilhas CpG foram mais prevalentes em tumores positivos para o Receptor de Progesterona (PR) e ER, e estes

tumores apresentaram melhor prognóstico do que tumores ER+ e PR+ que não apresentavam metilação de ilhas CpG.

Estudos anteriores demonstraram que a hipermetilação de promotores de genes supressores tumorais resultou preponderantemente no silenciamento da expressão gênica. A hipermetilação das ilhas CpG dos promotores envolve o desenvolvimento, progressão e metástase de tumores pela repressão da expressão dos genes supressores tumorais (GUERRERO-PRESTON et al., 2014; HAN et al., 2013).

A hipometilação global de DNA é prevalente em tumores mamários, sendo que até 50% dos casos representam níveis reduzidos de 5-metilcitosina (5mC) quando comparados a tecidos-controle normais (DAGDEMIR et al., 2013; FLANAGAN et al., 2010).

A distribuição genômica de metilação aberrante de DNA em 8 linhagens celulares de células cancerígenas mamárias e células epiteliais mamárias humanas foram analisadas por Ruike et al. (2010), sendo evidenciado que a hipometilação esteve distribuída em todo o genoma, com a ocorrência simultânea da hipermetilação de regiões ricas em CpG. Em adição, a hipometilação foi de três a cinco vezes mais frequente que a hipermetilação.

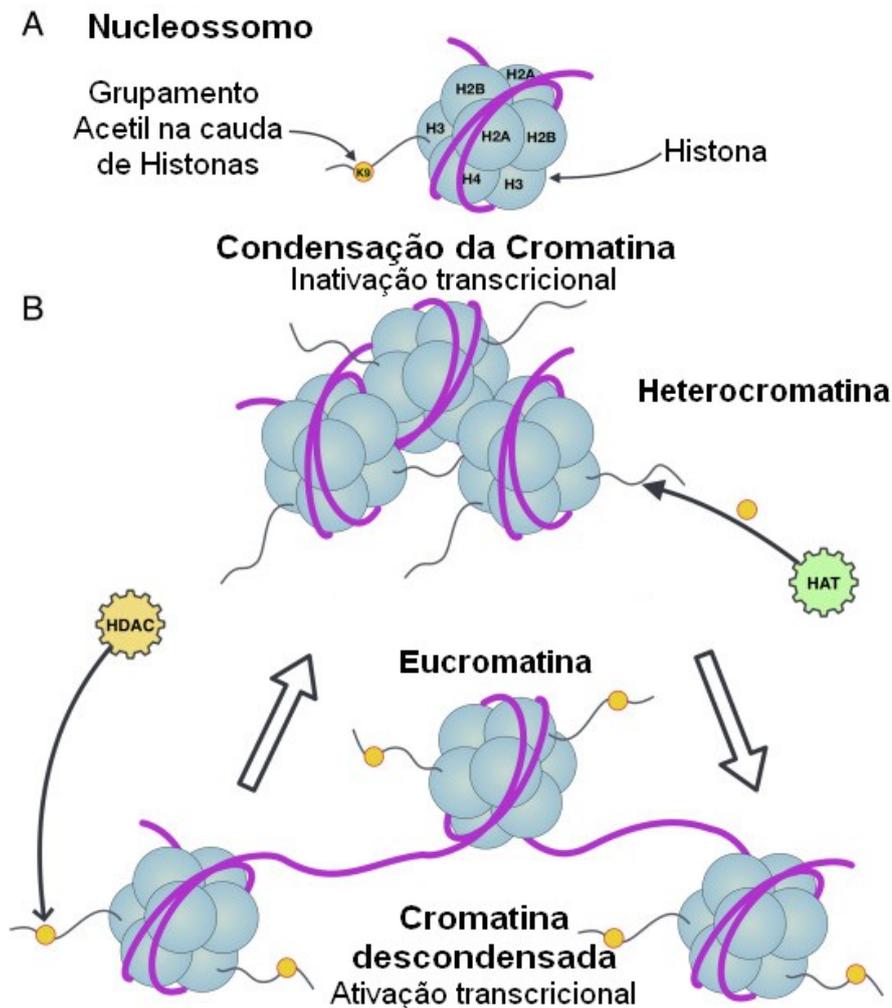
3.1.2 Modificações de Histonas

Subtipos distintos do câncer de mama demonstraram padrões epigenéticos únicos e, além disso, a diversidade de subtipos da neoplasia de mama relaciona-se à desregulação da expressão gênica associada a modificações de histonas, mecanismos epigenéticos responsáveis pelas modificações pós-traducionais na extremidade amina da cauda das histonas, que regulam a estrutura da cromatina e a expressão gênica (KARSLI-CEPPIOGLU et al., 2014).

Essas modificações ocorrem por meio da acetilação, metilação, fosforilação, glicosilação e ubiquitinação. Cada modificação de histonas constitui uma marca particular que afeta a estrutura da cromatina (CORTEZ; JONES, 2008).

A cromatina pode ser encontrada em dois estados: a heterocromatina, quando está em grau máximo de condensação e a eucromatina, que diz respeito à cromatina não condensada, conforme visualizado na Figura 1. Os genes na eucromatina estão ativos para serem transcritos, enquanto os genes presentes na heterocromatina estão inativos e não são transcritos (ZHAO; SHILATIFARD, 2019). A Figura 1 ilustra o estado ativo e inativo da cromatina, de acordo com as modificações de histonas.

Figura 1: Estrutura do Nucleossomo e modificações da cromatina via Acetilação de Histonas.



Legenda: (A) Estrutura do nucleossomo e adição de grupamento Acetil na Lisina de posição 9 (K9) na cauda de histonas. (B) Representação esquemática da inativação e ativação transcricional por meio da acetilação de histonas, controlada pelas enzimas Histona Acetiltransferases (HAT) e Histona Desacetilases (HDAC). Enquanto a HAT exerce a função de ativação da cromatina, mediante a transferência de grupamentos acetil à cauda de histonas, a HDAC é a enzima encarregada pela inativação da cromatina, pela remoção do grupamento acetil das histonas, compactando nucleossomo. FONTE: Modificado de HUYNH; EVERTS; AMPORNARAMVETH, 2017.

3.1.2.1 Acetilação de Histonas

A acetilação é uma modificação reversível no grupamento amina ϵ dos resíduos de lisina, controlada por dois grupos de enzimas: as Histonas Acetiltransferases (HATs) e as Histonas Desacetilases (HDACs) (SHEIKH; AKHTAR, 2019; LI; SETO, 2016).

As HATs são enzimas responsáveis por catalisar a acetilação das proteínas histonas e não-histonas, incluindo supressores tumorais e oncogenes para regular a estabilidade

proteica, capacidade de ligação ao DNA, interação proteína-proteína, atividade enzimática ou localização proteica (SINGH et al., 2010).

O mecanismo de acetilação da cauda das histonas neutraliza as cargas das lisinas carregadas positivamente, evento sugerido como o responsável por romper a interação das caudas das histonas e o DNA condensado em torno do nucleossomo carregado negativamente, para facilitar a descompactação da cromatina e promover a ativação da transcrição (ZHAO; SHILATIFARD, 2019).

A atividade enzimática das HDACs compacta a conformação da cromatina, diminuindo a acessibilidade dos fatores de transcrição e, dessa forma, alterando a cromatina para um estado de transcrição inativo (SAWAN; HERCEG, 2010).

A acetilação de histonas exerce função dupla na indução da carcinogênese (LIU et al., 2017), mediando tanto a repressão de genes supressores tumorais quanto a ativação de proto-oncogenes (VERDONE et al., 2006; KAMIYA et al., 2016).

Em um estudo incluindo 880 pacientes de câncer de mama, quatro perfis de acetilação de histonas corresponderam a estágios diferenciados e prognóstico de metástase. Baixa expressão de H3K9ac e H4K16ac foram evidenciados em amostras de linfonodos acometidos (ELSHEIKH et al., 2009), além de estar associada à angiogênese e estar presente em um estágio inicial da neoplasia (HAŁASA et al., 2019).

Resíduos de acetilação de H4K18 também estiveram correlacionada à carcinogênese mamária, por ocasionar a ativação transcricional de promotores gênicos. Já baixos níveis de acetilação de H4K18, associaram-se a um elevado grau tumoral (MESSIER et al., 2016).

Marcas acentuadas de acetilação em H3K4 correlacionaram-se ao comportamento metastático no câncer de mama (HAŁASA et al., 2019), enquanto a acetilação de H3K27 tem papel importante na progressão da neoplasia mamária, promovendo a transição celular epitelial para mesenquimal (TREVINO; WANG; WALKER, 2015).

3.1.2.2 Metilação de Histonas

A metilação de histonas é intimamente relacionada com a regulação transcricional, devido à influência exercida na estrutura da cromatina, ocorrendo na cadeia lateral de átomos de Nitrogênio de resíduos de Lisina (K) e Arginina (R), mais frequentemente nas histonas H3 e H4 (HERZ; GARRUSS; SHILATIFARD, 2013). Há múltiplos estados de metilação possíveis, tanto para a Lisina quanto para a Arginina, os quais podem provocar resultados diferentes na regulação transcricional (MOHAN; HERZ; SHILATIFARD, 2012).

A Lisina pode sofrer mono, di ou trimetilação por seis classes principais de Complexos Histona-Lisina Metiltransferase (KMT1, 2, 3, 4, 5, e 6) (MOHAN; HERZ; SHILATIFARD, 2012), e as marcas de metilação em resíduos de lisina associadas à

ativação transcricional melhor caracterizadas compreendem a metilação de H3K4 (SANTOS-ROSA et al., 2002), H3K36 (WAGNER; CARPENTER, 2012) e H3K79 (NGUYEN; ZHANG, 2011), enquanto as marcas de metilação relacionadas à repressão transcricional ocorrem em H3K9 (LEHNERTZ et al., 2003), H4K20 (JØRGENSEN; SCHOTTA; SØRENSEN, 2013) e H3K27 (CAO et al., 2002).

Alterar o equilíbrio dessas modificações histônicas relacionadas à expressão gênica pode contribuir para a patogênese dos cânceres (PIUNTI; SHILATIFARD, 2016; WANG et al., 2018), e numerosos estudos demonstraram o papel significativo da metilação de histonas na progressão e metástase do câncer de mama (SU et al., 2018; CAO et al., 2019).

Spangle *et al.* (2016) descreveram como a via de sinalização da Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e Serina-treonina quinase (AKT) desempenha um papel na progressão do câncer de mama, por meio do aumento dos níveis de trimetilação da H3K4, associado à tumores mamários, estando presente predominantemente em promotores. Os alvos de AKT também exercem uma função na proliferação celular. A AKT1 fosforila a enzima KDM5A, uma desmetilase de H3K4, resultando em níveis acentuados de resíduos de H3K4 trimetiladas no núcleo.

Por fim, H3K79me2 induz instabilidade genômica e promove a tumorigênese (ANANIEVA; WILKINSON, 2018), enquanto a expressão diminuída de trimetilação de H4R3, dimetilação de H4R3 e dimetilação H3K4 se associam com um mau prognóstico do tumor no câncer de mama (ELSEIKH et al., 2009).

3.1.3 miRNAs

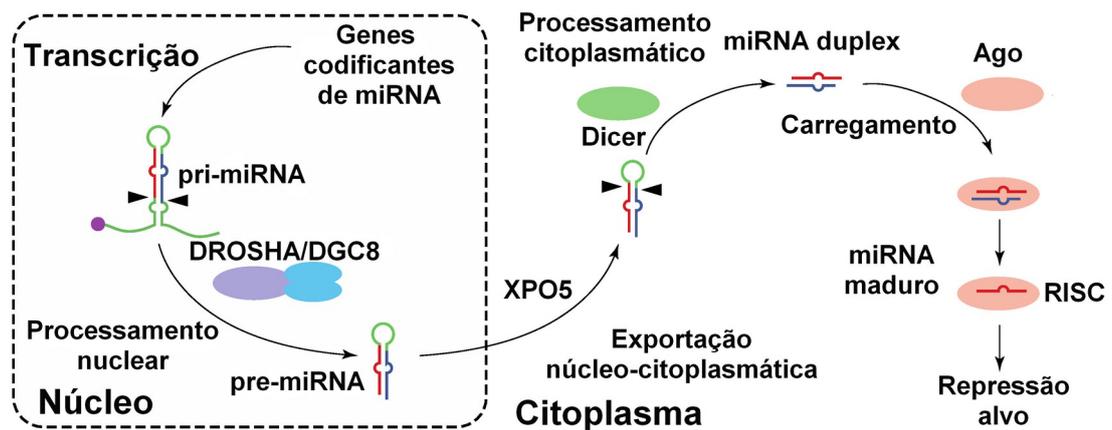
Os miRNAs são uma categoria de RNAs pequenos não codificantes compostos por cerca de 22 nucleotídeos e que atuam como moduladores da expressão gênica em células e tecidos humanos, e seu potencial como biomarcadores para patologias humanas têm sido exaltado pela possibilidade de detecção em 12 tipos de fluidos corporais (BOTTANI; BANFI; LOMBARDI, 2019).

A expressão de miRNA foi descrita em 61 tipos de tecido distintos, e seus genes podem ser localizados em sequências codificantes ou não-codificantes em todos os cromossomos humanos e sua biogênese inclui múltiplos estágios (HA; KIM, 2014; GHORAI; GHOSH, 2014; HAMMOND, 2015; LUDWIG et al., 2016; BOTTANI; BANFI; CARÈ et al., 2018; LOMBARDI, 2019).

No núcleo, os miRNAs são transcritos e processados em um precursor com conformação de “grampo de cabelo”, denominado pré-miRNA, pelo complexo DROSHA-DGCR8, que é translocado para o citoplasma e clivado para a obtenção da DICER, um miRNA de fita dupla. Ambas ou apenas uma das fitas são selecionadas para serem incorporadas no Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) para exercer sua

função como um miRNA maduro e, então, se ligar à região semente do RNA alvo. Os miRNAs estão envolvidos em uma ampla gama de funções regulatórias e processos tanto fisiológicos, como desenvolvimento celular e tecidual, diferenciação, metabolismo, homeostase, proliferação e apoptose, quanto patológicos, estando envolvidos nas respostas imunitárias, desenvolvimento e progressão tumoral (TÜFECKI; MEUWISSEN; GENÇ, 2014). A Figura 2 esquematiza o processo de biogênese dos miRNAs.

Figura 2: Biogênese e processamento dos miRNAs.



Legenda: O processo de biogênese dos miRNAs é mediado por várias etapas, incluindo a transcrição primária de transcritos de miRNA, processamento nuclear pelo complexo DROSHA-DGCR8, exportação nucleocitoplasmática por XPO5, processamento citoplasmático pela DICER e, por fim, a formação do RISC conjuntamente às proteínas Ago. FONTE: Modificado de MATSUYAMA; SUZUKI, 2020.

A biogênese e função dos miRNAs podem ser afetadas por modificações epigenéticas, alteração da atividade de proteínas envolvidas no processo, Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs) em genes de miRNA, mutações hereditárias na região semente ou "seed" de miRNA, mutações somáticas em genes de miRNA e variações somáticas do número de cópias dos genes de miRNA (BOTTANI; BANFI; LOMBARDI, 2019).

Inúmeros estudos descrevem perfis distintos de expressão de miRNA em uma ampla gama de tumores humanos, sugerindo que o perfil de miRNA poderia ser usado para fins de diagnóstico, visto que eles podem promover o desenvolvimento e/ou a progressão do tumor, perturbando os padrões de expressão de oncogenes e supressores tumorais (ALMEIDA; REIS; CALIN, 2011; LAN et al., 2015).

Os miRNAs circulantes demonstram tanto pontos positivos quanto pontos negativos como biomarcadores em cada estágio específico do processo de validação, que compreendem os estágios pré-analítico, analítico e pós-analítico. Levando em conta a fase pré-analítica, os miRNAs são detectáveis em fluidos corporais, que são coletados em procedimentos minimamente invasivos, e seu transporte em vesículas extracelulares ou

ligação a proteínas os tornam estáveis em várias condições, como valores extremos de pH, congelamento e descongelamento repetidos, até 24 horas em temperatura ambiente ou por décadas a < -70 °C (BOTTANI; BANFI; LOMBARDI, 2019).

Por outro lado, esse estágio de validação pode ser afetado por vários vieses relacionados aos hábitos diários dos pacientes, como tabagismo, atividade física, doenças renais, dieta e o ciclo circadiano, a coleta da amostra, que sofre interferências de acordo com os tubos utilizados e aos aditivos anticoagulantes, da mesma forma que a técnica de coleta, e manejo da amostra, conforme o tempo e a força de centrifugação da amostra (TAKAHASHI et al., 2013; BAGGISH et al., 2011; WITWER, 2012; SHENDE et al., 2011; NEAL et al., 2011; KROH et al., 2010; LIMA-OLIVEIRA et al., 2016; CHENG et al., 2013).

Resultados mais recentes, por exemplo, demonstram que o plasma de tubos anticoagulados com sais de Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) com um GEL separador resultou em maior detectabilidade e estabilidade de um amplo painel de miRNA do que o plasma coletado em tubo contendo EDTA padrão e plasma pobre em plaquetas acrescido de EDTA (BOTTANI; BANFI; LOMBARDI, 2019).

No que se relaciona à fase analítica, estão disponíveis métodos confiáveis para a dosagem de miRNA, como a Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR), considerada a metodologia padrão ouro. Entretanto, interplataformas significativas como sequenciamento baseado em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), microarranjos e de Nova Geração de Sequenciamento (NGS) também se destacam na identificação de miRNAs (MESTDAGH et al., 2014).

A validação do miRNA circulante pode sofrer interferência devido à contaminação por miRNA não circulante proveniente da pele, células sanguíneas, plaquetas ativadas e hemólise (BOTTANI; BANFI; LOMBARDI, 2019).

Finalmente, as questões relacionadas à fase pós-analítica referem-se principalmente à ausência de um processo padronizado de normalização de dados para genes exógenos ou endógenos únicos ou múltiplos e média global de todos os miRNAs avaliados (FARALDI et al., 2018; SOURVINO; MARKOU; LIANIDOU, 2013). Portanto, o uso de miRNAs circulantes como biomarcadores no gerenciamento de pacientes requer protocolos e procedimentos padronizados para cada fase de validação (HACKL et al., 2016; CHENG et al., 2016; FARALDI et al., 2018).

3.2 Subtipos moleculares do câncer de mama

O câncer de mama compreende um grupo heterogêneo de tumores que podem ser categorizados de inúmeras maneiras, sendo tradicionalmente classificados histologicamente de acordo com o tecido de origem do neoplasma, como carcinoma ductal, lobular, mamilar ou não especificado (BYLER et al., 2014; DEY, 2014).

Um novo sistema para a classificação do câncer de mama foi proposto em 2011 (GOLDHIRSCH et al., 2011), e o critério para identificar os subtipos foi redefinido em 2013. Seguindo os parâmetros da conferência de *St. Gallen* de 2013, os subtipos da doença são subdivididos como Luminal A, Luminal B1 HER 2-Negativo, Luminal B2 HER2-Positivo, HER2-Positivo não-Luminal e Basal-*like*. Devido às variações imuno-histopatológicas dentre as doenças do subtipo Luminal, ele é subdividido em Luminal A, B1 e B2 (GOLDHIRSCH et al., 2013).

A classificação molecular, baseada na metodologia da Imunohistoquímica, associada a outras análises de marcadores celulares, tem sido cada vez mais útil para definição do prognóstico e tratamento da doença (BYLER et al., 2014). Essa classificação é baseada na presença ou ausência dos receptores hormonais de Estrogênio (ER), Progesterona (PR), Receptor de Fator de Crescimento Epidermal Humano-2 (HER2) e o Câncer de Mama Triplo Negativo (TNBC) (PRAT; PEROU, 2011).

O subtipo Luminal A é caracterizado por ser ER e PR positivo, baixa taxa de Ki-67 e HER-2 negativo, o subtipo Luminal B1 apresenta-se como HER2-Negativo, ER-Positivo, PR-Negativo ou <10%, com alta taxa de Ki-67, o Luminal B2 é definido por ser HER2-Positivo, ER-Positivo e PR-Negativo, o HER2-Positivo não-Luminal, que se diferencia por ser HER2-Positivo e negativo tanto para ER quanto para PR e, por fim, o subtipo Basal-*like*, caracterizado por ser negativo para ER, PR e HER-2 (GOLDHIRSCH et al., 2013).

Apesar dos tumores Luminal A apresentarem um prognóstico mais favorável, os tumores do subtipo Luminal B são mais agressivos e a porcentagem de acometimento de linfonodos foi mais alta que nas mulheres com tumores Luminal A. O subtipo Luminal B1 se diferencia do Luminal A por demonstrar altos níveis de Ki-67, um marcador nuclear de proliferação nuclear (DE AZAMBUJA et al., 2007). O acometimento de linfonodos é mais alto devido à expressão aumentada do antígeno Ki-67 (INIC et al., 2014).

O índice de Ki-67 é um marcador proeminente para indicar agressividade tumoral, portanto, a atividade de proliferação celular é aumentada nos tumores Luminal B, HER2-Positivo e TNBC (DE AZAMBUJA et al., 2007; TRIHIA et al., 2003). A Tabela reúne os subtipos moleculares do câncer de mama de acordo com os *status* dos receptores hormonais.

Tabela 1 - Subtipos moleculares do câncer de mama e seus respectivos receptores de ligação.

Subtipo	ER	PR	HER-2	Ki-67
Luminal A	Positivo	Positivo	Negativo	Baixa taxa
Luminal B1	Positivo	Negativo ou <10%	Negativo	Alta taxa
Luminal B2	Negativo	Negativo	Positivo	Alta taxa

HER-2 não luminal	Negativo	Negativo	Positivo	-
Basal-like/TNBC	Negativo	Negativo	Negativo	-

FONTE: Própria do autor, 2020.

3.2.1 Padrões de metilação e modificações de histonas relacionadas aos respectivos subtipos moleculares do câncer de mama

As taxas de mutações gerais são mais altas nos subtipos Basal e HER2E, mas houve a identificação de novos genes mutados envolvidos no câncer de mama, que são marcadamente mais variados e frequentes nos subtipos Luminal-A e B. (NEBBIOSO et al., 2018).

O câncer de mama triplo negativo demonstra um enriquecimento de alterações nos genes de reparo do DNA, principalmente *BRCA1* (STEFANSSON et al., 2012). Também foi relatado o silenciamento por hipermetilação de inúmeros genes codificantes de reguladores Wnt negativos, dentre os quais se destaca o gene *RASSF1A*, já mencionado anteriormente (NEBBIOSO et al., 2018).

Dentre as modificações histônicas, altos níveis de H3K9ac se relacionam a fatores como melhor sobrevida sem a doença e à sobrevivência metastático específica. O enriquecimento da Acetilação da Lisina 9 da Histona 3 (H3K9ac) caracterizou os tumores HER2+ e câncer de mama triplo negativo, enquanto resíduos da Trimetilação da Lisina 27 da Histona H3 (H3K27me3) estão reduzidos nos subtipos Luminal-B, HER2-Positivo, e Triplo Negativo, mas se encontram aumentados no subtipo Luminal-A (HEALEY et al., 2014; JUDES et al., 2016).

Reduções nos resíduos de Dimetilação da Lisina 9 da Histona H3 (H3K9me2) e H3K9me3 com expressão acentuada da Histona Desmetilase KDM3A/JMJD1A também foram descritas no câncer de mama (ZHAO et al., 2016). Além disso, foi descrita uma forte sinalização de H3K9ac em promotores de genes específicos. O enriquecimento de H3K27me3 no gene *RUNX1* foi determinada nos subtipos HER2-Positivo e Luminal-A, mas estava silenciado em tumores dos subtipos Luminal-B1 e B2. Ademais, a expressão de *RUNX1* correlacionou-se com o pior prognóstico, provavelmente devido a sua ação na diminuição da sinalização do ER (CHIMGE et al., 2016).

Os genes da família *RUNX* são fatores de transcrição envolvidos na hematopoiese, osteogênese e neurogênese, e o gene *RUNX1* está envolvido na tumorigênese como um fator regulatório chave, particularmente em inúmeras neoplasias epiteliais (HOI et al., 2010; YEH et al., 2009), sendo considerado um oncogene no TNBC (FERRARI et al., 2014).

Níveis reduzidos de epimarcas de H3K9me2 em células epiteliais mamárias foram encontrados envolvidos na expressão acentuada de *PAX3* em tumores HER2-Positivos. O

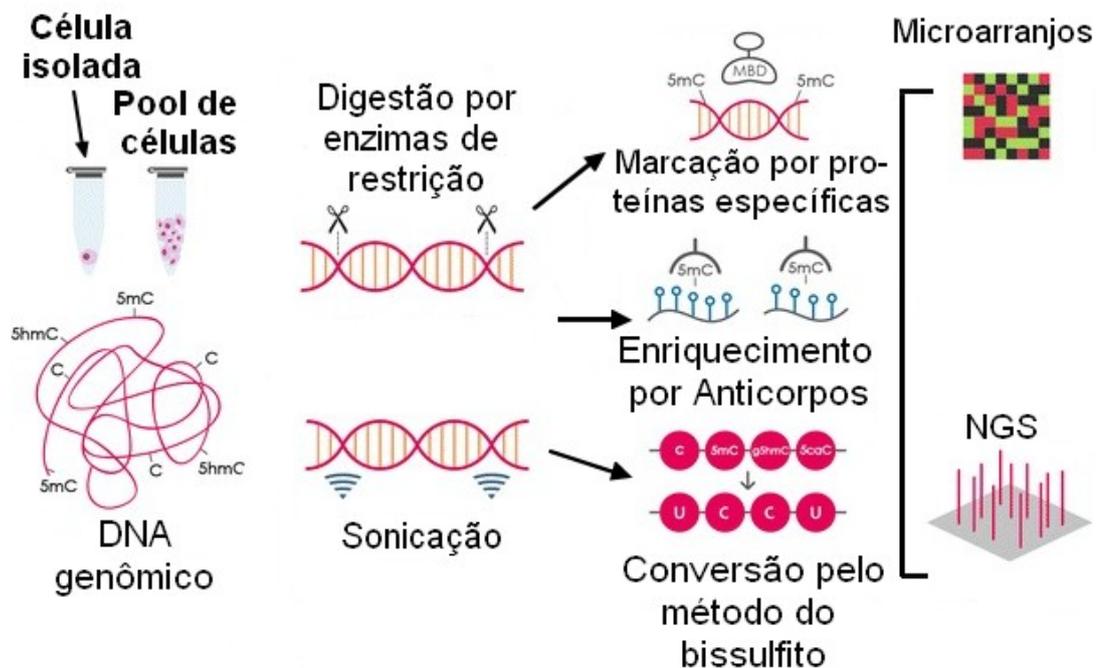
gene *PAX3*, por sua vez, age como oncogene na tumorigênese mamária, e seu perfil de expressão é regulado por mecanismos epigenéticos (ZHAO et al., 2016).

Finalmente, níveis baixos de Dimetilação da Arginina 3 da Histona H4 (H4R3me2), H3K9ac e a Acetilação da Lisina 16 da Histona H4 (H4K16ac) estão significativamente associados com tamanhos tumorais maiores, enquanto o enriquecimento da H4R3me2 e H3K9ac associam-se com o estágio de acometimento de linfonodos baixos (NEBBIOSO et al., 2018). A coloração Imunohistoquímica de resíduos de H4R3me2 revelou sua expressão reduzida em carcinomas Basais e tumores HER-2 positivos (ELSHEIKH et al., 2009).

3.3 Métodos de análise de Metilação de DNA

A análise de metilação de DNA por tecnologias de alto rendimento tornou-se um procedimento de rotina em laboratórios no mundo inteiro, e os métodos experimentais para detecção de metilação de DNA incluem abordagens baseadas em enzimas de restrição, enriquecimento de afinidade e conversão por bissulfito (YONG; HSU; CHEN, 2016; BOCK, 2012; LAIRD, 2010; ADUSUMALLI et al., 2015; BARROS-SILVA et al., 2018; WRECZYCKA et al., 2017; BOCK et al., 2010). A Figura 3 ilustra os métodos principais de análise de metilação de DNA.

Figura 3: Procedimentos de biologia molecular empregados na análise da metilação do DNA.



Legenda: Os procedimentos de biologia molecular empregados para a análise de metilação de DNA estão comumente envolvidos com a fragmentação do DNA genômico por meio da digestão por enzimas de restrição ou sonicação. O DNA genômico pode então ser enriquecido por anticorpos específicos, marcado por proteínas específicas e/ou convertido pelo método do bissulfito, antes de

ser analisado por meio de plataformas de sequenciamento baseadas em técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e/ou chips de microarranjos.

Fonte: Modificado de YONG; HSU; CHEN, 2016.

A detecção de 5mC pode ser realizada em todo o genoma ou em regiões selecionadas de interesse, até o nível de nucleotídeo único. Após a preparação do DNA por um dos três protocolos mencionados anteriormente, o material genético é sequenciado. O método de sequenciamento de bissulfito é considerado o padrão ouro para a análise de metilação de DNA (RAULUSEVICIUTE; DRABLØS; RYE, 2019).

O método foi inicialmente introduzido por Frommer *et al.* (1992) e baseia-se na evidência de que as reações de aminação da citosina e da 5mC prosseguem com consequências muito distintas após o tratamento com bissulfito de sódio, de forma que as citosinas do DNA de cadeia simples são convertidas em resíduos de uracila e reconhecidas como timina na subsequente amplificação e sequenciamento do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Entretanto, os resíduos de 5mC são refratários a essa conversão, permanecendo como citosinas e permitindo que a 5mC se diferencie das citosinas não metiladas.

O subsequente sequenciamento por PCR é necessário para a determinação do estado de metilação no *loci* de interesse pelo uso de *primers* de metilação específicos após o tratamento de bissulfito. O *status* real da metilação pode ser determinado mediante o sequenciamento direto por PCR, que detecta o *status* médio de metilação, ou por meio do sequenciamento por subclonagem, responsável por detectar a distribuição de moléculas únicas dos padrões de metilação. Ademais, a análise do sequenciamento pelo bissulfito pode não só identificar o *status* de metilação das fitas simples de DNA, mas também permite a detecção dos padrões de metilação da dupla fita de DNA, uma vez que, as fitas de DNA não são mais complementares e o produto da amplificação podem ser mensurados individualmente (LI; TOLLEFSBOL, 2011).

As enzimas de restrição sensíveis à metilação são proteínas específicas que podem reconhecer e clivar apenas sequências não metiladas, deixando o DNA metilado intacto, como a *MspI*, *HpaII*, *NotI*, *SmaI*, e *BstUI*, usadas como base para métodos de análise de metilação baseados em enzimas de restrição. Esse método é baseado na seleção por tamanho dos fragmentos de DNA, que é entre 40 e 220 pares de bases, e seu posterior sequenciamento. Assim, são determinadas as localizações das regiões de CpG não metilados. Com essa abordagem, os níveis relativos de metilação de DNA podem ser estimados usando a cobertura das leituras (YONG; HSU; CHEN, 2016; BARROS-SILVA, et al., 2018).

A análise de DNA metilado baseada em enzimas de restrição é um método econômico e de simples execução, entretanto, sua cobertura é relativamente baixa, visto

que o método é dependente da localização dos locais de restrição (RAULUSEVICIUTE; DRABLØS; RYE, 2019).

Proteínas com domínios de ligação ao grupamento metil ou anticorpos específicos contra a 5mC são usadas para reconhecer o DNA metilado nas técnicas baseadas em enriquecimento por afinidade (BARROS-SILVA, et al., 2018).

Os anticorpos específicos são utilizados para imunoprecipitação do DNA metilado e os segmentos de material genético são posteriormente avaliados por sequenciamento de alto rendimento. A capacidade de sequenciamento do método é de cerca de 100 a 300 pares de base, cobrindo até 70% dos CpGs presentes no genoma humano, e o sequenciamento do DNA metilado imunoprecipitado estima o enriquecimento relativo do DNA metilado em todo o genoma (YONG; HSU; CHEN, 2016; TAIWO et al., 2012).

Uma desvantagem importante dessa abordagem é a posterior análise computacional dos dados obtidos, sendo mais provável que os fragmentos ricos em CpG sejam enriquecidos em comparação com as regiões que são pobres em CpG, e essas regiões podem acabar sendo sub-representadas ou interpretadas erroneamente como não-metiladas e, portanto, são necessárias correções computacionais para que o conteúdo de CpG seja normalizado (RAULUSEVICIUTE; DRABLØS; RYE, 2019).

Técnicas que usam diferentes proteínas com domínios de ligação ao grupamento metil têm desempenho semelhante em regiões pobres em CpG, entretanto, foi evidenciado que o sequenciamento de captura de grupamentos metil cobre mais regiões, enquanto o sequenciamento de captura por proteínas com domínios de ligação ao grupamento metil é capaz de detectar duas vezes mais regiões diferencialmente metiladas quando comparada à metodologia de sequenciamento de captura de grupamentos metil (BARROS-SILVA, et al., 2018; BOCK et al., 2010).

3.4 Biomarcadores epigenéticos para detecção precoce do câncer de mama

O diagnóstico tradicional do câncer de mama é sustentado em exames físicos e clínicos, exames de mamografia, ultrassonografias e/ou ressonância magnética, seguido pela análise histopatológica do tecido. A ultrassonografia é um exame seguro e não invasivo que auxilia o rastreamento da doença, mas não tem a capacidade de rastrear a neoplasia mamária na população geral, não substituindo a mamografia, especialmente em mulheres com idade acima de 40 anos. Não obstante, uma vez que, uma lesão suspeita é detectada através da mamografia, a biópsia do tecido se mostra necessária (ZUBOR et al., 2019).

A mamografia se mostra como uma ferramenta imprescindível para o rastreamento do câncer de mama principalmente em mulheres acima dos 50 anos (PÉREZ-SOLIS et al., 2016). Entretanto, faz-se necessário enumerar as limitações do método, que se associam tanto a resultados falsos negativos quanto a falsos positivos para o diagnóstico do câncer de

mama (DRUKTEINIS et al., 2013). Em pacientes mais jovens, que apresentam tecido mamário mais denso, a sensibilidade diagnóstica da mamografia também é diminuída (WILCZEK et al., 2016).

Assim, a comunidade científica internacional está em uma busca ativa por metodologias não invasivas para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com câncer de mama, que poderiam ser introduzidas na rotina clínica. Atualmente, os esforços estão focados no monitoramento de biomarcadores presentes em fluidos corporais para detecção precoce e minimamente invasiva da doença (CARDOSO et al., 2016).

Com o avanço da doença, as células tumorais são liberadas pelo tumor primário, havendo a presença de células tumorais circulantes, e/ou as metástases ou células tumorais liberam seus próprios ácidos nucleicos (DNA, RNA, miRNA) na circulação, como DNA Celular Livre Circulante (ccfDNA). A análise dessas partículas, em conjunto com a origem tumoral, levou ao desenvolvimento de um novo procedimento diagnóstico conhecido como Biópsia Líquida (CROWLEY et al., 2013; PANTEL; PANABIÈRES, 2016).

A detecção precoce do câncer de mama, assim como tratamento da doença e o monitoramento de metástases, são de suma importância para assegurar um prognóstico favorável aos pacientes, e, considerando as limitações e a invasividade dos exames diagnósticos tradicionais, a biópsia líquida é uma abordagem não invasiva conveniente para coletas repetidas na rotina oncológica (ZUBOR et al., 2019).

Estudos acerca de padrões genéticos e epigenéticos clinicamente válidos e não invasivos buscam possíveis biomarcadores capazes de detectar tumores em estágio pré-maligno e inicial, além da avaliação do prognóstico e metástase e o monitoramento de recidivas do câncer (ZHAI et al., 2018). Tais padrões genéticos e epigenéticos estão frequentemente desregulados nas doenças neoplásicas, representando grande potencial de servir como ferramentas multifatoriais no campo da oncologia clínica (KIM et al., 2020).

A biópsia líquida, então, pode ser aplicada como uma ferramenta diagnóstica adicional à biópsia do tecido tumoral primário por excisão cirúrgica ou aspiração, e à biópsia de disseminação metastática, além de poder ser aplicada como ferramenta diagnóstica indireta na ocasião da impossibilidade técnica da realização da biópsia, caso o tumor ou a metástase apresentem localização pouco acessível. Moléculas derivadas da massa tumoral, como é o exemplo dos RNAs não codificantes, mais especificamente os miRNAs, são abundantes em fluidos corporais e estão desreguladas em estágios iniciais da carcinogênese, o que favorece tais marcadores quando comparados às células tumorais circulantes e ao ccfDNA tumoral, para seu posterior desenvolvimento metodológico como biomarcadores não invasivos de biópsia líquida para doenças neoplásicas, incluindo o câncer de mama (ZUBOR et al., 2019).

Em adição, marcadores de miRNA para biópsia líquida são aplicáveis tanto para pacientes oncológicos quanto em indivíduos saudáveis que apresentem condições benignas e, com isso, o rastreamento, estadiamento e resposta ao tratamento de doenças oncológicas podem ser avaliados de forma mais efetiva, por meio da mensuração de níveis de expressão de miRNAs em fluidos corporais (SHIGEYASU et al., 2017)

3.4.1 miRNAs circulantes

A presença de moléculas de miRNA circulantes no plasma é o tópico mais recente e mais estudado em termos de biomarcadores de biópsia líquida em pacientes com câncer de mama. Estas moléculas são provenientes do tecido tumoral primário ou metastático (ZUBOR et al., 2019).

Desde a descoberta dos miRNAs e a posterior descrição de seu papel na carcinogênese, houveram inúmeros avanços na caracterização dos miRNAs. Os primeiros relatos que caracterizaram a existência de perfis de miRNA relacionados ao câncer de mama em humanos foram publicados em 2005, sugerindo o envolvimento de miRNAs na patogênese desse tipo de tumor (IORIO et al., 2005; LU et al., 2005).

Nos anos seguintes de pesquisa, demonstrou-se que os miRNAs desempenham um papel vital na tumorigênese, progressão do neoplasma, resistência a drogas e metástase tumoral. Além disso, a especificidade tecidual e carcinogênica de inúmeros miRNAs permitiram a geração de perfis de miRNA em vários tipos de neoplasias que acometem a população feminina, refletindo seus órgãos reprodutivos (IORIO et al., 2007; KELLER et al., 2009; JIA et al., 2015; ABBA et al., 2017), e esses perfis específicos de expressão de miRNAs classificam tumores de forma mais adequada, quando comparados aos mRNAs (ZUBOR et al., 2019).

Os miRNAs apresentam tanto valor diagnóstico, quanto alto valor prognóstico, abrindo novas possibilidades ao manejo do câncer, estratificação do tratamento e no desenvolvimento de terapia personalizada (TAKAHASHI; MIYAZAKI; OCHIYA, 2015; ABBA et al., 2017; RAYCHAUDHURI et al., 2017), ainda mais no câncer de mama (ZUBOR et al., 2018).

Além de estarem presentes no microambiente tumoral, os miRNAs podem ser isolados de inúmeros fluidos corporais, tais como, soro, plasma, saliva, urina, leite, fluido seminal, fluidos cerebrospinais, entre outros fluidos (WEBER et al., 2010; SOHEL, 2016; TURCHINOVICH; TONEVITSKY; BURWINKEL, 2016). As moléculas de miRNA encontradas na circulação periférica derivam de células de tecidos tumorais, plaquetas, células lisadas após lesão tecidual, células necrosadas, apoptose ou inflamação crônica (MO et al., 2012; SHAH; CALIN, 2013).

Essas moléculas circulantes de miRNA, também denominadas miRNAs extracelulares, estão tipicamente contidas em exossomos, vesículas e ligadas em complexos protéicos, liberados na circulação pelo tecido tumoral e complexos de empacotamento protegem o RNA da degradação, tornando-os consideravelmente estáveis e resistentes às RNases, variações de pH, longos períodos de armazenamento e múltiplos estágios de congelamento e descongelamento (SOURVINOU; MARKOU; LIANIDOU, 2013; SOHEL, 2016).

A estabilidade é mais provavelmente ocasionada pelos mecanismos de transporte, visto que miRNAs são conjugados a complexos provendo, assim, proteção. Os miRNAs extracelulares podem ser liberados e transportados em vesículas derivadas da membrana, tanto em micropartículas (microvesículas) quanto em exossomos de menor tamanho; em complexos lipoproteicos, como o HDL e o LDL; em complexos proteicos AGO; ou envolvendo corpos apoptóticos (ARROYO et al., 2011; BOON; VICKERS, 2013; MATAMALA et al., 2015).

Tais moléculas de miRNA podem ser absorvidos por uma variedade de células, onde eles podem alterar a expressão de seu gene alvo. Dessa forma, os miRNAs extracelulares representam a comunicação entre células, o que contribui na carcinogênese e progressão tumoral, metástase e resistência ao tratamento (THÉRY, 2011; KAHLERT; KALLURI, 2013; TAKAHASHI; MIYAZAKI; OCHIYA, 2015; SHAH et al., 2016; SOHEL, 2016).

A exportação de miRNAs está mais propensa a apresentar padrões seletivos, não sendo apenas passiva. As células secretam miRNAs específicos, devido a sinais celulares ou estímulos ambientais, carregando-os a vesículas específicas. Ademais, alguns miRNAs são expressos apenas para serem exportados, uma vez que, não são detectados na célula-mãe, apenas em vesículas extracelulares (PIGATI et al., 2010; BOON; VICKERS, 2013).

Devido às características mencionadas anteriormente assim como seu método de aquisição não invasivo, os miRNAs extracelulares, representam grande potencial como biomarcadores detectáveis, além de serem biomarcadores promissores e úteis para o monitoramento e manejo não invasivo do câncer de mama (CHEN et al., 2008; THÉRY, 2011; SCHRAUDER et al., 2012).

Diante disso, métodos de detecção sensíveis são essenciais para a mensuração de miRNAs extracelulares como biomarcador para o câncer de mama, o que é possível devido a inúmeros métodos, como sequenciamento de alto rendimento, PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), PCR digital e chips de microarranjos. Todas essas metodologias estão agora totalmente disponíveis, e apenas alguns experimentos requerem condições específicas, como os de qPCR, que requerem uma referência de miRNA extracelular estável no plasma ou soro de pacientes com câncer de mama. Para conseguir isso, alguns miRNAs

como miR-10b, -16, -30a, -103, -148b, -191, -192 ou RNU6 são geralmente usados como marcadores de referência endógenos (WITWER et al., 2013; WITWER, 2015).

É conhecido que os miRNAs apresentam papel crucial no desenvolvimento de tumores mamários e que a expressão de miRNAs é altamente desregulada tanto em tecido tumoral, quanto tecido metastático, ou no plasma de pacientes com câncer de mama, causando descontrole de inúmeros processos biológicos, como a proliferação, diferenciação, apoptose e transição epitelial-mesenquimal com a migração celular, e os miRNAs também podem desempenhar uma função específica como regulador da metástase em vários níveis de cascada metastática (ZUBOR et al., 2019).

Por outro lado, exceto nas atividades oncogênicas, os miRNAs também exibem características oncosupressoras, ao ter como alvo miRNAs codificadores de oncoproteínas (PIVA; SPANDIDOS; GAMBARI, 2013). Refletindo essa informação, miRNAs circulantes podem ser considerados os biomarcadores mais promissores na oncologia para detecção precoce, avaliação de prognóstico e resposta ao tratamento (ARMAND-LABIT; PRADINES, 2017).

Portanto, o emprego biológico de miRNAs no manejo do câncer de mama e como biomarcador para biópsia líquida recentemente obteve grande interesse devido às suas vantagens quando comparado a outros marcadores, tanto nos campos de pesquisa translacional quanto clínica. Tumores malignos podem permanecer clinicamente assintomáticos por um longo período de tempo, até que ele atinja o tamanho que torne possível a sua detecção clínica e se dissemine para outros órgãos, formando metástases. Há décadas existem esforços direcionados para o desenvolvimento de estratégias para identificação do câncer de mama em estágios iniciais, o que envolveu o autoexame das mamas por apalpação e rastreamento através da mamografia, associados à realização de ultrassonografias das mamas (ZUBOR et al., 2019).

Os avanços no rastreamento primário, principalmente devido à modificação de abordagens, por meio do rastreio mamográfico em populações com riscos genéticos, os quais possibilitaram a detecção precoce do câncer mama. No entanto, ainda é necessária a biópsia por punção de agulhas e/ou excisão cirúrgica da massa tumoral, para o diagnóstico e definição do perfil biológico do carcinoma (KHOURY; TRAN, 2015).

Contudo, como foi demonstrado recentemente, a mamografia não pode ser um método exclusivo de detecção precoce, havendo outras possibilidades disponíveis que superam sua especificidade e sensibilidade limitadas, como as tecnologias associadas às metodologias de biópsia líquida (FU et al., 2016). Com isso, a abordagem ideal para o rastreamento e detecção precoce do câncer de mama consiste na associação da mamografia à biópsia líquida de marcadores mais sensíveis (ZUBOR et al., 2019).

Baseados em sua utilização, os biomarcadores para o câncer de mama podem ser classificados em marcadores de rastreamento de risco, prognóstico, diagnóstico preditivo e de monitoramento da neoplasia. Devido aos avanços em biologia molecular, novos biomarcadores circulantes foram descritos e todos provaram ser ferramentas extremamente úteis para estabelecer um diagnóstico precoce e confiável do câncer de mama, de forma minimamente invasiva (CAMPUZANO, 2017), e esse potencial da biópsia líquida em sangue periférico também pode ser aplicado para monitoramento da doença após o tratamento (HAMAM et al., 2016).

Os miRNAs estão emergindo como biomarcadores promissores para biópsia líquida devido à sua biologia, por apresentarem várias propriedades e características, como a baixa complexidade das moléculas, especificidade tecidual, estabilidade, fácil quantificação e amplificação, fazendo deles excelentes biomarcadores para detecção de inúmeros processos patológicos e fisiológicos. Com isso, os miRNAs estão se tornando um ponto de interesse na detecção do câncer de mama, já que estes foram descritos sendo secretados seletivamente por células malignas presentes na glândula mamária, sendo também expressos diferencialmente no plasma de indivíduos saudáveis e de pacientes com câncer de mama (MATAMALA et al., 2015).

Cookson *et al.* (2012) analisaram o plasma e o tecido de pacientes antes e depois da ressecção cirúrgica do tumor, na tentativa de evidenciar se os perfis de miRNAs circulantes assemelham-se aos perfis de miRNAs presentes no interior da massa tumoral. Foram identificados 210 miRNAs no total, e os miRNAs que foram superexpressos no plasma puderam ser comparados com os miRNAs presentes no tumor, e esta descoberta tornou-se a base para os estudos subsequentes focados nos miRNAs circulantes e presentes no tecido tumoral no câncer de mama.

Inúmeras características usadas para a detecção dos miRNAs foram identificadas através do sequenciamento de RNA para gerar perfis de expressão de miRNA em amostras correspondentes de tumores e soro de pacientes com carcinoma, o que resultou em um conjunto de miRNAs diferencialmente expressos entre o tumor e o soro correspondente, sugerindo que apenas uma pequena quantidade de miRNAs é liberada na circulação pelo tumor primário (ZHU et al., 2014).

O primeiro esforço para utilização clínica de miRNAs foi, portanto, orientado para a triagem do câncer de mama, posteriormente modificado de acordo com os subtipos moleculares e, em seguida, adicionando o potencial preditivo para determinar as características biológicas do tumor e sua agressividade. Inicialmente, um amplo painel de miRNAs foi formado, seguido por espectros de miRNAs selecionados em estudos de validação e, de antemão, houve a necessidade de diferenciar os perfis de miRNAs dentre

tecidos mamários normais e os de câncer de mama, como foi o caso dos miR-21, miR-125b, miR145 e miR-155 (IORIO et al., 2005).

Subsequentemente, houve a evidência de ligação positiva entre os miRNAs presentes no câncer de mama primário e o plasma dos pacientes e, então, os miRNAs correspondentes foram consecutivamente validados para propósitos de rastreamento da doença, descrevendo seu perfil de expressão e função de sinalização (ZHU et al., 2014).

Dando continuidade a esta abordagem, Heneghan *et al.* (2010) analisaram miRNAs de tecidos tumorais e amostras de sangue por RT-qPCR, quantificando os níveis de 7 miRNAs candidatos a biomarcadores de 148 pacientes com câncer de mama e 41 controles saudáveis e foi possível evidenciar níveis superexpressos de miR-195 e do precursor de miRNA let-7a refletiram a presença de tumores e quando ambos os miRNAs foram mensurados novamente, duas semanas após a excisão cirúrgica dos tumores, seus níveis de expressão foram consideravelmente baixos.

Outros pesquisadores conduziram estudos similares, analisando miRNAs circulantes em pacientes com câncer de mama comparados a controles saudáveis, concluindo que o nível plasmático dos miRNAs poderia ser um biomarcador distintivo do câncer de mama, encontrando um nível elevado de vários miRNAs para este propósito em seus estudos (ZHAO et al., 2010).

Atualmente, miRNAs circulantes associados às neoplasias têm o potencial de detectar o câncer mesmo em seus estágios iniciais, sendo provado que miRNAs podem ser aplicados para o rastreamento do câncer de mama, como os painéis de miR-127-3p, miR-148b, miR-376a, miR376c, miR-409-3p, miR-652 e miR-801, que apresentam alta capacidade de distinguir mulheres saudáveis daquelas com tumores de mama benignos e malignos, com melhor poder discriminatório em mulheres mais jovens (HENEGHAN et al., 2010).

Além disso, os miRNAs circulantes diferem de acordo com os tipos do tumor, de acordo com suas características histológicas, seus receptores hormonais ou estado de linfonodos em pacientes com câncer de mama, como é o caso da expressão de miR-10b, miR-373, miR299-5p, miR-411, miR-215 e miR-452 em paciente com linfonodos acometidos, demonstrando alta especificidade e sensibilidade para indicar doença metastática (INNS; JAMES, 2015).

Ademais, um painel incluindo miR-200a, miR-200b, miR-210, miR-21 e miR-486-5-p podem prever a ocorrência de metástases até 2 anos antes do diagnóstico clínico em pacientes com câncer de mama (MADHAVAN et al., 2016).

O valor preditivo de miRNAs circulantes demonstram que alguns deles estão associados a estágios iniciais do câncer de mama, como a superexpressão miR-425, miR-

302b (ZHAO et al., 2010), assim como, o miR-182 (WANG et al., 2013), miR-155 (SUN et al., 2012) e miR-21 (FANG et al., 2018).

O miR-155 e o miR-21 multifuncional foram recentemente de alto interesse científico, e meta-análises baseadas em artigos relevantes coletados de inúmeras bases de dados demonstraram que níveis elevados de expressão desses marcadores correlacionam-se com a detecção de estágios iniciais da doença com a abordagem de rastreamento, relacionando-se, também, ao aparecimento de metástases distantes (SCHWARZENBACH, 2013; LI et al., 2016; MARKOU et al., 2016).

Meta-análises envolvendo 3 estudos com 184 pacientes revelaram o valor diagnóstico de um marcador para rastreamento com sensibilidade de 79% e especificidade de 85% para o miR-155 (WANG et al., 2014). Em adição, a presença de miR-21 e miR-155 no plasma correlacionaram-se ao *status* dos receptores do tumor (ZUBOR et al., 2019).

Outra característica importante dos miRNAs presentes em líquidos extracelulares é o fato de que eles podem exercer um papel na comunicação cruzada entre as células cancerígenas e as células do tecido circundante, potencializando o seu uso como biomarcadores do câncer de mama (CHEN et al., 2012; MOLDOVAN et al., 2013).

Dos miRNAs circulantes conhecidos e dos miRNAs expressos nos tecidos, a evidência de ativação anormal em pacientes com câncer de mama estende-se aos miRNAs circulantes miR-16, miR-18a, miR-21, miR-145, let-151a, miR-155 e os miRNAs específicos do tecido miR-7, miR-21, miR-145, miR-155/154, miR-182, miR-203, miR-213, sugerindo que seus valores como marcadores não invasivos e adicionalmente como uma abordagem para superar a resistência à quimioterapia (BAHRAMI et al., 2018).

Outros miRNAs relacionados com a resposta ao tratamento podem ter utilidade significativa como marcadores preditivos ou servir para predição de recidiva tumoral e sobrevida geral, em pacientes com câncer de mama triplo negativo, por exemplo, como é o caso dos miR-18b, miR-103, miR-107 e miR-652. Ademais, esse perfil de 4 miRNAs é capaz de distinguir tumores de pacientes com recidiva precoce daqueles livres de recidiva (SAHLBERG et al., 2015).

Essa informação torna a presença dessa assinatura de 4-miRNAs no plasma em um potencial preditor para distinguir a doença metastática da recorrência da doença em estágio inicial, servindo como uma ferramenta diagnóstica para a recidiva de câncer de mama baseada em marcadores sanguíneos. Este conceito não é preditivo no geral, nem específico para o tipo do câncer e níveis altos de miR-19a, por exemplo, pode representar um biomarcador para resultados clínicos favoráveis em pacientes com câncer de mama metastático positivo para o receptor HER2 (ANFOSSI et al., 2014).

Por fim, destacar os conhecimentos atuais acerca dessas moléculas fornece à biópsia líquida baseada em biomarcadores plasmáticos de miRNA a oportunidade de

aprimorar o rastreamento do câncer de mama, em associação com outros métodos atualmente disponíveis, de forma minimamente invasiva, além de auxiliar a triagem de recidivas do câncer de mama na prática clínica (BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2015; ZUBOR et al., 2019). A Tabela 2 contextualiza os miRNAs associados à abordagem de rastreamento do câncer de mama.

Tabela 2 – miRNAs circulantes associados ao rastreamento do câncer de mama.

Expressão no câncer de mama	miRNAs
Expressos	miR-15a, miR-18a, miR-107, miR-425, miR-155, miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-92a, miR-148b, miR-376c, miR-409-3p, miR-801, miR-16, miR-21, miR-451, miR-222, miR-127, miR-376a, miR-652, miR-484, miR-1246, miR-1307, miR-6821, miR-181b, miR-24, miR-505, miR-125, miR-96, miR-195, miR-199a, let-7a, miR-106a, miR-182, miR-25 e miR-324
Silenciados	miR-139-5p, miR-143, miR-145, miR-365, miR-145, miR-4634, miR-6875, miR-126, miR-335 e let-7c

FONTE: Adaptado de ZUBOR et al., 2019.

3.4.2 Perfis de miRNAs circulantes relacionados aos subtipos moleculares do câncer de mama

A positividade de receptores hormonais e da via de sinalização de estrogênio demonstram uma função importante na carcinogênese, progressão da doença e resposta ao tratamento e tanto os miRNAs específicos de tecido quanto os circulantes não refletem o estado endócrino do tumor (ZUBOR et al., 2019).

Demonstrou-se que o padrão de miRNAs presentes no soro é dependente do estado endócrino da massa tumoral e podem ser expressos diferencialmente no soro de mulheres com câncer de mama com sensibilidade hormonal, quando comparado ao soro de mulheres com câncer de mama insensível a hormônios, como é o exemplo do miR-21 e miR-155. A concentração sérica diminuída desses marcadores relacionou-se com a positividade do PR (ZHU et al., 2009).

Em contraponto, a concentração de níveis de miR-182 esteve significativamente aumentada em pacientes com câncer de mama PR+ e, levando isto em conta, o miR-155 e o miR-182 foram propostos como marcadores plasmáticos do subtipo Luminal do câncer de mama (WANG et al., 2013).

Um estudo de validação propiciou uma perspectiva mais extensa do perfil molecular subjacente do subtipo Luminal A do câncer de mama, selecionando 10 dos 76 miRNAs desregulados detectados inicialmente, para uma análise mais aprofundada, sendo estes, os

miR-19b, miR-29a, miR-93, miR-181a, miR-182, miR-223, miR-301a, miR-423-5p, miR-486-5 e miR-652. Os biomarcadores em potencial foram confirmados por RT-qPCR para quatro miRNAs (miR-29a, miR-181a, miR-223 e miR-652) e por regressão logística para três miRNAs (miR-29a, miR-181 e miR-652). A combinação desses três miRNAs pode diferenciar pacientes oncológicos de controles de forma confiável, e o perfil de expressão desses marcadores no plasma, quando combinados à mamografia, podem apresentar o potencial para facilitar a detecção específica do subtipo do câncer de mama (MCDERMOTT et al., 2014).

Como no subtipo Luminal, os níveis plasmáticos dos miRNAs miR-130a, miR-146a e miR-373 diferenciaram-se entre os tumores HER2+ e HER2- (EICHELSETER et al., 2013; STÜCKRATH et al., 2015; SWELLAM et al., 2018).

O potencial de diferenciação dos miRNAs para o rastreamento baseado em plasma também foi demonstrado para o TNBC. Mishra *et al.* (2015) declararam o miR-195-5p e o miR-495 como marcadores moleculares circulantes prospectivos substitutos para detecção precoce tanto do TNBC quanto do subtipo Luminal.

Adicionalmente, os outros miRNAs circulantes (miR-16, miR-21 e miR-199a-5p) provaram esse conceito, evidenciando que estes não foram expressos quando comparados ao câncer de mama não TNBC. Além disso, a expressão plasmática de miR-199a-5p no TNBC diferenciou-se significativamente em níveis pré- e pós-operatórios, e os níveis de expressão associaram-se com o estadiamento da doença. Estes resultados sugerem que o miR-199a-5p é um marcador específico do TNBC de valor diagnóstico e forte insight para a terapia direcionada durante o tratamento do TNBC (SHIN et al., 2015). Esses dados reafirmam o potencial dos miRNAs como biomarcadores não invasivos para a triagem e manejo do câncer de mama (ZUBOR et al., 2019).

Ademais, Zhu *et al.* (2009) ressaltaram a estabilidade de miRNAs como biomarcadores, por meio da avaliação da expressão diferenciada nas amostras de pacientes, até mesmo para amostras conservadas há 10 anos.

A sensibilidade de 74% e especificidade de 65,5% do miRNA-30a no diagnóstico do câncer de mama foi demonstrada por Zhang *et al.* (2016), sobrepondo a sensibilidade dos marcadores tumorais convencionais CEA e CA153, que são de 12 e 14%, respectivamente.

O rastreamento do câncer de mama baseado em miRNAs, assim como, a predição da doença, é extremamente valioso para o manejo clínico da neoplasia e também para pacientes com um risco genético aumentado para o desenvolvimento da doença (ZUBOR et al., 2019).

Com o intuito de identificar um marcador prognóstico em mulheres assintomáticas sem o diagnóstico de câncer de mama, porém que apresentam fatores preditivos de alto risco para o desenvolvimento da doença, Taslim *et al.* (2016) analisaram a expressão

genômica de um modelo de expressão do 41 miRNAs no tecido mamário em mulheres que não apresentaram tumores, tanto enquadradas na estratificação de baixo risco quanto de alto risco, e a análise revelou miRNAs correlacionados ao alto risco de desenvolvimento do câncer de mama. Além disso, foi relatado que a concentração alterada ou desarranjada de miRNAs selecionados no soro levou ao desenvolvimento do câncer de mama dentre essas mulheres nos 18 meses seguintes.

Estes resultados sinalizam que os miRNAs em mulheres assintomáticas para o câncer de mama podem ser úteis para predição do risco de desenvolvimento da doença e como marcador complementar para a detecção precoce do câncer de mama em programas de rastreamento dentre pacientes que já desenvolveram câncer (ZUBOR et al., 2019).

3.4.3 Limitações dos biomarcadores de miRNA

Existem várias limitações relacionadas aos biomarcadores de miRNAs circulantes candidatos para o câncer de mama e, até agora, alguns estudos têm focado em miRNAs selecionados que poderiam ser aplicados como biomarcadores preditivos ou de prognóstico e faz-se necessário enumerar que certos níveis de potenciais marcadores de miRNA ocorrem tanto no plasma de indivíduos saudáveis quanto no de pacientes e, portanto, as alterações dentre os controles e pacientes são geralmente bastante baixas (WANG et al., 2018).

A origem dos miRNAs como biomarcadores para biópsia líquida parcial pode influenciar a eficácia desse método diagnóstico não invasivo, já que é conhecido que a maior parte dos miRNAs presentes no plasma se encontram compactados em vesículas extracelulares, como as macrovesículas ou os exossomos (LIU et al., 2019).

Variados estudos analisaram diferentes perfis de expressão de miRNAs no plasma, soro e sangue periférico de pacientes com câncer de mama comparados a indivíduos saudáveis (WANG et al., 2018; EICHELSER et al., 2014).

Os achados sugerem a importância fundamental da seleção de metodologias de amostragem próprias para a quantificação dos miRNAs circulantes, além de que os miRNAs isolados como biomarcadores diagnósticos e prognósticos têm certas limitações, as quais incluem a especificidade e sensibilidade. Os níveis de miRNA podem também se sobrepor entre pacientes e controles saudáveis, levando à geração de resultados falsos positivos ou falsos negativos (FILIPÓW; ŁACZMAŃSKI, 2019).

Atualmente, esses estudos são um campo ativo da pesquisa oncológica devido à necessidade de evidenciar o contexto biológico dos miRNAs nos fluidos corporais. Aliás, embora inúmeros miRNAs tenham sido identificados como biomarcadores isolados ou em perfis de miRNAs em vários estudos, muitos artigos diferem acerca das opiniões sobre os miRNAs detectados. A razão para isso provavelmente se relaciona à variabilidade de

desenvolvimento dos estudos, critérios da coorte, metodologias de isolamento e detecção e, por fim, metodologias de análises de dados (NASSAR; NASR; TALHOUK, 2017).

Diante dessas discrepâncias, urge a necessidade de padronizar ensaios para detecção e quantificação de miRNAs, com controles apropriados para normalização. Existem métodos genômicos e proteômicos efetivos extensivamente utilizados para determinação de biomarcadores circulantes do câncer de mama. Entretanto, eles têm recursos limitados de multiplexação, compreendendo muitas etapas, além de serem de alto custo e que tomam um longo espaço de tempo exigindo, também, pessoal qualificado, o que acaba limitando significativamente a sua aplicabilidade para o diagnóstico de casos (CAMPUZANO; PEDRERO; PINGARRÓN, 2017).

Portanto, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de ferramentas portáteis, de fácil manuseio, econômicas e quantitativas, para determinação confiável de biomarcadores circulantes em diferentes níveis moleculares. Esses métodos analíticos devem ser posteriormente implementadas em contextos descentralizados e de recursos limitados para, então, facilitar o desenvolvimento de painéis de miRNAs circulantes específicos para o câncer de mama, assim como, seus graus tumorais, predição de resposta ao tratamento, recorrência e sobrevida do paciente, que, em combinação com outros biomarcadores detectáveis em biópsias líquidas podem aumentar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico do câncer de mama. Da mesma forma, mais estudos são necessários para estabelecer a viabilidade dessas aplicações entre os subgrupos de pacientes (ZUBOR et al., 2019).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico precoce é fundamental para pacientes com doenças neoplásicas, tendo em vista que o sucesso terapêutico e a remissão da doença estão atrelados à detecção da doença em estágio inicial, o que se aplica de forma geral à todas as neoplasias, logo, o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos não invasivos que auxiliem e facilitem a detecção precoce dessas doenças se mostram imprescindíveis.

Também faz-se necessário notar que os métodos diagnósticos atualmente disponíveis para o diagnóstico do câncer de mama apresentam certas limitações, ainda que as abordagens atuais demonstrarem eficácia no rastreamento precoce da doença, a mamografia ainda oferece riscos decorrentes da exposição à radiação ionizante, além de ser um exame desconfortável e com probabilidades de resultados falsos positivos e falsos negativos.

Outro ponto fundamental para o desenvolvimento de novos marcadores, é o fato de que a mamografia tem sua eficácia comprovada para pacientes acima de 40 anos, restabelecendo a necessidade de marcadores sensíveis para rastrear o câncer de mama em pacientes jovens, sobretudo nas pacientes com histórico familiar de câncer de mama, devido ao risco de câncer radioinduzido pela realização da mamografia nestas pacientes.

Diante do exposto, o desenvolvimento de novas metodologias complementares aos métodos diagnósticos atualmente disponíveis seriam o ideal para o futuro do diagnóstico precoce do câncer de mama, considerando os riscos e limitações atreladas aos métodos atuais.

Com isso, ao se observar o papel fundamental dos eventos epigenéticos envolvidos na carcinogênese mamária, ressalta-se o quanto essas alterações representam potenciais biomarcadores promissores para detecção precoce da neoplasia de mama, destacando principalmente os biomarcadores de miRNAs circulantes, os quais têm sido cada vez mais estudados como potenciais biomarcadores para o diagnóstico precoce de inúmeros tipos de câncer.

Mais estudos centrados nas concentrações de miRNAs circulantes no sangue periféricos de pacientes com câncer de mama em comparação a controles saudáveis, assim como estudos direcionados à verificação perfis de miRNAs relacionados aos respectivos subtipos do câncer de mama, se mostram fundamentais, em conjunto com as condições de padronização necessárias, para a validação adequada desses marcadores.

REFERÊNCIAS

- ABBA, M. L.; PATIL, N.; LEUPOLD, J. H.; MONIUSZKO, M.; UTIKAL, J.; NIKLINSKI, J.; ALLGAYER, H. MicroRNAs as Novel Targets and Tools in Cancer Therapy. **Cancer Letters**. Amsterdam, v. 387, p. 84-94. Fev. 2017. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.043.
- ADUSUMALLI, S.; MOHD, M. F. O.; SOONG, R.; BENOUKRAF, T. Methodological aspects of whole-genome bisulfite sequencing analysis. **Briefings in bioinformatics**. London, v. 16, n. 3, p. 369-379. Mai. 2015. DOI: 10.1093/bib/bbu016.
- ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.; CALIN, G. A. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 717, v. 1-2. p. 1-8. Dez. 2011. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009.
- ALVAREZ, C.; TAPIA, T.; CORNEJO, V.; FERNANDEZ, W.; MUÑOZ, A.; CAMUS, M.; ALVAREZ, M.; DEVOTO, L.; CARVALLO, P. Silencing of tumor suppressor genes RASSF1A, SLIT2, and WIF1 by promoter hypermethylation in hereditary breast cancer. **Molecular carcinogenesis**. New York, v. 52, n. 6, p. 475-487. Jun. 2013. DOI: 10.1002/mc.21881.
- ANANIEVA, E. A.; WILKINSON, A. C. Branched-chain amino acid metabolism in cancer. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**. London, v. 21, n. 1, p. 64-70. Dez. 2017. DOI: 10.1097/MCO.0000000000000430.
- ANFOSSI, S.; GIORDANO, A.; GAO, H.; COHEN, E. N.; TIN, S.; WU, Q.; GARZA, R. J.; DEBEB, B. G.; ALVAREZ, R. H.; VALERO, V.; HORTOBAGYI, G. N.; CALIN, G. A.; UENO, N. T.; WOODWARD, W. A.; REUBEN, J. M. High Serum miR-19a Levels Are Associated with Inflammatory Breast Cancer and Are Predictive of Favorable Clinical Outcome in Patients with Metastatic HER2+ Inflammatory Breast Cancer. **Public Library of Science One**. San Francisco, v. 9, n. 1, p. e83113. Jan. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0083113.
- ARMAND-LABIT, V.; PRADINES, A. Circulating Cell-Free microRNAs as Clinical Cancer Biomarkers. **Biomolecular Concepts**. Berlin, v. 8, n. 2, p. 61-81. Mai. 2017. DOI: 10.1515/bmc-2017-0002.
- ARROYO, J. D.; CHEVILLET, J. R.; KROH, E. M.; RUF, I. K.; PRITCHARD, C. C.; GIBSON, D. F.; MITCHELL, P. S.; BENNETT, C. F.; POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L.; STIREWALT, D. L.; TAIT, J. F.; TEWARI, M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 108, n. 12, p. 5003-5008. Mar. 2011. DOI: 10.1073/pnas.1019055108.
- AUDIA, J. E.; CAMPBELL, R. M. Histone Modifications and Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. Woodbury, v. 8, n. 4, p. a019521. Abr. 2016. DOI: 10.1101/cshperspect.a019521.
- BAGGISH, A. L.; HALE, A.; WEINER, R. B.; LEWIS, G. D.; SYSTROM, D.; WANG, F.; WANG, T. J.; CHAN, S. Y. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. **The Journal of Physiology**. London, v. 589, n. 16, p. 3983-3994. Ago. 2011. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.213363.
- BAHRAMI, A.; ALEDAVOOD, A.; ANVARI, K.; HASSANIAN, S. M.; MAFTOUH, M.; YAGHOBZADE, A.; SALARZEE, O.; SHAHIDSALES, S.; AVAN, A. The prognostic and therapeutic application of microRNAs in breast cancer: Tissue and circulating microRNAs. **Journal of Cellular Physiology**. Philadelphia, v. 233, n. 3, p. 774-786. Fev. 2018. DOI: 10.1002/jcp.25813.

BARROS-SILVA, D.; MARQUES, C. J.; HENRIQUE, R.; JERÓNIMO, C. Profiling DNA Methylation Based on Next-Generation Sequencing Approaches: New Insights and Clinical Applications. **Genes (Basel)**. Basel, v. 9, n. 9, p. 429. Set. 2018. DOI: 10.3390/genes9090429.

BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **Nature Reviews. Cancer**. London, v. 11, n. 10, p. 726-734. Set. 2011. DOI: 10.1038/nrc3130.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**. New York, v. 68, n. 6, p. 394-424, Set. 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.

BERTOLI, G.; CAVA, C.; CASTIGLIONI, I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. **Theranostics**. Wyoming, v. 5, n. 10, p. 1122-1143. Jul. 2015. DOI: 10.7150/thno.11543.

BOCK, C.; TOMAZOU, E. M.; BRINKMAN, A.; MÜLLER, F.; SIMMER, F.; GU, H.; JÄGER, N.; GNIRKE, A.; STUNNENBERG, H. G.; MEISSNER, A. Genome-wide mapping of DNA methylation: a quantitative technology comparison. **Nature biotechnology**. New York, v. 28, n. 10, p. 1106-1114. Out. 2010. DOI: 10.1038/nbt.1681.

BOCK, C. Analysing and interpreting DNA methylation data. **Nature reviews. Genetics**. London, v. 13, n. 10, p. 705-719. Out. 2012. DOI: 10.1038/nrg3273.

BOON, R. A.; VICKERS, K. C. Intercellular Transport of MicroRNAs. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**. Dallas, v. 33, n. 2, p. 186-192. Fev. 2013. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300139.

BOTTANI, M.; BANFI, G.; LOMBARDI, G. Circulating miRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Common Solid Tumors: Focus on Lung, Breast, Prostate Cancers, and Osteosarcoma. **Journal of Clinical Medicine**. Basel, v. 8, n. 10, p. 1661-1742. Out. 2019. DOI: 10.3390/jcm8101661.

BUENROSTRO, J.; WU, B.; CHANG, H.; GREENLEAF, W. ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide. In: Ausubel Frederick M, et al., editors. **Current protocols in molecular biology**. New York, v. 109. p. 21.9.1–9.9. Jan. 2015. DOI: 10.1002/0471142727.mb2129s109.

BYLER, S.; GOLDFAR, S.; HEERBOTH, S.; LEARY, M.; HOUSMAN, G.; MOULTON, K.; SARKAR, S. Genetic and Epigenetic Aspects of Breast Cancer Progression and Therapy. **Anticancer Research**. Athens, v. 34, n. 3, p. 1071-1077. Mar. 2014.

CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; PINGARRÓN, J. M. Non-Invasive Breast Cancer Diagnosis Through Electrochemical Biosensing at Different Molecular Levels. **Sensors**. Basel, v. 17, n. 9, p. 1993. Ago. 2017. DOI: 10.3390/s17091993.

CAO, R.; WANG, L.; WANG, H.; XIA, L.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; JONES, R. S.; ZHANG, Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. **Science**. New York, v. 298, n. 5595, p. 1039-1043. Nov. 2002. DOI: 10.1126/science.1076997.

CAO, L.; WU, G.; ZHU, J.; TAN, Z.; SHI, D.; WU, X.; TANG, M.; LI, Z.; HU, Y.; ZHANG, S.; YU, R.; MO, S.; WU, J.; SONG, ERWEI, S.; LI, M.; SONG, L.; LI, J. Genotoxic stress-triggered β -catenin/JDP2/PRMT5 complex facilitates reestablishing glutathione homeostasis. **Nature Communications**. London, v. 10, p. 3761. Ago. 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-11696-7.

CARDOSO, A. R.; MOREIRA, F. T. C.; FERNANDES, R.; SALES, M. G. F. Novel and simple electrochemical biosensor monitoring attomolar levels of miRNA-155 in Breast Cancer. **Biosensors & bioelectronics**. Oxford, v. 80, p. 621-630. Jun. 2016. DOI: 10.1016/j.bios.2016.02.035.

CARÈ, A.; BELLENGHI, M.; MATARRESE, P.; GABRIELE, L.; SALVIOLI, S.; MALORNI, W. Sex disparity in cancer: roles of microRNAs and related functional players. **Cell Death & Differentiation**. London, v. 25, n. 3, p. 477-485. Mar. 2018. DOI: 10.1038/s41418-017-0051-x.

CHEN, X.; LIANG, H.; ZHANG, J.; ZEN, K.; ZHANG, C. Y. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. **Protein & Cell**. Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 28-37. Jan. 2012. DOI: 10.1007/s13238-012-2003-z.

CHENG, H. H.; YI, H. S.; KIM, Y.; KROH, E. M.; CHIEN, J. W.; EATON, K. D.; GOODMAN, M. T.; TAIT, J. F.; TEWARI, M.; PRITCHARD, C. C. Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels. **Public Library of Science ONE**. San Francisco, v. 8, n. 6, p. 1-11. Jun. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0064795.

CHIMGE, N. O.; LITTLE, G. H.; BANIWAL, S. V.; ADISETIYO, H.; XIE, Y.; ZHANG, T.; O'LAUGHLIN, A.; LIU, Z. Y.; ULRICH, P.; MARTIN, A.; MHAWECH-FAUCEGLIA, P.; ELLIS, M. J.; TRIPATHY, D.; GROSHEN, S.; LIANG, C.; LI, Z.; SCHONES, D. E.; FRENKEL, B. RUNX1 prevents oestrogen-mediated AXIN1 suppression and β -catenin activation in ER-positive breast cancer. **Nature Communications**. London, v. 7, n. 10751, p. 1-12. Fev. 2016. DOI: 10.1038/ncomms10751.

COELHO, A. S.; SANTOS, M. A. S.; CAETANO, R. I.; PIOVESAN, C. F.; MACHADO, R. L. D.; FURINI, A. A. C. Predisposição hereditária ao câncer de mama e sua relação com os genes BRCA1 e BRCA2: revisão da literatura. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. Rio de Janeiro, v. 50, n. 1, p. 17-21. Abr. 2018. DOI: 10.21877/2448-3877.201800615.

CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; PINGARRÓN, J. M. Non-Invasive Breast Cancer Diagnosis through Electrochemical Biosensing at Different Molecular Levels. *Sensors*. Basel, v. 17, n. 9, p. 1993. Set. 2017. DOI: 10.3390/s17091993.

CHEN, X.; BA, Y.; MA, L.; CAI, X.; YIN, Y.; WANG, K.; GUO, J.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; GUO, X.; LI, Q.; LI, X.; WANG, W.; ZHANG, Y.; WANG, J.; JIANG, X.; XIANG, Y.; XU, C.; ZHENG, P.; ZHANG, J.; LI, R.; ZHANG, H.; SHANG, X.; GONG, T.; NING, G.; WANG, J.; ZEN, K.; ZHANG, J.; ZHANG, C. Y. Characterization of microRNAs in Serum: A Novel Class of Biomarkers for Diagnosis of Cancer and Other Diseases. *Cell Research*. Basingstoke, v. 18, n. 10, p. 997-1006. Out. 2008. DOI: 10.1038/cr.2008.282.

COOKS, V. J.; BENTLEY, M. A.; HOGAN, B. V.; HORGAN, K.; HAYWARD, B. E.; HAZELWOOD, L. D.; HUGHES, T. A. Circulating microRNA Profiles Reflect the Presence of Breast Tumours but Not the Profiles of microRNAs Within the Tumours. **Cellular Oncology**. Dordrecht, v. 35, n. 4, p. 301-308. Ago. 2012. DOI: 10.1007/s13402-012-0089-1.

CORDEIRO, A. M.; DE OLIVEIRA, G. M.; RENTERÍA, J. M.; GUIMARÃES, C. A. Revisão Sistemática: uma revisão narrativa. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. Rio de Janeiro, v. 34, n. 6, p. 428-431, 2007.

CORTEZ, C. C.; JONES, P. A. Chromatin, cancer and drug therapies. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 647, n. 1-2, p. 44-51. Dez. 2008. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.006.

COSTA-PINHEIRO, P.; MONTEZUMA, D.; HENRIQUE, R.; JERÓNIMO, C. Diagnostic and prognostic epigenetic biomarkers in cancer. **Epigenomics**. London, v. 7, n. 6, p. 1003-1015. DOI:10.2217/epi.15.56.

CROWLEY, E.; DI NICOLANTONIO, F.; LOUPAKIS, F.; BARDELLI, A. Liquid Biopsy: Monitoring Cancer-Genetics in the Blood. **Nature reviews. Clinical oncology**. London, v. 10, n. 8, p. 472-484. Ago. 2013. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.110.

DAGDEMIR, A.; DURIF, J.; NGOLLO, M.; BIGNON, Y. J.; BERNARD-GALLON, D. Breast cancer: mechanisms involved in action of phytoestrogens and epigenetic changes. **In vivo**. Athens, v. 27, n. 1, p. 1-9. Jan.-Fev. 2013.

DALVAI, M.; BYSTRICKY, K. The role of histone modifications and variants in regulating gene expression in breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. New York, v. 15, n. 1, p. 19-33. Mar. 2010. DOI: 10.1007/s10911-010-9167-z.

DE AZAMBUJA, E.; CARDOSO, F.; DE CASTRO, G. C.; COLOZZA, M.; MANO, M. S.; DURBECQ, V.; SOTIRIOU, C.; LARSIMONT, D.; PICCART-GEBHART, M. J.; PAESMANS, M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12.155 patients. **British Journal of Cancer**. London, v. 96, n. 10, p. 1504-1513. Mai. 2007. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603756.

DEY, S. Preventing breast cancer in LMICs via screening and/or early detection: The real and the surreal. **World Journal of Clinical Oncology**. Hong Kong, v. 10, n. 3., p. 509-519. Ago. 2014. DOI: 10.5306/wjco.v5.i3.509.

DRUKTEINIS, J. S.; MOONEY, B. P.; FLOWERS, C. I.; GATENBY, R. A. Beyond Mammography: New Frontiers in Breast Cancer Screening. **The American journal of medicine**. New York, v. 126, n. 6, p. 472-479. Jun. 2013. DOI: 10.1016/j.amjmed.2012.11.025.

DUMITRESCU, R. G. Early Epigenetic Markers for Precision Medicine. **Methods in Molecular Biology**. Clifton, v. 1856, p. 3-17. 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-8751-1_1.

EICHELSER, C.; FLESCH-JANYS, D.; CHANG-CLAUDE, J.; PANTEL, K.; SCHWARZENBACH, H. Deregulated Serum Concentrations of Circulating Cell-Free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in Human Breast Cancer Development and Progression. **Clinical Chemistry**. Baltimore, v. 59, n. 10, p. 1489-1496. Out. 2013. DOI: 10.1373/clinchem.2013.205161.

EICHELSER, C.; STÜCKRATH, I.; MÜLLER, V.; MILDE-LANGOSCH, K.; WIKMAN, H.; PANTEL, K.; SCHWARZENBACH, H. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. **Oncotarget**. Albany, v. 5, n. 10, p. 9650-9663. Out. 2014. DOI: 10.18632/oncotarget.2520.

ELSHEIKH, S. E.; GREEN, A. R.; RAKHA, E. A.; POWE, D. G.; AHMED, R. A.; COLLINS, H. M.; SORIA, D.; GARIBALDI, J. M.; PAISH, C. E.; AMMAR, A. A.; GRAINGE, M. J.; BALL, G.

R.; ABDELGHANY, M. K.; MARTINEZ-POMARES, L.; HEERY, D. M.; ELLIS, I. O. Global Histone Modifications in Breast Cancer Correlate With Tumor Phenotypes, Prognostic Factors, and Patient Outcome. **Cancer research**. Baltimore, v. 69, n. 9, p. 3802-3809. Mai. 2009. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3907.

ESTELLER, M.; CORN, P. G.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Research**. Baltimore, v. 61, n. 8, p. 3225-3229. Abr. 2001.

FACKLER, M. J.; UMBRIGHT, C. B.; WILLIAMNS, D.; ARGANI, P.; CRUZ, L. A.; MERINO, V. F.; TEO, W. W.; ZHANG, Z.; HUANG, P.; VISVANANTHAN, K.; MARKS, J.; ETHIER, S.; GRAY, J. W.; WOLFF, A. C.; COPE, L. M.; SUKUMAR, S. Genome-wide methylation analysis identifies genes specific to breast cancer hormone receptor status and risk of recurrence. **Cancer Research**. Baltimore, v. 71, n. 19, p. 6195-6207. Out. 2011. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1630.

FANG, F.; TURCAN, S.; RIMNER, A.; KAUFMAN, A.; GIRI, D.; MORRIS, L. G.; SHEN, R.; SESHAN, V.; MO, Q.; HEGUY, A.; BAYLIN, S. B.; AHUJA, N.; VIALE, A.; MASSAGUE, J.; NORTON, L.; VAHDAT, L. T.; MOYNAHAN, M. E.; CHAN, T. A. Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. **Science translational medicine**. Washington, v. 3, n. 75. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001875.

FANG, R.; ZHU, R.; HU, L.; KHADKA, V. S.; AI, J.; ZOU, H.; JU, D.; JIANG, B.; DENG, Y.; HU, X. Plasma MicroRNA Pair Panels as Novel Biomarkers for Detection of Early Stage Breast Cancer. **Frontiers in Physiology**. Lausanne, v. 9, p. 1879. Jan. 2018. DOI: 10.3389/fphys.2018.01879.

FARALDI, M.; GOMARASCA, M.; BANFI, G.; LOMBARDI, G. Free Circulating miRNAs Measurement in Clinical Settings: the still unsolved issue of the normalization. **Advances in Clinical Chemistry**. New York, v. 87, p. 113-139. Ago. 2018. DOI: 10.1016/bs.acc.2018.07.003.

FERRARI, N.; MOHAMMED, Z. M. A.; NIXON, C.; MASON, S. M.; CAMERON, E. R.; EDWARDS, J.; BLYTH, K. Expression of RUNX1 Correlates with Poor Patient Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. **Public Library of Science ONE**. San Francisco, v. 9, n. 6, p. 1-9. Jun. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0100759.

FILIPÓW, S.; ŁACZMAŃSKI, Ł. Blood Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers for Diagnosis and Surgical Treatment Response. **Frontiers in Genetics**. Lausanne, v. 10, p. 169. Mar. 2019. DOI: 10.3389/fgene.2019.00169.

FLANAGAN, J. M.; COCCIARDI, S.; WADDELL, N.; JOHSTONE, C. N.; MARSH, A.; HENDERSON, S.; SIMPSON, P.; DA SILVA, L.; KHANNA, K.; LAKHANI, S.; BOSHOFF, C.; CHENEVIX-TRENCH, G. DNA methylome of familial breast cancer identifies distinct profiles defined by mutation status. **American Journal of human genetics**. Baltimore, v. 86, n. 3, p. 420-433. Mar. 2010. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.02.008.

FROMMER, M.; MCDONALD, L. E.; MILLAR, D. S.; COLLIS, C. M.; WATT, F.; GRIGG, G. W.; MOLLOY, P. L.; PAUL, C. L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 89, n. 5, p. 1827-1831. Mar. 1992. DOI: 10.1073/pnas.89.5.1827.

FU, S. W.; LEE, W.; COFFEY, C.; LEAN, A.; WU, X.; TAN, X.; MAN, Y. G.; BREM, R. F. MiRNAs as potential biomarkers in early breast cancer detection following mammography. **Cell & Bioscience**. London, v. 6, p. 6. Jan. 2016. DOI: 10.1186/s13578-016-0071-0.

GAN, L.; YANG, Y.; LI, Y.; FENG, Y.; LIU, T.; GUO, W. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. **Biomarker Research**. London, v. 6, p. 10. Mar. 2018. DOI: 10.1186/s40364-018-0122-2.

GHORAI, A.; GHOSH, U. MiRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes. **Frontiers in Genetics**. Lausanne, v. 5, n. 100. Apr. 2014. DOI: 10.3389/fgene.2014.00100.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H. J. Strategies for subtypes — dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology**. Boston, v. 22, n. 8, p. 1736-1747. Ago. 2011. DOI: 10.1093/annonc/mdr304.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H. J. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**. Boston, v. 24, n. 9, p. 2206-2223. Set. 2013. DOI: 10.1093/annonc/mdt303.

GORODETSKA, I.; KOZERETSKA, I.; DUBROVSKA, A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. **Journal of Cancer**. Wyoming, v. 10, n. 9, p. 2109-2127. Mai. 2019. DOI: 10.7150/jca.30410.

GUERRERO-PRESTON, R.; HADAR, T.; OSTROW, K. L.; SOUDRY, E.; ECHENIQUE, M.; ILLI-GANGAS, C.; PÉREZ, G.; PEREZ, J.; BREBI-MIEVILLE, P.; DESCHAMPS, J.; MORALES, L.; BAYONA, M.; SIDRANSKY, D.; MATTA, J. Differential promoter methylation of kinesin family member 1a in plasma is associated with breast cancer and DNA repair capacity. **Oncology Reports**. Athens, v. 32, n. 2, p. 505-512. Ago. 2014. DOI: 10.3892/or.2014.3262.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature reviews. Molecular cell Biology**. London, v. 15, n. 8, p. 509-524. Ago. 2014. DOI: 10.1038/nrm3838.

HACKL, M.; HEILMEIER, U.; WEILNER, S.; GRILLARI, J. Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone diseases - Complex signatures for multifactorial diseases? **Molecular and cellular Endocrinology**. Limerick, v. 432, p. 83-85. Set. 2016. DOI: 10.1016/j.mce.2015.10.015.

HAŁASA, M.; WAWRUSZAK, A.; PRZYBYSZEWSKA, A.; JARUGA, A.; GUZ, M.; KAŁAFUT, J.; STEPULAK, A.; CYBULSKI, M. H3K18Ac as a Marker of Cancer Progression and Potential Target of Anti-Cancer Therapy. **Cells**. Basel, v. 8, n. 5, p. 485. Mai. 2019. DOI: 10.3390/cells8050485.

HAMAM, R.; ALI, A. M.; ALSALEH, K. A.; KASSEM, M.; ALFAYEZ, M.; ALDAHMAH, A.; ALAJEZ, N. M. MicroRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. **Scientific Reports**. London, v. 6, p. 25997. Mai. 2016. DOI: 10.1038/srep25997.

HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Amsterdam, v. 87, p. 3-14. Mai. 2015. DOI: 10.1016/j.addr.2015.05.001.

HAN, L. L.; HOU, L.; ZHOU, M. J.; MA, Z. L.; LIN, D. L.; WU, L.; GE, Y. L. Aberrant NDRG1 methylation associated with its decreased expression and clinicopathological significance in breast cancer. **Journal of Biomedical science**. New York, v. 20, p. 52. Jul. 2013. DOI: 10.1186/1423-0127-20-52.

HEALEY, M. A.; HU, R.; BECK, A. H.; COLLINS, L. C.; SCHNITT, S. J.; TAMIMI, R. M.; HAZRA, A. Association of H3K9me3 and H3K27me3 repressive histone marks with breast cancer subtypes in the Nurses' Health Study. **Breast Cancer research and treatment**. Dordrecht, v. 147, n. 3, p. 639-651. Out. 2014. DOI: 10.1007/s10549-014-3089-1.

HENEGHAN, H. M.; MILLER, N.; LOWERY, A. J.; SWEENEY, K. J.; NEWELL, J.; KERIN, M. J. Circulating microRNAs as Novel Minimally Invasive Biomarkers for Breast Cancer. **Annals of Surgery**. Philadelphia, v. 251, n. 3, p. 499-505. Mar. 2010. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3181cc939f.

HERZ, H. M.; GARRUSS, A.; SHILATIFARD, A. SET for life: biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins. **Trends in biochemical sciences**. Amsterdam, v. 38, n. 12, p. 621-639. Dez. 2013. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.09.004.

HOI, C. S. L.; LEE, S. E.; LU, S. Y.; MCDERMITT, D. J.; OSORIO, K. M.; PISKUN, C. M.; PETERS, R. M.; PAUS, R.; TUMBAR, T. Runx1 Directly Promotes Proliferation of Hair Follicle Stem Cells and Epithelial Tumor Formation in Mouse Skin. **Molecular and Cellular Biology**. Washington, v. 30, n. 10, p. 2518-2536. Mar. 2010. DOI: 10.1128/MCB.01308-09.

HOLM, K.; HEGARDT, C.; STAAF, J.; VALLON-CHRISTERSSON, J.; JÖNSSON, G.; OLSSON, H.; BORG, A.; RIGNÉR, M. Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. **Breast Cancer Research**. London, v. 12, n. 3, p. 1-16. Jun. 2010. DOI: 10.1186/bcr2590.

HOLM, K.; GRABAU, D.; LÖVGREN, K.; ARADOTTIR, S.; GRUVBERGER-SAAL, S.; HOWLIN, J.; SAAL, L. H.; ETHIER, S. P.; BENDAHL, P. O.; STÅL, O.; MALMSTRÖM, P.; FERNÖ, M.; RYDÉN, L.; HEGARDT, C.; BORG, Å.; RINGNÉR, M. Global H3K27 trimethylation and EZH2 abundance in breast tumor subtypes. **Molecular Oncology**. Amsterdam, v. 6, n. 5, p. 494-506. Jun. 2012. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.06.002.

HONORIO, S.; AGATHANGGELOU, A.; SCHUERMANN, M.; PANKOW, W.; VIACAVA, P.; MAHER, E. R.; LATIF, F. Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and ductal carcinoma in situ from breast cancer patients. **Oncogene**. Basingstoke, v. 22, n. 1, p. 147-150. Jan. 2003. DOI: 10.1038/sj.onc.1206057.

HU, D.; GARRUSS, A. S.; GAO, X.; MORGAN, M. A.; COOK, M.; SMITH, E. R.; SHILATIFARD, A. The MII2 branch of the COMPASS family regulates bivalent promoters in mouse embryonic stem cells. **Nature structural & molecular biology**. New York, v. 20, n. 9, p. 1093-1097. Abr. 2013. DOI: 10.1038/nsmb.2653.

HUYNH, N. C. N.; EVERTS, V.; AMPORNARAMVETH, R. S. Histone deacetylases and their roles in mineralized tissue regeneration. **Bone Reports**. Philadelphia, v. 7, p. 33-40. Dez. 2017. DOI: doi: 10.1016/j.bonr.2017.08.001.

INCA. **Câncer de mama - versão para Profissionais de Saúde**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama/profissional-de-saude>. Acesso em: 7 Mar. 2020.

INCA. **Estatísticas de câncer**. Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 13 Fev. 2020.

INIC, Z.; ZEGARAC, M.; INIC, M.; MARKOVIC, I.; KOZOMARA, Z.; DJURISIC, I.; INIC, I.; PUPIC, G.; JANCIC, S. Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. **Clinical Medicine Insights: Oncology**. Auckland, v. 8, n. 2014, p. 107-111. Set. 2014. DOI: 10.4137/CMO.S18006.

INNS, J.; JAMES, V. Circulating microRNAs for the Prediction of Metastasis in Breast Cancer Patients Diagnosed With Early Stage Disease. **Breast**. Edinburgh, v. 24, n. 4, p. 364-369. Ago. 2015. DOI: 10.1016/j.breast.2015.04.001.

IORIO, M. V.; FERRACIN, M.; LIU, C. G.; VERONESE, A.; SPIZZO, R.; SABBIONI, S.; MAGRI, E.; PEDRIALI, M.; FABBRI, M.; CAMPIGLIO, M.; MÉNARD, S.; PALAZZO, J. P.; ROSENBERG, A.; MUSIANI, P.; VOLINIA, S.; NENCI, I.; CALIN, G. A.; QUERZOLI, P.; NEGRINI, M.; CROCE, C. M. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. **Cancer Research**. Chicago, v. 65, n. 16, p. 7065-7070. Ago. 2005. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1783.

IORIO, M. V.; VISIONE, R.; DI LEVA, G.; DONATI, V.; PETROCCA, F.; CASALINI, P.; TACCIOLI, C.; VOLINIA, S.; LIU, C. G.; ALDER, H.; CALIN, G. A.; MÉNARD, S.; CROCE, C. M. MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer. **Cancer Research**. Chicago, v. 67, n. 18, p. 8699-8707. Set. 2007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1936.

JANKOWSKA, A. M.; MILLWARD, C.; CALDWELL, C. W. The potential of DNA modifications as biomarkers and therapeutic targets in oncology. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. London, v. 15, n. 10, p. 1325-1337. Set. 2015. DOI:10.1586/14737159.2015.1084229.

JENUWEIN, Y.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**. New York, v. 293, n. 5532, p. 1074-1080. Ago. 2011. DOI: 10.1126/science.1063127.

JIA, W.; WU, Y.; ZHANG, Q.; GAO, G.; ZHANG, C.; XIANG, Y. Expression profile of circulating microRNAs as a promising fingerprint for cervical cancer diagnosis and monitoring. **Molecular and Clinical Oncology**. London, v. 3, n. 4, p. 851-858. Jul. 2015. DOI: 10.3892/mco.2015.560.

JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J. **Genética Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. Recurso Eletrônico.

JØRGENSEN, S.; SCHOTTA, G.; SØRENSEN, C. S. Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. **Nucleic acids research**. London, v. 41, n. 5, p. 2797-2806. Mar. 2013. DOI: 10.1093/nar/gkt012.

JUDES, G.; DAGDEMIR, A.; KARSLI-CEPPIOGLU, S.; LEBERT, A.; ECHEGUT, M.; NGOLLO, M.; BIGNON, Y. J.; PENAULT-LLORCA, F.; BERNARD-GALLON, D. H3K4 acetylation, H3K9 acetylation and H3K27 methylation in breast tumor molecular subtypes. **Epigenomics**. London, v. 8, n. 7, p. 909-924. Jul. 2016. DOI: 10.2217/epi-2016-0015.

KAHLERT, C.; KALLURI, R. Exosomes in Tumor Microenvironment Influence Cancer Progression and Metastasis. *Journal of Molecular Medicine*. Berlin, v. 91, n. 4, p. 431-437. DOI: 10.1007/s00109-013-1020-6.

KAJABOVA, V.; SMOLKOVA, B.; ZMETAKOVA, I.; SEBOVA, K.; KRIVULCIK, T.; BELLA, V.; KAJO, K.; MACHALEKOVA, K.; FRIDRICOVA, I. RASSF1A Promoter Methylation Levels Positively Correlate with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer Patients. *Translational Oncology*. Ann Arbor, v. 6, n. 3, p. 297-304. Jun. 2013.

KAMIYA, T.; GOTO, A.; KUROKAWA, E.; HARA, H.; ADACHI, T. Cross Talk Mechanism among EMT, ROS, and Histone Acetylation in Phorbol Ester-Treated Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*. New York, v. 2016, p. 1284372. Mar. 2016. DOI: 10.1155/2016/1284372.

KARSLI-CEPPIOGLU, S.; DAGDEMIR, A.; JUDES, G.; NGOLLO, M.; PENAULT-LLORCA, F.; PAJON, A.; BERNARD-GALLON, D. Epigenetic mechanisms of Breast Cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics*. London, v. 6, n. 6, p. 651-664. Dez. 2014. DOI: 10.2217/epi.14.59.

KELLER, A.; LEIDINGER, P.; BORRIES, A.; WENDSCHLAG, A.; WUCHERPFENNIG, F.; SCHEFFLER, M.; HUWER, H.; LENHOF, H. P.; MEESE, E. MiRNAs in lung cancer - Studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments. *BioMed Central Cancer*. London, v. 9, p. 353. Out. 2009. DOI: 10.1186/1471-2407-9-353.

KELLY, A. D.; ISSA, J. P. J. Epigenetics and Cancer. In: Berger NA, editor. **Epigenetics, Energy Balance, and Cancer**. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 1–28.

KHAN, S. I.; AUMSUWAN, P.; KHAN, I. A.; WALKER, L. A.; DASMAHAPATRA, A. K. Epigenetics events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. *Chemical research in Toxicology*. Washington, v. 25, n. 1, p. 61-73. Jan. 2012. DOI: 10.1021/tx200378c.

KHOURY, S.; TRAN, N. Circulating microRNAs: Potential Biomarkers for Common Malignancies. *Biomarkers in Medicine*. London, v. 9, n. 2, p. 131-151. 2015. DOI: 10.2217/bmm.14.102.

KIM, H. Y.; CHOI, H. J.; LEE, J. Y.; KONG, G. Cancer Target Gene Screening: A Web Application for Breast Cancer Target Gene Screening Using Multi-Omics Data Analysis. *Briefings in bioinformatics*. London, v. 21, n. 2, p. 663-675. Mar. 2020. DOI: 10.1093/bib/bbz003.

KLOTEN, V.; BECKER, B.; WINNER, K.; SCHRAUDER, M. G.; FASCHING, P. A.; ANZENEDER, T.; VEECK, J.; HARTMANN, A.; KNÜCHEL, R.; DAHL, E. Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening. *Breast Cancer Research*. London, v. 15, n. 1, p. 1-11. Jan. 2013. DOI: 10.1186/bcr3375.

KROH, E. M.; PARKIN, R. K.; MITCHELL, P. S.; TEWARI, M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*. San Diego, v. 50, n. 4, p. 298-301. Abr. 2010. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.01.032.

LAIRD, P. W. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nature reviews. Genetics*. London, v. 11, n. 3, p. 191-203. Mar. 2010. DOI: 10.1038/nrg2732.

LAN, H.; LU, H.; WANG, X.; JIN, H. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Cancer: Opportunities and Challenges. **BioMed Research International**. New York, v. 2015, n. 125094, p. 1-17. Mar. 2015. DOI: 10.1155/2015/125094.

LEHNERTZ, B.; UEDA, Y.; DERIJCK, A. A.; BRAUNSCHWEIG, U.; PEREZ-BURGOS, L.; KUBICEK, S.; CHEN, T.; LI, E.; JENUWEIN, T.; PETERS, A. H. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. **Current Biology**. London, v. 13, n. 14, p. 1192-1200. Jul. 2003. DOI: 10.1016/s0960-9822(03)00432-9.

LI, Y.; TOLLEFSBOL, T. O. DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. **Methods in Molecular Biology**. Clifton, v. 791, p. 11-21. Dez. 2011. DOI: 10.1007/978-1-61779-316-5_2.

LI, Y.; SETO, E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. Woodbury, v. 6, n. 10, p. a026831. Out. 2016. DOI: 10.1101/cshperspect.a026831.

LI, S.; YANG, X.; YANG, J.; ZHEN, J.; ZHANG, D. Serum microRNA-21 as a Potential Diagnostic Biomarker for Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Clinical and Experimental Medicine**. Milano, v. 16, n. 1, p. 29-35. Fev. 2016. DOI: 10.1007/s10238-014-0332-3.

LIU, N.; LI, S.; WU, N.; CHO, K. S. Acetylation and deacetylation in cancer stem-like cells. **Oncotarget**. Albany, v. 8, n. 51, p. 89315-89325. Jul. 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.19167.

LIU, T.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.; LI, C.; MIAO, Y. R.; LEI, Q.; LI, Q.; GUO, A. Y. EVmiRNA: A Database of miRNA Profiling in Extracellular Vesicles. **Nucleic Acids Research**. London, v. 47, v. D1, p. D89-D93. Jan. 2019. DOI: 10.1093/nar/gky985.

LIMA-OLIVEIRA, G.; GUIDI, G. C.; SALVAGNO, G. L.; BROCCO, G.; DANESE, E.; LIPPI, G. Estimation of the imprecision on clinical chemistry testing due to fist clenching and maintenance during venipuncture. **Clinical Biochemistry**. Tarrytown, v. 49, n. 18, p. 1364-1367. Dez. 2016. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.07.007.

LOCKE, W. J.; CLARK, S. J. Epigenome remodeling in breast cancer: insights from an early in vitro model of carcinogenesis. **Breast Cancer Research**. London, v. 14, n. 6, p. 215-229. Nov. 2012. DOI: 10.1186/bcr3237.

LU, J.; GETZ, G.; MISKA, E. A.; ALVAREZ-SAAVEDRA, E.; LAMB, J.; PECK, D.; SWEET-CORDERO, A.; EBERT, B. L.; MAK, R. H.; FERRANDO, A. A.; DOWNING, J. R.; JACKS, T.; HORVITZ, R.; GOLUB, T. R. MicroRNA Expression Profiles Classify Human Cancers. **Nature**. Basingstoke, v. 435, n. 7043, p. 834-838. Jun. 2005. DOI: 10.1038/nature03702.

LUDWIG, N.; LEIDINGER, P.; BECKER, K.; BACKES, C.; FEHLMANN, T.; PALLASCH, C.; RHEINHEIMER, S.; MEDER, B.; STÄHLER, C.; MEESE, E.; KELLER, A. Distribution of miRNA expression across human tissues. **Nucleic Acids Research**. London, v. 44, n. 8, p. 3865-3877. Mai. 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw116.

MADHAVAN, D.; PENG, C.; WALLWIENER, M.; ZUCKNICK, M.; NEES, J.; SCHOTT, S.; RUDOLPH, A.; RIETHDORF, S.; TRUMPP, A.; PANTEL, K.; SOHN, C.; CHANG-CLAUDE, J.; SCHNEEWEISS, A.; BURWINKEL, B. Circulating miRNAs With Prognostic Value in

Metastatic Breast Cancer and for Early Detection of Metastasis. **Carcinogenesis**. Oxford, v. 37, n. 5, p. 461-470. Mai. 2016. DOI: 10.1093/carcin/bgw008.

MARKOU, A.; ZAVRIDOU, M.; SOURVINOU, I.; YOUSEF, G.; KOUNELIS, S.; MALAMOS, N.; GEORGOULIAS, V.; LIANIDOU, E. Direct Comparison of Metastasis-Related miRNAs Expression Levels in Circulating Tumor Cells, Corresponding Plasma, and Primary Tumors of Breast Cancer Patients. **Clinical Chemistry**. Baltimore, v. 62, n. 7, p. 1002-1011. Jul. 2016. DOI: 10.1373/clinchem.2015.253716.

MATAMALA, N.; VARGAS, M. T.; GONZÁLEZ-CÁMPORA, R.; MIÑAMBRES, R.; ARIAS, J. I.; MENÉNDEZ, P.; ADRÉS-LÉON, E.; GÓMEZ-LOPEZ, G.; YANOWSKY, K.; CALVETE-CANDENAS, J.; INGLADA-PÉREZ, L.; MARTÍNEZ-DELGADO, B.; BENÍTEZ, J. Tumor microRNA Expression Profiling Identifies Circulating microRNAs for Early Breast Cancer Detection. **Clinical Chemistry**. Baltimore, v. 61, n. 8, p. 1098-1106. Jun. 2015. DOI: 10.1373/clinchem.2015.238691.

MATSUYAMA, H.; SUZUKI, H. I. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**. Basel, v. 21, n. 1, p. 132. Jan. 2020. DOI: 10.3390/ijms21010132.

MCDERMOTT, A. M.; MILLER, N.; WALL, D.; MARTYN, L. M.; BALL, G.; SWEENEY, K. J.; KERIN, M. J. Identification and Validation of Oncologic miRNA Biomarkers for Luminal A-like Breast Cancer. **Public Library of Science One**. San Francisco, v. 9, n. 1, p. e87032. Jan. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0087032.

MCGINTY, R. K.; TAN, S. Nucleosome Structure and Function. **Chemical Reviews**. Washington, v. 115, n. 6, p. 2255-2273. Mar. 2015. DOI: 10.1021/cr500373h.

MESSIER, T. L.; GORDON, J. A. R.; BOYD, J. R.; TYE, C. E.; BROWNE, G.; STEIN, J. L.; LIAN, J. B.; STEIN, G. S. Histone H3 lysine 4 acetylation and methylation dynamics define breast cancer subtypes. **Oncotarget**. Albany, v. 7, n. 5, p. 5094-5109. Fev. 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.6922.

MESTDAGH, P.; HARTMANN, N.; BAERISWYL, L.; ADREASEN, D.; BERNARD, N.; CHEN, C.; CHEO, D.; D'ANDRADE, P.; DEMAYO, M.; DENNIS, L.; DERVEUX, S.; FENG, Y.; FULMER-SMENTEK, S.; GERTSMAYER, B.; GOUFFON, J.; GRIMLEY, C.; LADER, E.; LEE, K. Y.; LUO, S.; MOURITZEN, P.; NARAYANAN, A.; PATEL, S.; PEIFFER, S.; RÜBERG, S.; SCHROTH, G.; SCHUSTER, D.; SHAFFER, J. M.; SHELTON, E. J.; SILVERIA, S.; ULMANELLA, U.; VEERAMACHANENI, V.; STAEDTLER, F.; PETERS, T.; GUETTOUCHE, T.; WONG, L.; VANDESOMPELE, J. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. **Nature Methods**. New York, v. 11, n. 8, p. 809-815. Ago. 2014. DOI: 10.1038/nmeth.3014.

MISHRA, S.; SRIVASTAVA, A. K.; SUMAN, S.; KUMAR, V.; SHUKLA, Y. Circulating miRNAs Revealed as Surrogate Molecular Signatures for the Early Detection of Breast Cancer. **Cancer Letters**. Limerick, v. 369, n. 1, p. 67-75. Dez. 2015. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.045.

MO, M. H.; CHEN, L.; FU, Y.; WANG, W.; FU, S. W. Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. **Journal of Cancer**. Wyoming, v. 3, p. 432-448. Out. 2012. DOI: 10.7150/jca.4919.

MOHAN, M.; HERZ, H. M.; SHILATIFARD, A. Snapshot: Chromatin Lysine Methylase Complexes: Transcriptional Regulation and Epigenetics. **Cell**. Cambridge, v. 149, n. 2, p. 498. Abr. 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.025.

MOLDOVAN, L.; BATTE, K.; WANG, Y.; WISLER, J.; PIPER, M. Analyzing the Circulating MicroRNAs in Exosomes/Extracellular Vesicles from Serum or Plasma by qRT-PCR. **Methods in Molecular Biology**. Totowa, v. 1024, p. 129-145. Fev. 2013. DOI: 10.1007/978-1-62703-453-1_10.

NASSAR, F. J.; NASR, R.; TALHOUK, R. MicroRNAs as Biomarkers for Early Breast Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy Prediction. **Pharmacology & therapeutics**. Oxford, v. 172, p. 24-49. Abr. 2017. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.11.012.

NEAL, C. S.; MICHAEL, M. Z.; PIMLOTT, L. K.; YONG, T. Y.; LI, J. Y.; GLEADLE, J. M. Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease. **Nephrology, dialysis, transplantation**. Oxford, v. 26, n. 11, p. 3794-3802. Nov. 2011. DOI: 10.1093/ndt/gfr485.

NEBBIOSO, A.; TAMBARO, F. P.; DELL'AVERSANA, C.; ALTUCCI, L. Cancer epigenetics: Moving forward. **Public Library of Science genetics**. San Francisco, n. 14, v. 6, p. 1-25. Jun. 2018. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007362.

NGUYEN, A. T.; ZHANG, Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. **Genes & Development**. Cold Spring Harbor, v. 25, n. 13, p. 1345-1358. Jul. 2011. DOI: 10.1101/gad.2057811.

PANTEL, K.; PARNABIÈRES, C. A. Liquid biopsy: Potential and challenges. **Molecular oncology**. Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 371-373. Mar. 2016. DOI: 10.1016/j.molonc.2016.01.009.

PÉREZ-SOLIS, M. A.; NUÑEZ-MAYA, G.; GONZÁLEZ-CASAS, P.; OLIVARE, A.; AGUILAR-ROJAS, A. Effects of the lifestyle habits in breast cancer transcriptional regulation. **Cancer cell international**. London, v. 16, p. 7. Fev. 2016. DOI: 10.1186/s12935-016-0284-7.

PESSÔA-PEREIRA, D.; EVANGELISTA, A. F.; CAUSIN, R. L.; VIEIRA, R. A. C.; ABRAHÃO-MACHADO, L. F.; SANTANA, I. V. V.; SILVA, V. D.; SOUZA, K. C. B.; OLIVEIRA-SILVA, R. J.; FERNANDES, G. C.; REIS, R. M.; PALMERO, E. I.; MARQUES, M. M. C. MiRNA expression profiling of hereditary breast tumors from BRCA1- and BRCA2-germline mutation carriers in Brazil. **BMC Cancer**. London, v. 20, n. 143, p. 1-10. Fev. 2020. DOI: 10.1186/s12885-020-6640-y.

PIGATI, L.; YADDANAPUDI, S. C. S.; IYENGAR, R.; KIM, D. J.; HEARN, S. A.; DANFORTH, D.; HASTINGS, M. L.; DUELLI, D. M. Selective Release of MicroRNA Species from Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. **Public Library of Science One**. San Francisco, v. 5, n. 10, p. e13515. Out. 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0013515.

PIUNTI, A.; SHILATIFARD, A. Epigenetic Balance of Gene Expression by Polycomb and COMPASS Families. **Science**. New York, v. 352, n. 6290, p. aad9780. Jun. 2016. DOI: 10.1126/science.aad9780.

PIVA, R.; SPANDIDOS, D. A.; GAMBARI, R. From microRNA functions to microRNA therapeutics: Novel targets and novel drugs in breast cancer research and treatment. **International Journal of Oncology**. Athens, v. 43, n. 4, p. 985-994. Out. 2013. DOI: 10.3892/ijo.2013.2059.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**. New Jersey, v. 5, n. 1, p. 5-23. Fev. 2011. DOI: 10.1016/j.molonc.2010.11.003.

RAULUSEVICIUTE, I.; DRABLØS, F.; RYE, M. B. DNA methylation data by sequencing: experimental approaches and recommendations for tools and pipelines for data analysis. **Clinical Epigenetics**. Berlin, v. 11, n. 193. DOI: 10.1186/s13148-019-0795-x.

RAYCHAUDHURI, M.; BRONGER, H.; BUCHNER, T.; KIECHLE, M.; WEICHERT, W.; AVRIL, S. MicroRNAs miR-7 and miR-340 predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. Dordrecht, v. 162, n. 3, p. 511-521. Abr. 2017. DOI: 10.1007/s10549-017-4132-9.

RUIKE, Y.; IMANAKA, Y.; SATO, F.; SHIMIZU, K.; TSUJIMOTO, G. Genome-wide analysis of aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing. **BioMed Central Genomics**. London, v. 11, p. 137. Fev. 2010. DOI: 10.1186/1471-2164-11-137.

SAHLBERG, K. K.; BOTTAI, G.; NAUME, B.; BURWINK, B.; CALIN, G. A.; BØRRESEN-DALE, A. L.; SANTARPIA, L. A Serum microRNA Signature Predicts Tumor Relapse and Survival in Triple-Negative Breast Cancer Patients. **Clinical Cancer Research**. Denville, v. 21, n. 5, p. 1207-1214. Mar. 2015. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2011.

SANTOS-ROSA, H.; SCHNEIDER, R.; BANNISTER, A. J.; SHERRIFF, J.; BERNSTEIN, B. E.; EMRE, N. C.; SCHREIBER, S. L.; MELLOR, J.; KOUZARIDES, T. Active genes are trimethylated at K4 of histone H3. **Nature**. Basingstoke, v. 419, n. 6905, p. 407-411. Set. 2002. DOI: 10.1038/nature01080.

SAWAN, C.; HERCEG, Z. Histone modifications and cancer. **Advances in genetics**. San Diego, v. 70, p.57-85. 2010. DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60003-4.

SCHRAUDER, M. G.; STRICK, R.; SCHULZ-WENDTLAND, R.; STRISSEL, P. L.; KAHMANN, L.; LOEHLBERG, C. R.; LUX, M. P.; JUD, S. M.; HARTMANN, A.; HEIN, A.; BAYER, C. M.; BANI, M. R.; RICHTER, S.; ADAMIETZ, B. R.; WENKEL, E.; RAUH, C.; BECKMANN, M. W.; FESCHING, P. A. Circulating Micro-RNAs as Potential Blood-Based Markers for Early Stage Breast Cancer Detection. **Public Library of Science One**. San Francisco, v. 7, n. 1, p. e29770. Jan. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0029770.

SCHWARZENBACH, H. Circulating nucleic acids as biomarkers in breast cancer. **Breast Cancer Research**. London, v. 15, n. 5, p. 211. Set. 2013. DOI: 10.1186/bcr3446.

SHAH, M. Y.; CALIN, G. A. The Mix of Two Worlds: Non-Coding RNAs and Hormones. **Nucleic Acid Therapeutics**. New Rochelle, v. 23., n. 1, p. 2-8. Fev. 2013. DOI: 10.1089/nat.2012.0375.

SHEIKH, B. N.; AKHTAR, A. The many lives of KATs - detectors, integrators and modulators of the cellular environment. **Nature Reviews. Genetics**. London, v. 20, n. 1, p. 7-23. Jan. 2019. DOI: 10.1038/s41576-018-0072-4.

SHENDE, V. R.; GOLDRICK, M. M.; RAMANI, S.; EARNEST, D. J. Expression and Rhythmic Modulation of Circulating MicroRNAs Targeting the Clock Gene Bmal1 in Mice. **Public Library of Science ONE**. San Francisco, v. 6, n. 7, p. 1-10. Jul. 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0022586.

SHIGEYASU, K.; TODEN, S.; ZUMWALT, T. J.; OKUGAWA, Y.; GOEL, A. Emerging Role of MicroRNAs as Liquid Biopsy Biomarkers in Gastrointestinal Cancers. **Clinical cancer**

research. Denville, v. 23, n. 10, p. 2391-2399. Mai. 2017. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1676.

SINGH, R.; BASSETT, E.; CHAKRAVARTI, A.; PARTHUN, M. R. Replication-dependent histone isoforms: a new source of complexity in chromatin structure and function. **Nucleic Acids Research.** London, v. 46, n. 17, p. 8665-8678. Set. 2018. DOI: 10.1093/nar/gky768.

SINGH, B. N.; ZHANG, G.; HWA, Y. L.; LI, J.; DOWDY, S. C.; JIANG, S. W. Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. **Expert review of anticancer therapy.** London, v. 10, n. 6, p.935-954. Jun. 2010. DOI: 10.1586/era.10.62.

SOHEL, M. H. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. **Achievements in the Life Sciences.** Primorsky Krai, v. 10, n. 2, p. 175-186. Dez. 2016. DOI: 10.1016/j.als.2016.11.007.

SOURVINOU, I. S.; MARKOU, A.; LIANIDOU, E. S. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. **The Journal of Molecular Diagnostics.** New York, v. 15, n. 6, p. 827-834. Nov. 2013. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2013.07.005.

SPANGLE, J. M.; DREIJERINK, K. M.; GRONER, A. C.; CHENG, H.; OHLSON, C. E.; REYES, J.; LIN, C. Y.; BRADNER, J.; ZHAO, J. J.; ROBERTS, T. M.; BROWN, M. PI3K/AKT signaling regulates H3K4 methylation in breast cancer. **Cell reports.** Cambridge, v. 15, n. 12, p. 2692-2704. Jun. 2016. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.05.046.

STEFANSSON, O.; VILLANUEVA, A.; VIDAL, A.; MARTÍ, L.; ESTELLER, M. BRCA1 epigenetic inactivation predicts sensitivity to platinum-based chemotherapy in breast and ovarian cancer. **Epigenetics.** Georgetown, v. 7, n. 11, p. 1225-1229. Nov. 2012. DOI: 10.4161/epi.22561

STÜCKRATH, I.; RACK, B.; JANNI, W.; JÄGER, B.; PANTEL, K.; SCHWARZENBACH, H. Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients. **Oncotarget.** Albany, v. 6, n. 15, p. 13387-13401. Mai. 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.3874.

SU, Y.; HOPFINGER, N. R.; NGUYEN, T. D.; POGASH, T. J.; SANTUCCI-PEREIRA, J.; RUSSO, J. Epigenetic reprogramming of epithelial mesenchymal transition in triple negative breast cancer cells with DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.** London, v. 37, p. 314. Dez. 2018. DOI: 10.1186/s13046-018-0988-8.

SUN, Y.; WANG, M.; LIN, G.; SUN, S.; LI, X.; QI, J.; LI, J. Serum MicroRNA-155 as a Potential Biomarker to Track Disease in Breast Cancer. **Public Library of Science One.** San Francisco, v. 7, n. 10, p. e47003. Out. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0047003.

SZERLONG, H. J.; HANSEN, J. C. Nucleosome distribution and linker DNA: connecting nuclear function to dynamic chromatin structure. **Biochemistry and cell biology.** Ottawa, v. 89, n. 1, p. 24-34. Fev. 2011. DOI: 10.1139/O10-139.

SWELLAM, M.; MAGDOUB, H. M. E.; HASSAN, N. M.; HEFNY, M. M.; SOBEIH, M. E. Potential Diagnostic Role of Circulating MiRNAs in Breast Cancer: Implications on Clinicopathological Characters. **Clinical Biochemistry.** v. 56, p. 47-54. Jun. 2018. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.04.013.

TAIWO, O.; WILSON, G. A.; MORRIS, T.; SEISENBERGER, S.; REIK, W.; PEARCE, D.; BECK, S.; BUTCHER, L. M. Methylome analysis using MeDIP-seq with low DNA concentrations. **Nature Protocols**. London, v. 7, n. 4, p. 617-636. Mar. 2012. DOI: doi: 10.1038/nprot.2012.012.

TAKAHASHI, R.; MIYAZAKI, H.; OCHIYA, T. The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. **Cancers**. Basel, v. 7, n. 2, p. 598-616. Jun. 2015. DOI: 10.3390/cancers7020598.

TAKAHASHI, K.; YOKOTA, S.; TATSUMI, N.; FUKAMI, T.; YOKOI, T.; NAKAJIMA, M. Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. **Toxicology and Applied Pharmacology**. New York, v. 272, n. 1, p. 154-160. Oct. 2013. DOI: 10.1016/j.taap.2013.05.018.

TASLIM, C.; WENG, D. Y.; BRASKY, T. M.; DUMITRESCU, R. G.; HUANG, K.; KALLAKURY, B. V. S.; KRISHNAN, S.; LLANOS, A. A.; MARIAN, C.; MCELROY, J.; SCHNEIDER, S. S.; SPEAR, S. L.; TROESTER, M. A.; FREUDENHEIM, J. L.; GEYER, S.; SHIELDS, P. G. Discovery and replication of microRNAs for breast cancer risk using genome-wide profiling. **Oncotarget**. Albany, v. 7, n. 52, p. 86457-86468. Dec. 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.13241.

THÉRY, C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *Faculty of 1000 Biology Reports*. London, v. 3, p. 15. Jul. 2011. DOI: 10.3410/B3-15.

TRIHIA, H.; MURRAY, S.; PRICE, K.; GELBER, R. D.; GOLOUH, R.; GOLDBIRSCHE, A.; COATES, A. S.; COLLINS, J.; CASTIGLIONE-GERTSCH, M.; GUSTERSON, B. A. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker? **Cancer**. New York, n. 97, v. 5, p. 1321-1331. Mar. 2003.

TREVIÑO, L. S.; WANG, Q.; WALKER, C. L. Phosphorylation of Epigenetic "Readers, Writers and Erasers": Implications for Developmental Reprogramming and the Epigenetic Basis for Health and Disease. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**. Oxford, v. 118, n. 0, p. 8-13. Jul. 2015. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.013.

TÜFEKCI, K. U.; MEUWISSEN, R. L.; GENÇ, S. The role of microRNAs in biological processes. **Methods in Molecular Biology**. Clifton, v. 1107, p. 15-31. 2014. DOI: 10.1007/978-1-62703-748-8_2.

TURCHINOVICH, A.; TONEVITSKY, A. G.; BURWINKEL, B. Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms. **Trends in Biochemical Sciences**. Cambridge, v. 41, n. 19, p. 883-892. Oct. 2016. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.08.004.

VEECK, J.; ESTELLER, M. Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**. New York, v. 15, n. 1, p. 5-17. Mar. 2010. DOI: 10.1007/s10911-010-9165-1.

VERDONE, L.; AGRICOLA, E.; CASERTA, M.; DI MAURO, E. Histone Acetylation in Gene Regulation. **Briefings in functional genomics & proteomics**. London, v. 5, n. 3, p. 209-221. Set. 2006. DOI: 10.1093/bfgp/ell028.

WAGNER, E. J.; CARPENTER, P. B. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. **Nature reviews. Molecular cell biology**. London, v. 13, n. 2, p. 115-126. Jan. 2012. DOI: 10.1038/nrm3274.

WANG, P. Y.; GONG, H. T.; LI, B. F.; LV, C. L.; WANG, H. T.; ZHOU, H. H.; LI, X. X.; XIE, S. Y.; JIANG, B. F. Higher expression of circulating miR-182 as a novel biomarker for breast cancer. **Oncology Letters**. Athens, v. 6, n. 6, p. 1681-1686. Set. 2013. DOI: 10.3892/ol.2013.1593.

WANG, F.; HOU, J.; JIN, W.; LI, J.; YUE, Y.; JIN, H.; WANG, X. Increased Circulating MicroRNA-155 as a Potential Biomarker for Breast Cancer Screening: A Meta-Analysis. **Molecules**. Basel, v. 19, n. 5, p. 6282-6293. Mai. 2014. DOI: 10.3390/molecules19056282.

WANG, S. E.; LIN, R. J. MicroRNA and HER2-overexpressing Cancer. **MicroRNA**. Saif Zone, v. 2, n. 2, p. 137-147. Ago. 2013. DOI: 10.2174/22115366113029990011.

WANG, L.; ZHAO, Z.; OZARK, P. A.; FANTINI, D.; MARSHALL, S. A.; RENDLEMAN, E. J.; COZZOLINO, K. A.; LOUIS, N.; HE, X.; MORGAN, M. A.; TAKAHASHI, Y. H.; COLLINGS, C. K.; SMITH, E. R.; NTZIACHRISTOS, P.; SAVAS, J. N.; ZOU, L.; HASHIZUME, R.; MEEKS, J. J.; SHILATIFARD, A. Resetting the Epigenetic Balance of Polycomb and COMPASS Function at Enhancers for Cancer Therapy. **Nature Medicine**. New York, v. 24, n. 6, p. 758-769. Jun. 2018. DOI: 10.1038/s41591-018-0034-6.

WEBER, J. A.; BAXTER, D. H.; ZHANG, S.; HUANG, D. Y.; HUANG, K. W.; LEE, M. J.; GALAS, D. J.; WANG, K. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. **Clinical Chemistry**. Baltimore, v. 56, n. 11, p. 1733-1741. Set. 2010. DOI: 10.1373/clinchem.2010.147405.

WERNER, R. J.; KELLY, A. D.; ISSA, J. P. J. Epigenetics and Precision Oncology. **Cancer Journal**. Sudbury, v. 25, n. 5, p. 262-269. Set 2018. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000281.

WILCZEK, B.; WILCZEK, H. E.; RASOULIYAN, L.; LEIFLAND, K. Adding 3D Automated Breast Ultrasound to Mammography Screening in Women With Heterogeneously and Extremely Dense Breasts: Report From a Hospital-Based, High-Volume, Single-Center Breast Cancer Screening Program. **European journal of radiology**. Stuttgart, v. 85, n. 9, p. 1554-1563. Set. 2016. DOI: 10.1016/j.ejrad.2016.06.004.

WITTENBERGER, T; SLEIGH, S.; REISEL, D.; ZIKAN, M.; WAHL, B.; ALUNNI-FABBRONI, M.; JONES, A.; EVANS, I.; KOCH, J.; PAPROTKA, T.; LEMPIAINEN, H.; RUJAN, T.; RACK, B.; CIBULA, D.; WIDSCHWENDTER, M. DNA methylation markers for early detection of women's cancer: promise and challenges. **Epigenomics**. London, v. 6, n. 3, p. 311-327. Jun. 2014. DOI: 10.2217/epi.14.20.

WITWER, K. W.; BUZÁS, E. I.; BEMIS, L. T.; BORA, A.; LÄSSER, C.; LÖTVALL, J.; HOEN, E. N. N.; PIPER, M. G.; SIVARAMAN, S.; SKOG, J.; THÉRY, C.; WAUBEN, M. H.; HOCHBERG, F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of Extracellular Vesicles**. Järfälla, v. 2. Mai. 2013. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20360.

WITWER, K. W. XenomiRs and miRNA homeostasis in health and disease. **RNA Biology**. Georgetown, v. 9, n. 9, p. 1147-1154. Set. 2012. DOI: 10.4161/rna.21619.

WITWER, K. W. Circulating microRNA Biomarker Studies: Pitfalls and Potential Solutions. *Clinical chemistry*. Baltimore, v. 61, n. 1, p. 56-63. Jan. 2015. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221341.

WRECZYCKA, K.; GOSDSCHAN, A.; YUSUF, D.; GRÜNING, B.; ASSENOV, Y.; AKALIN, A. Strategies for analyzing bisulfite sequencing data. **Journal of Biotechnology**. Amsterdam, v. 261, p. 105-115. Nov. 2017. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.08.007.

XU, J.; SHETTY, P. B.; FENG, W.; CHENAULT, C.; BAST, R. C.; ISSA, J. P. J.; HILSENBECK, S. G.; YU, Y. Methylation of HIN-1, RASSF1A, RIL and CDH13 in breast cancer is associated with clinical characteristics, but only RASSF1A methylation is associated with outcome. **BioMed Central Cancer**. London, v. 12, n. 243. Jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-243>.

YEH, H. Y.; CHENG, S. W.; LIN, Y. C.; YEH, C. Y.; LIN, S. F.; SOO, V. W. Identifying significant genetic regulatory networks in the prostate cancer from microarray data based on transcription factor analysis and conditional independency. **BioMed Central Medical Genomics**. London, v. 2, n. 70, p. 1-19. Dez. 2009. DOI: 10.1186/1755-8794-2-70.

YONG, W. S.; HSU, F. M.; CHEN, P. Y. Profiling genome-wide DNA methylation. **Epigenetics & chromatin**. London, v. 9, n. 26. Jun. 2016. DOI: 10.1186/s13072-016-0075-3.

ZHAI, L. Y.; LI, M. X.; PAN, W. L.; CHEN, Y.; LI, M. M.; PANG, J. X.; ZHENG, L.; CHEN, J. X.; DUAN, W. J. In Situ Detection of Plasma Exosomal MicroRNA-1246 for Breast Cancer Diagnostics by a Au Nanoflare Probe. **American Chemical Society applied materials & interfaces**. Washington, v. 10, n. 46, p. 39478-39486. Nov. 2018. DOI: 10.1021/acsami.8b12725.

ZHANG, J.; JIANG, C.; SHI, H.; LIN, H.; PENG, Y.; Diagnostic value of circulating miR-155, miR-21, and miR-10b as promising biomarkers in human breast cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. Madison, v. 9, n. 10, p. 10258-10265. Out. 2016.

ZHAO, Q. Y.; LEI, P. J.; ZHANG, X.; ZHENG, J. Y.; WANG, H. Y.; ZHAO, J.; LI, Y. M.; YE, M.; LI, L.; WEI, G.; WU, M. Global histone modification profiling reveals the epigenomic dynamics during malignant transformation in a four-stage breast cancer model. **Clinical Epigenetics**. Berlin, v. 8, n. 34, p. 1-15. Mar. 2016. DOI: 10.1186/s13148-016-0201-x.

ZHAO, H.; SHEN, J.; MEDICO, L.; WANG, D.; AMBROSONE, C. B.; LIU, S. A Pilot Study of Circulating miRNAs as Potential Biomarkers of Early Stage Breast Cancer. **Public Library of Science**. San Francisco, v. 5, n. 10, p. e13735. Out. 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0013735.

ZHAO, Z.; SHILATIFARD, A. Epigenetic modifications of histones in cancer. **Genome Biology**. London, v. 20, p. 245. Nov. 2019. DOI: 10.1186/s13059-019-1870-5.

ZHU, W.; QIN, W.; ATASOY, U.; SAUTER, E. R. Circulating microRNAs in Breast Cancer and Healthy Subjects. **Biomed Central Research Notes**. London, v. 2, p. 89. Mai. 2009. DOI: 10.1186/1756-0500-2-89.

ZHU, J.; ZHENG, Z.; WANG, J.; SUN, J.; WANG, P.; CHNG, X.; FU, L.; ZHANG, L.; WANG, Z.; LI, Z. Different miRNA Expression Profiles Between Human Breast Cancer Tumors and Serum. **Frontiers in Genetics**. Lausanne, v. 5, p. 149. Mai. 2014. DOI: 10.3389/fgene.2014.00149.

ZUBOR, P.; KUBATKA, P.; DANKOVA, Z.; GONDOVA, A.; KAJO, K.; HATOK, J.; SAMEC, M.; JAGELKOVA, M.; KRIVUS, S.; HOLUBEKOVA, V.; BUJNAK, J.; LAUCEKOVA, Z.; ZELINOVA, K.; STASTNY, I.; NACHAJOVA, M.; DANKO, J.; GOLUBNITSCHAJA, O. MiRNA in a Multiomic Context for Diagnosis, Treatment Monitoring and Personalized Management of Metastatic Breast Cancer. **Future Oncology**. London, v. 14, n. 18, p. 1847-1867. Ago. 2018. DOI: 10.2217/fo-2018-0061.

ZUBOR, P.; KUBATKA, P.; KAJO, K.; DANKOVA, Z.; POLACEK, H.; BIELIK, T.; KUDELA, E.; SAMEC, M.; LISKOVA, A.; VLCAKOVA, D.; KULKOVKSA, T.; STASTNY, I.; HOLUBEKOVA, V.; BUJNAK, J.; LAUCEKOVA, Z.; BÜSSELBERG, D.; ADAMEK, M.; KUHN, W.; DANKO, J.; GOLUBNITSCHAJA, O. Why the Gold Standard Approach by Mammography Demands Extension by Multiomics? Application of Liquid Biopsy miRNA Profiles to Breast Cancer Disease Management. **International Journal of Molecular Sciences**. Basel, v. 20, n. 12, p. 2878. Jun. 2019. DOI: 10.3390/ijms20122878.