

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA E RELAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA NO CÂNCER DE MAMA

ANALYSIS OF THE INFLUENCE AND RELATIONSHIP OF DNA METHYLATION ON BREAST CANCER

Samuel Felipe Atuati¹; Vanessa Backes Nascimento Diehl²; Vera Regina Medeiros Andrade²; Ivy Reichert Vital da Silva Gressler²; Tiago Bittencourt de Oliveira².

1. Acadêmico do curso de farmácia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). RS, Brasil.
2. Docente da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). RS, Brasil.

***Autor correspondente:** atuatis@gmail.com

RESUMO

Objetivo: Analisar a influência e relação da metilação do DNA no câncer de mama.

Método: Foram efetuadas buscas nas bases de dados *PubMed* e *ScienceDirect* e selecionados artigos entre os anos de 2012 e 2021.

Resultados: Foram encontrados 3880 artigos, após a aplicação dos filtros, esse número foi delimitado para 81 resultados. Para estes, foram realizadas as leituras dos títulos e dos resumos, sendo excluídos aqueles que não se encaixavam ao tema definido. Dos 53 artigos restantes foram selecionados 27 para inclusão final. Os perfis epigenéticos encontrados foram de hipermetilação em genes específicos; metilação em DNA circulante livre de célula; influência de atividade física; de nutrição e compostos naturais; e no tratamento medicamentoso.

Conclusão: Foi apresentado variadas formas da aplicação da metilação do DNA no câncer de mama, por meio dos quais pode ser possível a aplicação de diagnóstico precoce, definição de prognóstico, intervenções e formas de tratamento.

Palavras-chave: Epigenética. Metilação de DNA. Ilhas de CpG. Neoplasia de mama.

ABSTRACT

Objective: To analyze the influence and relationship of DNA methylation in breast cancer.

Method: Searches were carried out in *PubMed* and *ScienceDirect* databases and articles between the years 2012 and 2021 were selected.

Results: 3880 articles were found, after applying the filters, this number was delimited to 81 results. For these, titles and abstracts were read, excluding those that did not fit the defined theme. Of the 53 remaining articles, 27 were selected for final inclusion. The epigenetic profiles found were hypermethylation in specific genes; methylation in cell-free circulating DNA; influence of physical activity; of nutrition and natural compounds; and in drug treatment.

Conclusion: Various ways of applying DNA methylation in breast cancer were presented, through which it may be possible to apply early diagnosis, definition of prognosis, interventions and forms of treatment.

Keywords: Epigenetics. DNA methylation. CpG islands. Breast neoplasms.

INTRODUÇÃO

O termo epigenética significa “acima da genética”, e trata-se de uma área que aborda as alterações nas funções moleculares, principalmente aquelas adquiridas ao longo da vida. Esses eventos não estão sob o jugo da genética clássica, pois envolvem processos de alteração do DNA sem a ocorrência de mutações nucleotídicas, além de serem reversíveis e herdados mitoticamente¹⁻⁴.

Um dos principais eventos epigenéticos é a metilação do DNA, processo que ocasiona o silenciamento dos genes^{5,6}. O seu mecanismo ocorre pela ação da enzima DNA metiltransferase (DNMT), que realiza uma ligação covalente adicionando um grupamento metil no carbono 5 de citosinas precedidas por guaninas na região promotora, sendo conhecidos como dinucleotídeos CpG, cujo conjunto denomina-se ilhas CpG^{1,5,7}.

Essas alterações nos genes são capazes de mudar a função celular, ocorrendo frequentemente a hipermetilação em genes supressores de tumor, cujo papel é impedir alterações morfológicas e proliferações exacerbadas das células, ou a hipometilação generalizada em oncogenes, cuja modificação pode influenciar a proliferação desregulada^{1,3-5,8}.

O câncer de mama não é apenas um dos tipos mais comuns, mas também um dos que apresenta maior taxa de mortalidade, sendo o mais significativo nesse sentido para o sexo feminino^{2,9}. Há uma variedade de classificações, que predizem seu aspecto clínico, evolução da doença, prognóstico e tratamento, as quais se dividem em local de origem, principalmente entre ductal *in situ* e invasivo, e lobular *in situ* e invasivo, e também pela classificação molecular, que corresponde a luminal A e B, HER2 positivo e triplo negativo^{2,4,9}. Essas alterações também se estendem para os padrões distintos nos perfis de metilação do DNA, que podem ser observados precocemente no desenvolvimento do câncer, ou até mesmo ser usado em pospostas de tratamento ou definição de prognóstico¹. Neste sentido, o presente trabalho de revisão tem por objetivo analisar a influência e relação da metilação do DNA no câncer de mama.

MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de uma revisão integrativa e retrospectiva da literatura sobre a influência e relação da metilação do DNA com o câncer de mama.

Para a seleção dos artigos foram consultadas as bases de dados *PubMed* (NCBI) e *ScienceDirect* (Elsevier). Foram utilizados os descritores “*breast neoplasm*” e “*DNA methylation*”. Neste

trabalho, foram incluídos artigos originais com texto completo e gratuito, publicados em inglês ou português, entre os anos de 2012 e 2021, cujo assunto principal envolveu estudos experimentais em humanos sobre processos de metilação do DNA relacionados ao câncer de mama.

O presente estudo encontrou 3880 estudos de metilação de DNA publicados

nos últimos 10 anos, e após a aplicação dos filtros, esse número foi refinado para 81 resultados. Para estes, foram realizadas as leituras dos títulos, sendo excluídos aqueles que não se encaixavam ao tema definido, e dos 53 artigos restantes foram selecionados 27 para inclusão final após leitura do resumo, conforme Figura 1.

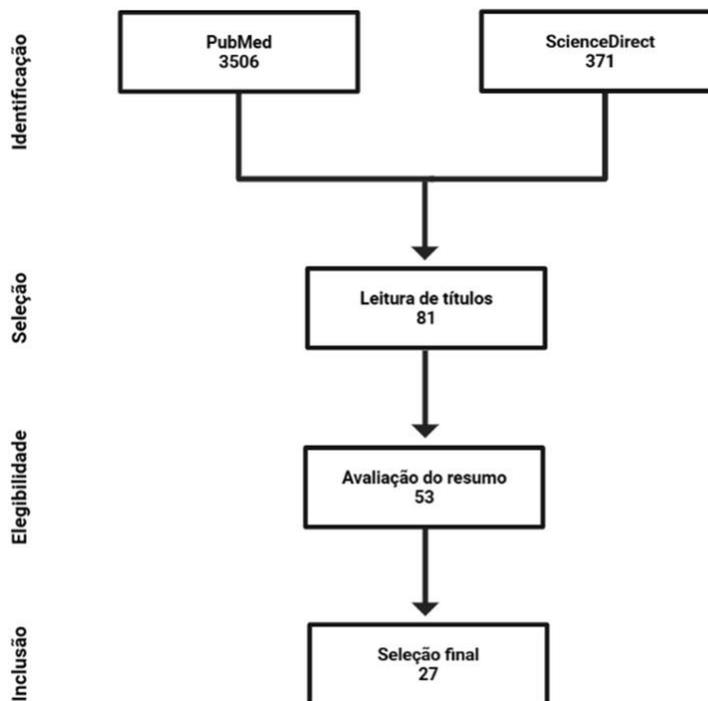


Figura 1: Fluxograma da seleção dos artigos

Grande parte dos estudos (66,6%) era de caso e controle e 14,9% de outros métodos, ambos utilizando pacientes acometidos com o câncer de mama, principalmente aqueles que pesquisavam relação da hipermetilação ou administração de medicamentos quimioterápicos. Porém, também foram

encontrados estudos com esse delineamento (11,1%) em que a amostra da pesquisa era composta exclusivamente de indivíduos saudáveis, como aqueles que avaliaram a influência da atividade física na metilação do DNA. Outros trabalhos (7,4%) debruçaram-se sobre perfis em pacientes sobreviventes do câncer.

O método mais utilizado, e considerado o padrão-ouro para analisar a metilação das amostras de DNA é o tratamento com bissulfito de sódio, que consiste em converter as bases de citosina (C) não metiladas em uracila (U), preservando as citosinas metiladas, geralmente CpGs, e possibilitando a distinção entre DNA metilado e não metilado. Na sequência, é realizada a amplificação das amostras por reação da cadeia de polimerase (PCR)^{1,3}.

Os estudos selecionados ocorreram em mais de 20 países, sendo que aqueles que analisavam hipermetilação de genes específicos possuíam maior variedade de locais. A maioria (44,4%) das pesquisas foram realizadas nos Estados Unidos da América, com o restante se estendendo por outros países.

Nos estudos revisados foram analisados mais de 100 genes de maneira isolada, embora alguns grupos de pesquisa utilizaram marcadores pré-estabelecidos, como LINE-1, LUMA, Sat2 e protocolos, como o *Illumina*. Cerca de 64% dos estudos apresentaram resultados estatísticos para metilação com p menor que 0,05. Os trabalhos apresentaram diferentes perfis quanto aos pacientes acometidos com câncer de mama, com 40,7% estudando pacientes com carcinoma ductal invasivo, baseado no local de origem da neoplasia, e com

18,2% possuindo características luminais, baseadas no tipo molecular do câncer.

Durante a leitura dos artigos, foi observada a similaridade entre temáticas abordadas entre alguns estudos. Portanto, foi decidido subdividir os resultados levando em consideração a área de pesquisa abordada para contemplar a metilação do DNA no câncer de mama, surgindo assim os tópicos “Hipermetilação em genes específicos”, “Análise de metilação em DNA circulante livre de célula”, “Influência dos hábitos de vida” e “Influência no tratamento quimioterápico”.

RESULTADOS

HIPERMETILAÇÃO EM GENES ESPECÍFICOS

A metilação do DNA é amplamente relatada tanto em tumores precoces, quanto nos avançados. Essa ocorre na região promotora, em CpGs, e em regiões intergênicas, estando associada com genes supressores de tumor hipermetilados e oncogenes hipometilados⁶.

Dos 27 artigos selecionados, 12 se tratavam de pesquisas sobre a hipermetilação em genes associados ao câncer de mama, apresentados na Tabela 1. A maioria dos estudos era de caso e controle, com diferenças para avaliação de efeito da metilação sobre o

comportamento de genes específicos e níveis de metilação para marcadores de câncer de mama. Para a realização da análise epigenética foram realizados os processos de extração de ácidos

nucleicos de tecidos tumorais de mama e tecidos saudáveis, seguido pela marcação das metilações, principalmente por bissulfato de sódio, e amplificação das amostras em regiões definidas.

Quadro 1: Descrição dos estudos sobre hipermetilação em genes específicos.

Autor, ano e local	Objetivos	Método	Amostra	Resultados
Wielscher et al., 2013 ¹⁰ (Áustria)	Analisar forma hidroximetilada no gene <i>LSZT1</i>	Triagem em DNA para forma hidroximetilada da citosina (5hmc) pela reação de PCR quantitativa (qPCR)	75 amostras de tecido mamário com câncer e 12 de pacientes saudáveis	Pela diminuição da Enzima de Translocação (TET) e consequentemente de 5hmc, foi observada hipermetilação do gene ($p < 0,0001$)
Hsu et al., 2012 ¹¹ (Taiwan)	Testar se as enzimas TET1 influenciam no processo de supressão da hipermetilação do DNA	Análise dos níveis de mRNA de TET1, sendo submetidos à PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	140 amostras tanto de câncer de mama humano, quanto de controles saudáveis	68% dos tecidos possuíam níveis mais baixos da enzima, principalmente os com tumores maiores, atestando a influência na hipermetilação em genes <i>TIMP2</i> e <i>TIMP3</i>
Ali et al., 2012 ¹² (Paquistão)	Analisar o perfil de metilação em CpG do gene <i>E2F5</i>	Tratamento do DNA com bissulfato de sódio e amplificação por PCR de metilação específica (MSPCR)	50 amostras, sendo metade de tecido com câncer de mama e a outra metade de controles saudáveis	Observaram hipermetilação no gene em relação aos controles ($p < 0,0001$)
Gào et al., 2019 ¹³ (Alemanha)	Encontrar metilação em ilhas CpG de determinados tipos de câncer	Protocolo <i>Illumina</i> , análise com <i>microarrays</i> em 96% das ilhas CpG	DNA de amostra sanguínea de 128 pacientes com câncer de mama e 176 controles	Para o câncer de mama foi encontrada hipermetilação no gene <i>MTOR</i>
Diakite et al., 2012 ¹⁴ (Marrocos)	Pesquisar a relação do polimorfismo da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) com risco de câncer de mama	Extração do DNA e amplificação por PCR	Amostras de sangue de 96 pacientes com câncer de mama e 117 controles	Foi evidenciada relação do polimorfismo da enzima em genes associados com receptores de progesterona ($p < 0,0001$)
Goeman et al., 2020 ¹⁵ (Brasil)	Observar se alterações na produção da enzima DIO3 provocam relação com de câncer de mama	Ensaios imunohistoquímicos em tecidos tumorais e saudáveis fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) e metilação em CpG do gene <i>DIO3</i>	Tecidos de mama neoplásicos de 44 pacientes e 5 amostras de tecido saudável	Constataram hipermetilação nos CpGs ($p < 0,0001$), que está associado a menor sobrevivência dos pacientes

Mirzaei et al., 2012 ¹⁶ (Irã)	Verificar se o gene <i>DBC2</i> está hipermetilado no câncer de mama	Tratamento do DNA com bissulfito de sódio e amplificação por MSPCR	50 amostras de tecido mamário neoplásico e 5 amostras de tecido e 30 de sangues sadios	34% das amostras possuíam bandas completamente metiladas ($p < 0,007$)
Syed et al., 2012 ¹⁷ (Índia)	Analisar o envolvimento do gene <i>CAV-1</i> na carcinogênese de mama	Tratamento do DNA com bissulfito de sódio e amplificação por PCR	Amostras de sangue e/ou tecido de 130 pacientes com câncer de mama	21,5% das amostras apresentaram hipermetilação
Ng et al., 2014 ¹⁸ (Hong Kong)	Verificar se a expressão desregulada dos genes <i>KILLIN</i> e <i>PTEN</i> está associada com certos tipos de câncer	Extração de DNA e RNA, e amplificação por qPCR e RT-qPCR, respectivamente	Amostras de sangue de 16 pacientes com câncer de mama e tireoide, de 4 pacientes apenas com câncer de mama, e de 20 controles saudáveis	A expressão de <i>KILLIN</i> foi diminuída ($p < 0,0001$), atestando níveis relevantes de hipermetilação no câncer
Moarii et al., 2014 ¹⁹ (França)	Analisar perfis de metilação em câncer de mama para elucidar processos da carcinogênese	Protocolo <i>Illumina</i> , análise com <i>microarrays</i> em 96% das ilhas CpG	48 amostras de tecido neoplásico de mama e 22 amostras de controles saudáveis	Foram encontradas 49 sondas metiladas em genes associados à morte celular, tumorigênese e diferenciação celular (valores de p variaram entre 0,013 e 0,046)
Marzese et al., 2012 ²⁰ (Argentina)	Avaliar um perfil semelhante de genes em tumores ductais invasivos (IDC) e lobulares invasivos (ILC)	Isolamento de DNA e amplificação de sonda dependente de ligação multiplex específica de metilação (MS-MLPA)	98 amostras de tecido tumoral de 70 pacientes com IDC, 16 com ILC e 12 com perfil misto. Como controle, foram utilizadas 6 amostras de tecidos saudáveis	Os genes <i>WT1</i> e <i>RASSF1</i> estavam frequentemente hipermetilados, assim como <i>CDH13</i> , <i>RARB</i> e <i>TP73</i> estavam associados à proliferação tumoral. Os dois últimos genes também estão relacionados com prognóstico desfavorável ($p < 0,001$)
Becker et al., 2020 ²¹ (EUA)	Observar relação de mecanismos de progressão de câncer com fibroblastos associados a tumor	Tratamento do DNA com bissulfito de sódio e amplificação por PCR em tempo real (RT-PCR)	Tecido de 172 pacientes com câncer de mama e 327 de indivíduos saudáveis	Esses fibroblastos estão diretamente associados com hipermetilação

ANÁLISE DE METILAÇÃO EM DNA CIRCULANTE LIVRE DE CÉLULA

A biópsia líquida em sangue ou fluidos é um método minimamente invasivo para procura de biomarcadores, os quais podem ser detectados por meio de DNA

circulante livre de células (ccfDNA), e que geralmente podem apresentar indícios de diagnóstico e prognóstico de câncer²².

O ccfDNA associado às metástases, ocorre por meio de processos de apoptose e necrose no tecido tumoral^{22,23}. Neste sentido, três estudos

avaliaram o DNA circulante associado com o carcinoma de mama, conforme a

Tabela 2.

Tabela 2: Descrição dos estudos sobre DNA circulante livre de célula.

Autor, ano e local	Objetivos	Método	Amostra	Resultados
Smolkova et al., 2016 ²⁴ (Eslováquia)	Detectar ccfDNA em metástases e relacionar com a expressão de proteínas no câncer de mama	Amplificação de RNA por RT-qPCR e análise imuno-histoquímica em tecido FFPE	Foi coletado sangue periférico e tecido de 203 pacientes com câncer de mama, junto de 11 amostras de tecido e 60 coletas de sangue de pacientes saudáveis para o controle	Hipermetilação em <i>CXCL12</i> , e hipometilação em <i>SOCS1</i> , demonstrando maior correlação para presença de células tumorais circulantes ($p=0,035$ e $p=0,002$, respectivamente)
Salta et al., 2018 ²⁵ (Portugal)	Detectar metilação em genes de ccfDNA de genes específicos no câncer de mama	Análise imuno-histoquímica em tecido FFPE e em ccfDNA, tratado com bissulfato de sódio e amplificado por PCR específica de metilação quantitativa (qMSPCR)	Tecido normal e neoplásico de mama de 137 pacientes da primeira coorte, e amostras de sangue de 44 pacientes e 39 controles da segunda coorte	Os genes <i>APC</i> , <i>FOXA1</i> , <i>RASSF1A</i> apresentaram níveis de hipermetilação mais relevantes nas amostras ($p = 0,008$; $p < 0,001$ e $p = 0,017$, respectivamente)
Widschwendter et al., 2019 ²⁶ (Inglaterra, Alemanha e Tchêquia)	Analisar perfis de metilação em ccfDNA de CpGs antes e depois de quimioterapia, e que podem indicar disseminação do câncer de mama	Extração de DNA de tecidos tumorais e soro, e tratamento com bissulfato de sódio e amplificação por PCR	Primeira coorte, amostras de soro de 419 casos e 31 amostras de tecido tumoral. Segunda coorte, soro de 925 casos. Como controle foram usadas amostras de soro de 525 pacientes saudáveis	Todas as 5 regiões CpG encontravam-se hipermetiladas, evidenciando indícios de prognóstico ruim

INFLUÊNCIA DOS HÁBITOS DE VIDA

É amplamente conhecida a relação benéfica entre atividade física e prevenção de doenças, sendo que a metilação do DNA é um dos mecanismos que pode explicar essa influência²⁷. Por meio dessa relação, são propostas estratégias baseadas na aplicação de exercícios físicos direcionados à

prevenção de câncer de mama ou melhora na qualidade de vida de indivíduos sobreviventes da doença. Junto disso, há estudos que demonstram que compostos naturais, incluídos na dieta saudável e regulada, influenciam positivamente nos processos de prevenção do câncer por meio da ação da metilação no DNA^{7,28}.

Diante disto, sete estudos avaliaram possíveis benefícios de mudanças de hábitos de vida na metilação do DNA,

que incluem atividade física, ingestão de compostos naturais e dieta saudável, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Descrição dos estudos sobre influência dos hábitos de vida.

Autor, ano e local	Objetivos	Método	Amostra	Resultados
Bryan et al., 2013 ²⁹ (EUA)	Aplicar intervenção de exercício físico durante um ano e avaliar os níveis de metilação para prevenção do câncer de mama	Extração do DNA e amplificação por protocolo <i>Illumina</i> . Os genes relacionados ao câncer de mama foram analisados quanto a metilação dos seus promotores antes e depois do período de intervenção	Foram coletados 5 mL de saliva de 238 pacientes saudáveis, 115 para controle e 123 para intervenção, e para os quais foram analisadas 64 amostras quanto a metilação do DNA	Foi demonstrado que níveis mais altos de atividade física predispõe à níveis mais baixos de metilação do DNA
Boyne et al., 2018 ³⁰ (Canadá)	Analisar a metilação influenciada pelo exercício físico em mulheres saudáveis pós menopausa nos genes <i>APC</i> , <i>BRCA1</i> , <i>RASSF1</i> e <i>hTERT</i> , e regiões não gênicas LINE-1	Extração de DNA e tratamento com bissulfito de sódio para analisar a metilação de genes de interesse para câncer de mama por marcador LINE-1	Duas amostras de sangue de 320 pacientes saudáveis divididos pela metade em intervenção e controle, sendo que ao final do período de intervenção restaram 573 amostras	Foi evidenciada pouca relação positiva de atividade física e prevenção de câncer de mama com os biomarcadores escolhidos
Delgado-Cruzata et al., 2014 ³¹ (EUA)	Avaliar a influência de estilo de vida (atividade física e dieta) em pacientes sobreviventes do câncer de mama por meio de marcadores epigenéticos	Extração de DNA, tratamento com bissulfito de sódio e amplificação por PCR, para analisar regiões gênicas pelos marcadores LINE-1, LUMA e Sat2	Foram utilizadas três amostras de sangue de 24 pacientes sobreviventes de câncer de mama, com coletas no início, meio e fim das intervenções no período de um ano	Houve aumento na metilação de LINE-1 que pode sugerir relação entre os hábitos de vida saudáveis e os biomarcadores de metilação do DNA
Greenlee et al., 2016 ³² (EUA)	Realizar uma intervenção de dieta saudável e relacionar com parâmetros de hipometilação do DNA com câncer de mama	Educação alimentar e acompanhamento da adoção da dieta por 12 semanas, com análise de metilação em LINE-1	70 mulheres sobreviventes de câncer de mama, 34 para teste e 36 para controle. Foram utilizadas amostras de sangue coletadas 6 e 12 meses após o início da intervenção	Aos 6 meses, foi apresentada alteração não significativa no aumento da metilação global do DNA ($p = 0,056$), com resultado similar aos 12 meses ($p = 0,06$), porém, foi observada maior tendência para este aumento na intervenção em relação aos controles

<p>Mirza et al., 2013³³ (Índia)</p>	<p>Analisar se os compostos naturais epigallocatequina galato, genisteína, withaferin A, curcumina, resveratrol e gugalsterona podem influenciar na ação de genes e DNMTs</p>	<p>O DNA foi isolado, tratado com bissulfito de sódio e amplificado em PCR para análise de genes, e as DNMTs foram submetidas a RT-PCR e hibridização por Western blot. Para analisar as interferências dos compostos naturais, estes foram aplicados em células cancerígenas de linhagem específica</p>	<p>40 amostras de tecido neoplásico de mama e 10 amostras de tecido saudável para controle. Para os compostos naturais foram utilizadas células cancerígenas das linhagens MCF-7 e MDA MB 231</p>	<p>Foram encontrados níveis elevados de DNMTs ($p < 0,001$) em pacientes com câncer, e houve redução das DNMTs nas linhagens tratadas com compostos naturais além de redução da metilação nos genes elencados que receberam os mesmos tratamentos</p>
<p>Zhu et al., 2012³⁴ (EUA)</p>	<p>Avaliar de o trans-resveratrol possui ação preventiva do câncer de mama pela metilação do DNA</p>	<p>Administração duplo-cego e randomizada de placebo, e baixas e altas doses de trans-resveratrol, para 9, 12 e 9 pacientes, respectivamente. Extração de DNA para análise de genes, tratamento em bissulfito de sódio e amplificação em qMSPCR</p>	<p>Amostras de fluido e de soro de pacientes com câncer de mama, em 4 e 12 semanas após início da administração</p>	<p>Foi provocada desmetilação mais significativa em <i>RASSF1A</i> ($p = 0,047$), relacionada com alteração em prostaglandina E2 ($p = 0,045$)</p>
<p>Coussemant et al., 2018³⁵ (Bélgica e Holanda)</p>	<p>Averiguar se isoflavonas no leite de soja pode influenciar na saúde do tecido mamário e consecutivamente, na prevenção do câncer de mama</p>	<p>Administração de leite de soja 5 dias antes da redução estética da mama, e metilação do DNA analisada em LINE-1</p>	<p>20 pacientes saudáveis divididas pela metade entre caso e controle, coletando amostras de urina, soro e tecido</p>	<p>Não foi observada eficácia significativa para prevenção do câncer de mama por esse método</p>

INFLUÊNCIA NO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

A escolha terapêutica para tratamento quimioterápico de câncer de mama exige ter conhecimento sobre os medicamentos, a progressão da doença, e dos diferentes subtipos determinados pelo local de origem da neoplasia (ductal *in situ* e invasivo, e lobular *in situ* e invasivo), ou pela característica

molecular (luminal A e B, HER2 positivo e triplo negativo)³⁶. Nesses processos a metilação de DNA pode ser empregada como uma alternativa de tratamento, bem como um fator para acompanhamento e definição de prognóstico³⁶. Com a terapia epigenética demonstrando ser emergente para o manejo de neoplasias, cinco estudos avaliaram sua aplicação na quimioterapia contra o câncer de mama, como observado na Tabela 4

Tabela 4: Descrição dos estudos sobre influência no tratamento quimioterápico

Autor, ano e local	Objetivos	Método	Amostra	Resultados
Li et al., 2014 ³⁷ (EUA)	Avaliar o resultado do tratamento do inibidor de DNMTs, 5-Azacitidina (AZA)	Administração de AZA em pacientes com câncer de mama e análise de sua ação pré e após 8 semanas de tratamento	Amostras de RNA foram coletadas de 138 pacientes e replicadas em RT-qPCR	Doses baixas do medicamento demonstraram boa especificidade e minimizam efeitos de metilação indesejáveis nos pacientes.
Connolly et al., 2018 ³⁸ (EUA)	Analisar influência de metilação do DNA com resposta patológica completa (pCR) em tratamento quimioterápico com Vorinostat	Administração de quimioterápicos com Vorinostat ou placebo de forma randomizada. Análise de DNA tratado com bissulfito de sódio e submetido a qMSPCR	Amostras de sangue no início e 15 dias após o tratamento, e amostras de tecido FFPE de 62 pacientes, divididos pela metade em casos e placebo	Foi obtido pCR de 27%. O uso do medicamento demonstrou níveis menores de metilação para os casos em relação ao placebo ($p < 0,0001$)
Hsu et al., 2020 ³⁹ (EUA)	Determinar a eficácia de quimioterapia neoadjuvante para câncer em estágio avançado por meio de análise em metilação do DNA	DNA foi isolado, tratado com bissulfito de sódio e amplificado	Coletaram 37 amostras de sangue de mulheres com doença em estágio avançado e prognóstico desfavorável	10 ilhas CpG tiveram seus padrões de metilação alterados (p entre 0,002 e 0,033)
Sharma et al., 2017 ⁴⁰ (EUA)	Analisar níveis de metilação em <i>BRCA1</i> para determinar a sensibilidade de tratamento à base de Doxorubicina e Ciclofosfamida	DNA e RNA sequenciados, tratados com bissulfito de sódio e amplificado por MSPCR	Amostras de tecido FFPE de 425 pacientes com câncer de mama triplo negativo (TNBC)	Metilação em <i>BRCA1</i> foi detectada em 32% dos casos ($p < 0,0001$). E os maiores níveis de metilação estão associados com menor sobrevida dos pacientes
Eikesdal et al., 2021 ⁴¹ (Noruega)	Verificar se o tratamento com Olaparib possui eficácia em estágio inicial de TNBC	Administração de Olaparib durante 10 semanas, com análise de DNA amplificado por PCR	Amostras de tecido tumoral de 32 pacientes após o tratamento	Dentre 8 respondedores sem mutação de recombinação homóloga, 6 apresentaram hipermetilação em <i>BRCA1</i> ($p = 0,03$), e dentre os que continham a mutação, 16 de 18 apresentaram a metilação ($p = 0,0008$).

DISCUSSÃO

A ação das enzimas DNMTs é uma das principais formas de ocorrência da hipermetilação nos dinucleotídeos de CpG. Sua detecção pode servir como biomarcador no diagnóstico precoce do câncer de mama^{4-6,42}. Wielscher et al.¹⁰ e Hsu et al.¹¹ concluíram que a diminuição

da enzima TET também propicia processos de hipermetilação, provavelmente associado com o aumento dos níveis da enzima DNMT. Quando a atividade das DNMTs está exacerbada, é evidenciada a hipermetilação, já quando o mesmo ocorre para as enzimas TET, é promovida a desmetilação, evento que

resulta na hidroximetilação^{1,43}. Portanto, em genes supressores de tumor no estado hipermetilado, há predisposição para o desenvolvimento de câncer, sendo adequado possuir perfis com atividade moderada de DNMTs e de TETs, como também apontam estudos de Flausino⁵ e Li et al.⁴³.

Diakite et al.¹⁴, Goemman et al.¹⁵ e Becker et al.²¹ associaram outros fatores relacionados, que também podem induzir determinada influência na metilação, porém, de forma mais indireta. Diakite et al.¹⁴ analisaram a relação da enzima MTHFR, cujos polimorfismos associam-se à diversas doenças como relatado por Long & Goldblatt⁴⁴, dentre elas o câncer de mama, por intermédio dos receptores de progesterona. Goemman et al.¹⁵ também evidenciaram esta relação com hormônios tireoidianos, dada pela sua implicação nos receptores hormonais do câncer, em concordância com Voutsadakis⁴⁵. Becker et al.²¹ destacaram que até mesmo certos tipos celulares, como os fibroblastos, estão ativamente envolvidos com a hipermetilação, sendo relatado no desenvolvimento tumoral, ao servir de fonte para fatores de crescimento tumorais, como destacam Buchsbaum & Oh⁴⁶.

Alguns estudos encontraram hipermetilação em um ou mais genes isoladamente. Ali et al.¹² em *E2F5*, Gào

et al.¹³ com *MTOR*, Mirzaei et al.¹⁶ em *DBC2*, Syeed et al.¹⁷ em *CAV-1*, Ng et al.¹⁸ em *KILLIN* e Marzese et al.²⁰ na análise de *WT1*, *RASSF1*, *CDH13*, *RARB*, *TP73*. É importante destacar que os processos de metilação não estão relacionados com a mutação do DNA, muito embora não seja necessário que um processo seja cessado para que o outro ocorra, e muitos dos eventos de metilação de DNA não prevalecem de forma incontestável^{1,42}. Dessa forma há eventos que predispõem mais o processo de carcinogênese de mama em certos pacientes do que em outros, também demonstrado por Santos² e Castralli & Bayer⁴². Em conjunto a isso, como apontam Oliveira et al.¹ e Rauluseviciute et al.⁶, é mais nítida a percepção de predisposição em genes supressores tumorais à hipermetilação de sua região promotora. Por isso é mais comum encontra-los silenciados em câncer já estabelecido, se comparado à sua gênese. Mais estudos devem correlacionar estes processos e encontrar padrões, podendo estabelecer painéis de genes a serem explorados como biomarcadores definitivos. Possibilitando assim, o almejado diagnóstico de câncer precoce através da detecção da hipermetilação, como também aponta Araújo².

A metilação do DNA também pode ser usada para evidenciar eventos como a disseminação de metástases no câncer de mama, ou até mesmo, definição de prognósticos pela detecção em ccfDNA^{22,47}. Smolkova et al.²⁴, Salta et al.²⁵ e Widschwendter et al.²⁶ realizaram suas análises em ccfDNA no sangue periférico, comparando as alterações encontradas em tecido mamário neoplásico para atestar a relação entre o tumor primário e as metástases. Uma vez que a detecção precoce de metástases é determinante para o manejo adequado de câncer em progresso. Essa constatação pode providenciar a escolha adequada do tratamento necessário para evitar a piora do quadro do paciente, pois seus altos níveis se relacionam com o estágio avançado da doença e com prognóstico ruim, logo as detecções do processo em seu início são fundamentais para evitar essas situações, como também apontado por Szilágyi et al.²² e Christensen et al.²³.

Com a associação da metilação em ccfDNA e o tumor primário, é possível providenciar um melhor manuseio dos quadros invasivos ou metastáticos, pois também apresenta outras vantagens, como a presença frequente de genes tumorais e a ampla gama de CpGs, pois se apresenta em várias regiões genômicas, afirmações também

sustentadas por Li et al.⁴³ e Luo et al.⁴⁸. A detecção desses padrões permite avaliar os aspectos mais relevantes do processo metastático, como seu diagnóstico, prognóstico e estadiamento, além de fornecer informações sobre resistência de drogas, dentre outras maneiras de seleção e monitoramento de terapias, como relatam Szilágyi et al.²² Luo et al.⁴⁸ e Adalsteisson et al.⁴⁹.

Outro benefício dessa técnica apontado pelos autores está na sua forma de coleta, uma vez que os métodos tradicionais de análise por biópsia exigem procedimentos invasivos²². Esse método permite uma análise através de coleta pouco invasiva, que além de ser mais barata, é capaz de promover maior conforto e segurança ao paciente, sendo muitas vezes uma alternativa viável para aqueles que se encontram mais debilitados, como também afirmam Li et al.⁴³ e Luo et al.⁴⁸.

Para o manejo adequado de doenças como o câncer, se faz necessário elaborar métodos para prevenir sua ocorrência por intervenções em diferentes áreas da saúde^{50,51}. Bryan et al.²⁹, Boyne et al.³⁰ e Delgado-Cruzata et al.³¹ realizaram intervenções para avaliar essa possibilidade sob a forma da prática de atividade física, tanto para casos de hipermetilação, como de hipometilação. Friedenreich et al.⁵⁰ e Gillman et al.⁵²,

também destacam a relação inversamente proporcional entre o exercício físico e a incidência do câncer de mama.

Apesar da crescente aplicação de estudos de intervenção de atividade física para determinar prevenção de câncer pelo uso de marcadores epigenéticos, ainda são necessários avanços e aprimoramentos dos métodos que possibilitem encontrar resultados mais factíveis. Em certos estudos não são evidenciadas características que permitam visualizar alterações significativas na metilação, o que pode ocorrer devido à ausência de parâmetros consolidados nas devidas intervenções, como concluem Grazioli et al.⁵¹. Para contornar tais empecilhos, é importante elucidar melhor quais biomarcadores podem sofrer maior influência perante a prática de exercícios. Além de desenvolver e fornecer protocolos de intervenção regradados e regulados, com a capacidade de definir a intensidade, frequência, duração e monitoramento da atividade física que possam visar a prevenção do câncer de mama pela influência nos processos de metilação do DNA, defendido também por Światowy et al.²⁷, Grazioli et al.⁵¹ e Gillman et al.⁵².

Tais intervenções também possuem determinada importância em pacientes sobreviventes de câncer de mama, como

demonstrado nos estudos de Delgado-Cruzata et al.³¹ e Greenlee et al.³². Essa ação é capaz de promover melhor qualidade de vida para esses grupos, tendo em vista que durante o acometimento da doença e os tratamentos, é pouco frequente a realização de atividade física, bem como após a cura, fator destacado também por Hartman et al.⁵³.

Dieta regular com ingestão de alimentos saudáveis é um dos importantes tópicos que está relacionado com a prevenção de câncer de mama, ou até mesmo em seu tratamento, evitando sua progressão e proliferação^{28,54}. Mirza et al.³³ avaliaram uma das principais explicações para a influência de compostos naturais e dieta saudável para a prevenção do câncer de mama, que é a regulação das DNMTs⁷. Achados como esse tornam possível definir alvos terapêuticos baseado na ingestão de certos alimentos, como também defendem Li & Tollefsbol⁷, o que se conhece como nutri-epigenética²⁸.

Resultantes do metabolismo secundário de plantas, muitos compostos naturais estão envolvidos nesses processos, geralmente por meio de sua ação antioxidante são capazes de influenciar na prevenção de câncer⁷. Sendo relatados nos estudos de Zhu et al.³⁴ e Coussement et al.³⁵, as

isoflavonas, resveratrol e epigallocatequina galato, são encontrados em vegetais, frutas e chás^{7,55,56}. Faz-se necessário elucidar melhor os alvos epigenéticos de cada composto e como a dieta regular pode influenciar na metilação do DNA, determinando os benefícios sobre os efeitos que podem estar associados com diversas práticas, como relacionam Li & Tollesfsbol⁷ e Xiang et al.⁵⁴.

Greenlee et al.³² demonstraram que as intervenções de dieta são promissoras. A metilação do DNA possibilita a ação em diferentes alvos, que podem ser explorados de diversas maneiras, seja por reduzir níveis de metilação em genes hipermetilados, ou mesmo elevar a metilação global²⁸. Novos estudos devem solidificar esses resultados, uma vez que certas pesquisas geralmente não apresentam resultados significativos devido ao curto período de intervenção, ou falham em propor perfis epidemiológicos por trabalhar com um pequeno número de pacientes, como também afirmam Selvakumar et al.⁵⁵. Li & Tollesfsbol⁷ reforçam que a intervenção alimentar deve ter critérios plenamente estabelecidos, ser regrada, bem orientada e com a continuidade necessária para ser devidamente efetiva nos processos para a qual é aplicada.

No contexto do tratamento quimioterápico, destacam-se a quimioterapia primária, como representado no estudo de Li et al.³⁷, administrada como principal combate à doença e principalmente em casos avançados desta, como em metástases. A adjuvante é aplicada após intervenção de outras terapias, e a quimioterapia neoadjuvante, destacada no estudo de Hsu et al.³⁹, é usada no combate ao câncer localizado, como auxílio prévio para outras terapias^{57,58}. A pCR, parâmetro utilizado por Connolly et al.³⁸ e Hsu et al.³⁹, é um sistema utilizado para avaliar a estratificação de risco após quimioterapia neoadjuvante, consistindo na ausência de características invasivas após o tratamento quimioterápico^{58,59}.

Como observado nas pesquisas de Connolly et al.³⁸, Hsu et al.³⁹, Sharma et al.⁴⁰ e Eikesdal et al.⁴¹, uma das aplicações mais recorrentes para a epigenética em auxílio ao tratamento quimioterápico é o monitoramento e indicação do prognóstico dos pacientes. Este é dado por níveis de metilação do DNA em certos genes após as terapias, e pode indicar eficácia ou até mesmo menores níveis de efeitos adversos, como também afirmam Fisusi & Akala³⁶. Esta técnica vem sendo empregada para análise em pesquisas com tratamentos neoadjuvantes, ou de medicamentos

específicos dessa terapia, como o Vorinostat avaliado por Connolly et al.³⁸, o Olaparib, estudado por Eikesdal et al.⁴¹ ou administrações conjuntas, como de Doxorubicina e Ciclofosfamida, no estudo de Sharma et al.⁴⁰.

Também há um grande potencial para tratamento com medicamentos que revertem processos de metilação do DNA, fator presente na pesquisa de Li et al.³⁷ uma vez que é destacadamente um processo passível de modificações, como também afirmam Kulis & Esteller⁶⁰. Esse tipo de medicamento vem sendo cada vez mais estudado com uma via de tratamento em pacientes com câncer^{1,9}. O medicamento 5-azacitidina, estudado pelo grupo, é o principal representante destes, apesar de aprovado há quase duas décadas nos Estados Unidos da América, ainda é amplamente aplicado em estudos para promover descobertas sobre seu potencial, pois age inibindo DNMTs⁶¹.

A metilação do DNA aplicada à quimioterapia, seja no tratamento ou monitoramento, possui destacado potencial. Pode servir como forma de avaliar efetividade das mais variadas classes de quimioterápicos, e a resposta dos perfis mais diferenciados de câncer de mama às terapias, como também indicam Oliveira et al.¹ e Silva et al.⁴.

CONCLUSÃO

A metilação do DNA pode ser analisada e aplicada de variadas formas no âmbito do câncer de mama. Trabalhos que analisaram metilação em genes específicos evidenciaram papéis promissores de diagnóstico precoce do câncer, enquanto aqueles que analisaram ccfDNA observaram essa dinâmica para diagnóstico precoce de metástases.

Os demais estudos basearam-se em propor formas de intervenção para a prevenção ou tratamento de câncer por meio da análise de metilação do DNA. A adoção de hábitos saudáveis mostrou-se promissora no aspecto de prevenção e melhora na qualidade de vida, enquanto os estudos sobre quimioterapia avaliaram métodos de tratar, mas principalmente de acompanhar a evolução dos tratamentos de câncer de mama.

No entanto, novas pesquisas devem encontrar padrões de hipermetilação para estabelecer biomarcadores definitivos para o diagnóstico precoce, desenvolver protocolos de intervenção regradados, rígidos e regulados, além de implementar as aplicações da epigenética no tratamento quimioterápico e definição de prognóstico do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

1. OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLO, A. C.; ANDIA, D. C. *et al.* Metilação de DNA e câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 56, n. 4, p. 493-499, 2010. doi: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2010v56n4.698>
2. ARAÚJO, N. B. **Análise do perfil de metilação do DNA em pacientes com câncer de mama**. Dissertação de Mestrado em Biologia Aplicada à Saúde. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/13867>
3. SANTOS, J. A. **Perfil de metilação do MGMT e sua associação com fatores clinicopatológicos em pacientes com carcinoma escamocelular oral**. Monografia de Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015. Disponível em: https://biologia.ufes.br/sites/ciencia_sbiologicas.ufes.br/
4. SILVA, G. A.; CASTRO, N. S.; FIGUEIREDO, R. O. Mecanismos epigenéticos e a ação da expressão da proteína BRCA na carcinogênese mamária. **Brazilian Journal of Development**. v. 6, n.10, p. 82596-82613, 2020. doi: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-623>
5. FLAUSINO, S. C. **Avaliação da expressão imuno-histoquímica das enzimas DNA Metiltransferases 1 e 3b e infiltrado inflamatório em língua de camundongos Swiss submetidos à fumaça de narguilé**. Dissertação de Mestrado em Odontologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/229753>
6. RAULUSEVICIUTE, I.; DRABLØS, F.; RYE, M. B. DNA hypermethylation associated with upregulated gene expression in prostate cancer demonstrates the diversity of epigenetic regulation. **BMC medical genomics**. v. 13, n. 1, p. 1-15, 2020. doi: <https://doi.org/10.1186/s12920-020-0657-6>
7. LI, Y.; TOLLEFSBOL, T. O. Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components. **Current medicinal chemistry**. v. 17, n. 20, p. 2141-2151, 2010. doi: <https://doi.org/10.2174/092986710791299966>
8. MUGGERUD, A. A.; RØNNEBERG, J. A.; WÄRNBERG, F. *et al.* Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOXC1, PPP2R2B and PTEN in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer. **Breast Cancer Research**. v. 12, n. 1, p. 1-10, 2010. doi: <https://doi.org/10.1186/bcr2466>
9. FOLGUEIRA, M. A. A. K.; Brentani, M. M. Câncer de mama. In: FERREIRA C. G.; ROCHA J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo:

- Editora Atheneu; 2004, p. 135-145.
Disponível em: id:biblio-924706
10. WIELSCHER, M.; LIOU, W.; PULVERER, W. *et al.* Cytosine 5-hydroxymethylation of the LZTS1 gene is reduced in breast cancer. **Translational oncology**. v. 6, n. 6, p. 715-721, 2013. doi: <https://doi.org/10.1593/tlo.13523>
11. HSU, C. H.; PENG, K. L.; KANG, M. L. *et al.* TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. **Cell reports**. v. 2, n. 3, p. 568-579, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.030>
12. ALI, A.; ULLAH, F.; ALI, I. S. *et al.* Aberrant promoter methylation at CpG cytosines induce the upregulation of the E2F5 gene in breast cancer. **Journal of Breast Cancer**. v.19, n. 2, p. 133-141, 2016. doi: <https://doi.org/10.4048/jbc.2016.19.2.133>
13. GÀO, X.; ZHANG, Y.; BURWINKEL, B. *et al.* The associations of DNA methylation alterations in oxidative stress-related genes with cancer incidence and mortality outcomes: a population-based cohort study. **Clinical epigenetics**. v. 11, n. 1, p. 1-9, 2019. doi: <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0604-y>
14. DIAKITE, B.; TAZZITE, A.; HAMZI, K. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and breast cancer risk in Moroccan women. **African health sciences**. v. 12, n. 2, p. 204-209, 2012. doi: [10.4314/ahs.v12i2.20](https://doi.org/10.4314/ahs.v12i2.20)
15. GOEMANN, I. M.; MARCZYK, V. R.; RECAMONDE-MENDOZA, M. *et al.* Decreased expression of the thyroid hormone-inactivating enzyme type 3 deiodinase is associated with lower survival rates in breast cancer. **Scientific reports**. v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70892-4>
16. MIRZAEI, M. H.; NORUZINIA, M.; KARBASSIAN, H. *et al.* Evaluation of methylation status in the 5'UTR promoter region of the DBC2 gene as a biomarker in sporadic breast cancer. **Cell Journal (Yakhteh)**. v. 14, n. 1, p. 19, 2012. Cited in: PubMed; PMID 23626933
17. SYEED, N.; HUSSAIN, F.; HUSAIN, S. A. *et al.* 5'-CpG island promoter hypermethylation of the CAV-1 gene in breast cancer patients of Kashmir. **Asian Pacific journal of cancer prevention**. v. 13, n. 1, p. 371-376, 2012. doi: <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.1.371>
18. NG, E. K.; SHIN, V. Y.; LEUNG, C. P. *et al.* Elevation of methylated DNA in KILLIN/PTEN in the plasma of patients with thyroid and/or breast cancer. **OncoTargets and therapy**. v. 7, p. 2085, 2014. doi: [10.2147/OTT.S53597](https://doi.org/10.2147/OTT.S53597)
19. MOARII, M., PINHEIRO, A., SIGAL-ZAFRANI, B. *et al.* Epigenomic alterations in breast carcinoma from primary tumor to locoregional recurrences. **PLoS**

- One.** v. 9, n. 8, p. e103986, 2014.
doi:
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103986>
20. MARZESE, D. M.; HOON, D. S.; CHONG, K. K. *et al.* DNA methylation index and methylation profile of invasive ductal breast tumors. **The Journal of Molecular Diagnostics.** v. 14, n. 6, p. 613-622, 2012. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.07.001>
21. BECKER, L. M.; O'CONNELL, J. T.; VO, A. P. *et al.* Epigenetic reprogramming of cancer-associated fibroblasts deregulates glucose metabolism and facilitates progression of breast cancer. **Cell reports.** v. 31, n. 9, p. 107701, 2020. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107701>
22. SZILÁGYI, M.; PÖS, O.; MÁRTON, É. *et al.* Circulating cell-free nucleic acids: main characteristics and clinical application. **International journal of molecular sciences.** v. 21, n. 18, p. 6827, 2020. doi:
<https://doi.org/10.3390/ijms21186827>
23. CHRISTENSEN, E.; BIRKENKAMP-DEMTRÖDER, K.; SETHI, H. *et al.* Early detection of metastatic relapse and monitoring of therapeutic efficacy by ultra-deep sequencing of plasma cell-free DNA in patients with urothelial bladder carcinoma. **Journal of Clinical Oncology.** v. 37, n. 18, p. 1547-1557, 2019.
doi:10.1200/JCO.18.02052
24. SMOLKOVA, B.; MEGO, M.; KAJABOVA, V. H. *et al.* Expression of SOCS1 and CXCL12 proteins in primary breast cancer are associated with presence of circulating tumor cells in peripheral blood. **Translational oncology.** v. 9, n. 3, p. 184-190, 2016. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2016.03.004>
25. SALTA, S.; NUNES, S. P.; FONTES-SOUSA, M. *et al.* A DNA methylation-based test for breast cancer detection in circulating cell-free DNA. **Journal of clinical medicine.** v. 7, n. 11, p. 420, 2018. doi:
<https://doi.org/10.3390/jcm7110420>
26. WIDSCHWENDTER, M.; EVANS, I.; JONES, A. *et al.* Methylation patterns in serum DNA for early identification of disseminated breast cancer. **Genome medicine.** v. 9, n.1, p 1-11, 2017. doi:
<https://doi.org/10.1186/s13073-017-0499-9>
27. ŚWIATOWY, W. J.; DRZEWIECKA, H.; KLIBER, M. *et al.* Physical Activity and DNA Methylation in Humans. **International Journal of Molecular Sciences.** v. 22, n. 23, p. 12989, 2021. doi:
<https://doi.org/10.3390/ijms222312989>
28. URAMOVA, S.; KUBATKA, P.; DANKOVA, Z. *et al.* Plant natural modulators in breast cancer prevention: status quo and future perspectives reinforced by predictive, preventive, and personalized medical

- approach. **EPMA Journal**. v. 9, n. 4, p. 403-419, 2018. doi:
<https://doi.org/10.1007/s13167-018-0154-6>
29. BRYAN, A. D.; MAGNAN, R. E.; HOOPER, A. E. C. *et al.* Physical activity and differential methylation of breast cancer genes assayed from saliva: a preliminary investigation. **Annals of Behavioral Medicine**. v. 45, n. 1, p. 89-98, 2013. doi:
<https://doi.org/10.1007/s12160-012-9411-4>
30. BOYNE, D. J.; KING, W. D.; BRENNER, D. R. *et al.* Aerobic exercise and DNA methylation in postmenopausal women: An ancillary analysis of the Alberta Physical Activity and Breast Cancer Prevention (ALPHA) Trial. **Plos one**. v. 13, n. 6, p. e0198641, 2018. doi:
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198641>
31. DELGADO-CRUZATA, L.; ZHANG, W.; MCDONALD, J. A. *et al.* Dietary modifications, weight loss, and changes in metabolic markers affect global DNA methylation in Hispanic, African American, and Afro-Caribbean breast cancer survivors. **The Journal of nutrition**. v. 145, n. 4, p. 783-790, 2015. doi:
<https://doi.org/10.3945/jn.114.202853>
32. GREENLEE, H.; GAFFNEY, A. O.; AYCINENA, A. C. *et al.* Long-term diet and biomarker changes after a short-term intervention among Hispanic breast cancer survivors: the Cocinar Para Su Salud! randomized controlled trial. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**. v. 25, p. 11, p. 1491-1502, 2016. doi:
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-1334>
33. MIRZA, S.; SHARMA, G.; PARSHAD, R. *et al.* Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. **Journal of breast cancer**. v. 16, n. 1, p. 23-31, 2013. doi:
<https://doi.org/10.4048/jbc.2013.16.1.23>
34. ZHU, W.; QIN, W.; ZHANG, K. *et al.* Trans-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. **Nutrition and cancer**. v. 64, n. 3, p. 393-400, 2012. doi:
<https://doi.org/10.1080/01635581.2012.654926>
35. COUSSEMENT, L.; BOLCA, S.; VAN CRIEKINGE, W. *et al.* Exploratory analysis of the human breast DNA methylation profile upon soymilk exposure. **Scientific reports**. v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018. doi:
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31767-x>
36. FISUSI, F. A.; AKALA, E. O. Drug combinations in breast cancer therapy. **Pharmaceutical nanotechnology**. v. 7, n. 1, p. 3-23, 2019. doi:
<https://doi.org/10.2174/2211738507666190122111224>
37. LI, H.; CHIAPPINELLI, K. B.; GUZZETTA, A. A. *et al.* Immune

- regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers. **Oncotarget**. v. 5, n. 3, p. 587, 2014. doi: 10.18632/oncotarget.1782
38. CONNOLLY, R. M.; FACKLER, M. J.; ZHANG, Z. *et al.* Tumor and serum DNA methylation in women receiving preoperative chemotherapy with or without vorinostat in TBCRC008. **Breast cancer research and treatment**. v. 167, n. 1, p. 107-116, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4503-2>
39. HSU, P. C.; KADLUBAR, S. A.; SIEGEL, E. R. *et al.* Genome-wide DNA methylation signatures to predict pathologic complete response from combined neoadjuvant chemotherapy with bevacizumab in breast cancer. **Plos One**. v. 15, n. 4, p. e0230248, 2020. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230248>
40. SHARMA, P.; BARLOW, W.; GODWIN, A. K. *et al.* Impact of homologous recombination deficiency (HRD) biomarkers on outcomes in triple-negative breast cancer (TNBC) patients treated with AC chemotherapy (SWOG S9313). **Cancer Research**. v. 29, n. 3, p. 661-668, 2017. doi: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2017-1776>
41. EIKESDAL, H. P.; YNDESTAD, S.; ELZAWAHRY, A. *et al.* Olaparib monotherapy as primary treatment in unselected triple negative breast cancer. **Annals of Oncology**. v. 32, n. 2, p. 240-249, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.009>
42. CASTRALLI, H. A.; BAYER, V. M. L. Câncer de mama com etiologia genética de mutação em BRCA1 e BRCA2: uma síntese da literatura. **Brazilian Journal of Health Review**. v. 2, n. 3, p. 2215-2224, 2019. Disponível em: www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/1634
43. LI, W.; ZHANG, X.; LU, X. *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine signatures in circulating cell-free DNA as diagnostic biomarkers for human cancers. **Cell research**. v. 27, n. 10, p. 1243-1257, 2017. doi: <https://doi.org/10.1038/cr.2017.121>
44. LONG, S.; GOLDBLATT, J. MTHFR genetic testing: controversy and clinical implications. **Australian family physician**. v. 45, n. 4, p. 237-240, 2016. doi: <https://doi.org/10.3316/informit.019693494845514>
45. VOUTSADAKIS, I. A. The TSH/thyroid hormones axis and breast cancer. **Journal of Clinical Medicine**. v. 11, n. 3, p. 687, 2022. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm11030687>
46. BUCHSBAUM, R. J.; OH, S. Y. Breast cancer-associated fibroblasts: where we are and where we need to go. **Cancers**. v.8, n. 2, p. 19, 2016. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers8020019>
47. KUSTANOVICH, A.; SCHWARTZ, R.; PERETZ, T. *et al.* Life and

- death of circulating cell-free DNA. **Cancer Biology & Therapy**. v. 20, n. 8, p. 1057-1067, 2019. doi: <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>
48. LUO, H.; WEI, W.; YE, Z. *et al.* Liquid biopsy of methylation biomarkers in cell-free DNA. **Trends in molecular medicine**. v. 27, n. 5, p. 482-500, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.12.011>
49. ADALSTEINSSON, V. A.; HÁ, G.; FREEMAN, S. S. *et al.* Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. **Nature communications**. v. 8, n. 1, p. 1-13, 2017. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00965-y>
50. FRIEDENREICH, C. M.; RYDER-BURBIDGE, C.; MCNEIL, J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. **Molecular Oncology**. v. 15, n. 3, p. 790-800, 2021. doi: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12772>
51. GRAZIOLI, E.; DIMAURO, I.; MERCATELLI, N. *et al.* Physical activity in the prevention of human diseases: role of epigenetic modifications. **BMC genomics**. v. 18, n. 8, p. 111-123, 2017. doi: <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4193-5>
52. GILLMAN, A. S.; HELMUTH, T.; KOLJACK, C. E. *et al.* The effects of exercise duration and intensity on breast cancer-related DNA methylation: a randomized controlled trial. **Cancers**. v. 13, n. 16, p. 4128, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13164128>
53. HARTMAN, S. J.; WEINER, L. S.; NATARAJAN, L. *et al.* A randomized trial of physical activity for cognitive functioning in breast cancer survivors: Rationale and study design of I Can! Improving Cognition After Cancer. **Contemporary Clinical Trials**. v. 102, p. 106289, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cct.2021.106289>
54. XIANG, Y.; GUO, Z.; ZHU, P. *et al.* Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: modern perspectives of ancient but advanced science. **Cancer medicine**. v. 8, n. 5, p. 1958-1975, 2019. doi: <https://doi.org/10.1002/cam4.2108>
55. SELVAKUMAR, P.; BADGELEY, A.; MURPHY, P. *et al.* Flavonoids and other polyphenols act as epigenetic modifiers in breast cancer. **Nutrients**. v. 12, n. 3, p. 761, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/nu12030761>
56. MEDINA-AGUILAR, R.; PÉREZ-PLASENCIA, C.; GARIGLIO, P. *et al.* DNA methylation data for identification of epigenetic targets of resveratrol in triple negative breast cancer cells. **Data in brief**. v. 11, p. 169-182, 2017. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.02.006>

57. CHU, E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In: KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 13 ed. Porto Alegre: AMGH; 2017, 918-946. Disponível em: ISBN 9788580555974
58. WANG, H.; MAO, X. Evaluation of the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **Drug Design, Development and Therapy**. v. 14, p. 2423, 2020. doi: 10.2147/DDDT.S253961
59. RANZAN, I. C.; NETO, A. P. A.; NETO, R. F. *et al.* Análise da resposta patológica do câncer de mama em pacientes submetidas a terapia neoadjuvante em uma clínica privada de Cascavel/PR. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 6, p. e18610615461-e18610615461, 2021. doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15461>
60. KULIS, M.; ESTELLER, M. DNA methylation and cancer. **Advances in genetics**. v. 70, p. 27-56, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2>
61. SINGH, B.; SARLI, V. N.; LUCCI, A. Inhibition of resistant triple-negative breast cancer cells with low-dose 6-mercaptopurine and 5-azacitidine. **Oncotarget**. v. 12, n. 7, p. 626, 2021. doi: 10.18632/oncotarget.27922.