

A Epigenética na Carcinogénese

Gabriel Gonçalves de Carvalho Ferreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(mestrado integrado)

Orientador: Prof. Doutor José Alberto Moutinho

maio de 2020

Resumo

Com os avanços na compreensão da forma como os mecanismos epigenéticos regulam diversos processos celulares, tem-se percebido também que a epigenética, particularmente a metilação do DNA, as modificações das histonas e o RNA não codificante, tem um papel preponderante na formação e desenvolvimento de tumores. Como tal, focando no cancro da próstata e no cancro da mama, este trabalho pretende compreender de que forma a epigenética contribui para a formação de tumores malignos e como esse conhecimento tem contribuído para avanços na abordagem à doença, fazendo, para isso, uma revisão da literatura existente sobre o tema.

No cancro da próstata, a suspeita inicial é feita através do toque retal ou da medição dos níveis de PSA, o que permite fazer um diagnóstico precoce, mas com o problema de uma baixa especificidade. Visto que existem alterações epigenéticas desde o início da doença, essas alterações têm sido usadas para o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico que consigam prever com mais certeza o comportamento que o tumor terá, havendo resultados promissores. Além disso, contribuiu também com a descoberta de novos alvos terapêuticos, embora ainda haja um longo caminho.

No cancro da mama, também a nível do diagnóstico e da avaliação do prognóstico tem havido avanços, com muitos métodos baseados em alterações epigenéticas a conseguirem diferenciar entre os diferentes tipos e a conseguirem uma boa estratificação do risco. A nível da terapêutica, embora a falta de especificidade e o excesso de toxicidade sejam um problema, existem resultados promissores, nomeadamente no que toca a sinergias entre drogas epigenéticas e quimioterapia convencional.

Apesar de todas as dificuldades que ainda existem, não há dúvida que o desenvolvimento dos conhecimentos sobre o epigenoma farão parte do futuro da abordagem ao cancro.

Palavras-chave

Epigenética; genes; cancro; próstata; mama

Abstract

With advances in the understanding of how epigenetic mechanisms regulate different cellular processes, it has become clear that epigenetics, particularly DNA methylation, histone modifications and non-coding RNA, play a major role in the formation and development of tumors. As such, focusing on prostate cancer and breast cancer, this work aims to understand how epigenetics contributes to the formation of malignant tumors and how this knowledge has contributed to advances in the approach to the disease, by reviewing existing literature on the topic.

In prostate cancer, the initial suspicion is made by digital rectal examination or measurement of PSA levels, which allows for an early diagnosis, but with the problem of low specificity. Since there are epigenetic changes since the beginning of the disease, these changes have been used for the development of new diagnostic tools that are able to predict with more certainty the behavior that the tumor will have, with promising results. In addition, it has also contributed to the discovery of new therapeutic targets, although there is still a long way to go.

In breast cancer, there have been advances in terms of diagnosis and assessment of prognosis as well, with many methods based on epigenetic changes being able to differentiate between different types and to achieve a good risk stratification. In terms of therapy, although lack of specificity and excess toxicity are a problem, there are promising results, particularly with regard to synergies between epigenetic drugs and conventional chemotherapy.

Despite all the difficulties that still exist, there is no doubt that the development of knowledge about the epigenome will be part of the future of the approach to cancer.

Keywords

Epigenetics;genes;cancer;prostate;breast

Índice

Resumo	iii
Palavras-chave	iii
Abstract	v
Keywords	v
Lista de Acrónimos	ix
Introdução	1
Objetivos	3
Metodologia	5
Resultados	7
1. Cancro da Próstata	7
1.1. Metilação do DNA	7
1.2. Modificações de Histonas	9
1.3. NcrRNA	11
1.4. Terapêutica	12
2. Cancro da Mama	15
2.1. Metilação do DNA	16
2.2. Modificações de Histonas	18
2.3. NcrRNA	20
2.4. Terapêutica	21
Conclusão	25
Bibliografia	27

Lista de Acrónimos

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>
HAT	<i>Histone acetyltransferase</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HMT	<i>Histone methyltransferase</i>
HDM	<i>Histone demethylases</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ncRNA	RNA não-codificante
lncRNA	RNA não-codificante longo
sncRNA	RNA não-codificante curto
miRNA	micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
PSA	<i>Prostatic specific antigen</i>
GSTP1	<i>Glutathione S-transferase P</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
BAZ2A	<i>Bromodomain adjacent to zinc finger domain 2A</i>
KDM4A	<i>Lysine-specific demethylase 4A</i>
JARID1	<i>Jumonji AT-rich interactive domain 1 protein</i>
LSD1	<i>Lysine-specific demethylase 1</i>
PCR1	<i>Polycomb repressive complex 1</i>
PCR2	<i>Polycomb repressive complex 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
AR	Recetor de androgénio
ARE	<i>Androgen responsive element</i>
ZEB1	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>
ZEB2	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 2</i>
CDKN1B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
PCA3	<i>Prostate cancer antigen 3</i>
SChLAP1	<i>Second chromosome locus associated with prostate-1</i>
PCGEM1	<i>Prostate cancer gene expression marker 1</i>

FALEC	<i>focally amplified lncRNA in epithelial cancer</i>
PCAT1	<i>Prostate cancer associated transcript 1</i>
DZNep	<i>3-deazaneplanocin-A</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTEIC	<i>Phenethyl isothiocyanate</i>
ER	Recetor de estrogénio
PR	Recetor de progesterona
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
G9a	<i>Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2</i>
SMYD3	<i>SET and MYND domain-containing protein 3</i>
CARM1	<i>Coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>

Introdução

Foi Conrad Waddington, em 1942, que usou a expressão “epigenética” pela primeira vez, definindo-a como sendo “mudanças hereditárias no fenótipo celular, independentes de alterações na sequência do DNA”.(1-3) Atualmente, com a evolução do conhecimento nesta área, a definição mais aceita classifica-a como sendo “o estudo das alterações na função dos genes que são herdadas mitótica e/ou meioticamente e que não impliquem qualquer mudança na sequência de DNA”.(3)

Uma dessas alterações é a metilação do DNA, uma das mais comuns e mais bem estudadas, por ter sido a primeira a ser descoberta. É uma ligação covalente que ocorre no carbono-5 da citosina em dinucleotídeos CpG, que existem em grande frequência em regiões dos genes chamadas ilhas CpG, que por sua vez estão presentes em cerca de 70% dos promotores do genoma humano. Para que o gene seja transcrito, e expresso, o seu promotor tem de estar disponível. Metilando o promotor, o gene em questão fica inativado.(1,3) No entanto, os promotores dos genes não são os únicos locais do DNA a serem metilados, acontecendo metilação em regiões intragênicas e nos corpos dos genes. Como tal, os padrões de metilação do DNA a nível global são também um fator importante a considerar, estando a hipometilação associada a uma maior instabilidade cromossomal.(11,16) Existem três *DNA methyltransferase* (DNMTs), DNMT1, sobretudo para manutenção da metilação, e DNMT3a e DNMT3b, responsáveis pela metilação de novo.(1)

Para o estudo dos padrões de metilação do DNA, um dos métodos mais usados usa bissulfito de sódio para converter citosinas não metiladas em uracilo, com as citosinas metiladas mantendo-se inalteradas. Depois deste tratamento, podem ser aplicadas diversas tecnologias de sequenciamento de última geração, embora com elevados custos. Para compensar os custos, uma alternativa é o uso de anticorpos contra DNA metilado ou contra *methyl-CpG-binding domain proteins*, seguido do sequenciamento do DNA imunocomprometido. No entanto, quando o objetivo é analisar um elevado número de amostras o melhor método a usar são *arrays*, como os *Infinium arrays*.(29,33)

Grande parte das modificações são também feitas através da alteração da conformação da cromatina, complexo macromolecular de DNA e histonas, visto que, para um gene ser expresso, este tem de estar acessível à “maquinaria” de transcrição. Sendo assim, uma cromatina num estado mais restritivo, onde o DNA está altamente condensado, será menos acessível e, por isso, menos transcrito (heterocromatina). Pelo contrário, numa cromatina mais permissiva, numa conformação mais “aberta”, haverá uma maior atividade transcripcional (eucromatina).(1-2,4) A acetilação das histonas é uma das mais comuns mudanças epigenéticas e exerce efeito através desse mecanismo. Feito por *histone acetyltransferase* (HAT), ao acetilar o resíduo lisina da histona, que normalmente está carregado positivamente, fica neutralizado. Como o DNA é carregado negativamente, isto

resulta num enfraquecimento da interação eletrostática entre a histona e o DNA, levando a uma conformação mais aberta e permissiva. Com o papel oposto, de reverter a acetilação existem as *histone deacetylase* (HDACs).(1) A metilação das histonas é outra alteração que ocorre nos resíduos de arginina e lisina, por *histone methyltransferase* (HMTs). Esta não altera a carga dos resíduos e pode apresentar diversos padrões que acabam por levar a que por vezes condense a cromatina, com genes inativos, e outras vezes a liberte, com mais genes ativos. Semelhante à acetilação, para reverter a metilação existem também *histone demethylases* (HDMs).(1)

Para estudar estes tipos de alterações, a tecnologia usada é a imunoprecipitação da cromatina, usando anticorpos contra as marcas das histonas, seguido de sequenciação genómica. Usado em conjunto com os dados do transcriptoma obtidos através do sequenciamento de RNA, é capaz de fornecer importantes informações sobre a regulação transcricional.(33)

Por fim, a regulação epigenética pode ainda ser feita através de RNA não-codificante (ncRNA). Apenas cerca de 2% do genoma é traduzido depois de ser transcrito, apesar de todo ele ser transcrito. O restante RNA é classificado como sendo não-codificante, podendo ser dividido entre longo (lncRNA) e curto (sncRNA).(1) Um dos tipos de ncRNAs que tem sido grande alvo de estudos é o microRNA (miRNA), que regula a expressão de genes ligando-se ao RNA mensageiro (mRNA), impedindo a tradução e leva assim à sua inutilização.(6) Assim, oferece um bom ponto de controlo pós-transcricional.(3)

São mecanismos que controlam passos importantes do funcionamento celular e, como tal, caso haja alguma alteração, é muito fácil que surjam padrões epigenéticos que desregulem genes críticos, levando ao aparecimento de características como os chamados "hallmarks of cancer", levando à formação de tumores. Embora o cancro seja tipicamente uma doença genética, a epigenética tem, de facto, um importante papel. Cerca de 50% dos cancros humanos têm mutações em proteínas da cromatina.(4) Sabe-se também que células malignas têm alterações nos padrões de metilação do DNA e da estrutura da cromatina e muitas vezes são alterações causadas por estímulos não genéticos, como nutrição, estados metabólicos, o microambiente tumoral ou o envelhecimento.(2,4)

Como tal, sendo uma parte importante da carcinogénese, faz sentido que também sejam incluídos no que toca à abordagem desta doença, o que os tem tornado um grande ponto de interesse nos últimos anos, com inúmeros estudos feitos para compreender realmente como influenciam a carcinogénese e como esses conhecimentos podem ser usados para o desenvolvimento de novas técnicas que tornem o combate a esta doença mais eficaz.

Objetivos

Este trabalho tem como objetivo compreender em que medida a Epigenética e as alterações epigenéticas (metilação do DNA, alterações nas histonas e ncRNAs) contribuem para a formação de tumores malignos e conhecer a atual evidência científica sobre como esse conhecimento tem vindo a contribuir para avanços na abordagem à doença, focando no cancro da próstata e no cancro da mama, os tipos de cancro mais comuns no homem e na mulher, respetivamente.

Metodologia

Este trabalho trata-se de uma revisão descritiva da literatura existente sobre este tema.

Para a sua realização, foi feita uma pesquisa na base de dados *pubmed*, usando a palavra “Epigenetics” em combinação com as expressões “Carcinogenesis” (com um total de 1976 resultados), “Prostate Cancer” (com um total de 647 resultados) e “Breast Cancer” (com um total de 1624 resultados). Foi feita uma seleção inicial com base no título, resultando em 5 artigos selecionados da primeira pesquisa, 120 da segunda e 136 da terceira. Por último fez-se uma segunda seleção com base no abstract, resultando em 5 artigos da primeira pesquisa, 19 da segunda e 24 da terceira. A pesquisa foi feita durante os meses de outubro, novembro e dezembro de 2019, em inglês. Foram considerados artigos disponíveis até ao final do ano de 2019, não tendo sido posta mais nenhuma limitação cronológica ou de idioma.

Resultados

1. Cancro da Próstata

A próstata é um órgão que vai crescendo lentamente à medida que o homem envelhece, sendo que o cancro da próstata começa quando este crescimento é descontrolado.(7) É o tipo de cancro mais prevalente no homem (8) e em estádios iniciais é assintomático.(7) No entanto, em estádios mais avançados pode ser acompanhado por uma variedade de sintomas, principalmente urinários, noctúria, disúria, hematúria, bem como perda de controlo da bexiga ou ainda hematospermia. A hipertrofia benigna da próstata apresenta sintomas semelhantes, mas raramente é uma condição que ameaça a vida.(7)

Os fatores de risco para esta patologia são sobretudo três: idade avançada, grupo étnico afro-americano e risco familiar, sendo que o cancro da próstata familiar é muito heterogéneo, sugerindo o envolvimento de vários genes e não a existência de apenas um gene específico que cause maior predisposição.(7,9)

A suspeita clínica (o diagnóstico é histológico) inicial é feita por toque retal ou medição dos níveis de PSA (*prostatic specific antigen*). Este último é o mais sensível, sendo capaz de detetar um grande número de casos sub-clínicos, permitindo fazer um diagnóstico precoce com diminuição do risco absoluto de morte por esta doença, mas à custa de sobrediagnóstico e sobretratamento. Esta baixa especificidade é, de facto, a sua maior desvantagem, acabando por exigir uma série de procedimentos invasivos, biópsias e tratamentos desnecessários para casos que nunca resultariam em morte por esta causa, pelo que tem havido um grande foco em tentar investigar métodos e marcadores que consigam fazer uma discriminação mais eficaz e prever com mais certeza o comportamento que o tumor terá, usando para isso as alterações epigenéticas que acontecem desde cedo nesta patologia.(9-11)

1.1. Metilação do DNA

Em células de cancro da próstata os padrões de metilação de DNA estão alterados, havendo tanto hipermetilação como hipometilação, embora em alturas diferentes da doença. A hipermetilação acontece nos promotores de diversos genes, reprimindo-os, sendo um dos mais importantes meios para a aquisição do fenótipo neoplásico. Afeta genes supressores de tumor, genes relacionados com a resposta hormonal, com o controlo do ciclo celular, com a adesão celular e apoptose, levando à iniciação do tumor, à sua progressão e metastatização.(11-12) A hipometilação, ou seja, genes que estariam metilados em células normais que o deixam de estar, acontece em estádios mais avançado da doença, contrariamente à hipermetilação. Existe uma diminuição da metilação do DNA a nível global nestas fases da patologia,(7,16) o que leva a um aumento da instabilidade do DNA e

à hipometilação de promotores de genes individuais, que passam a estar indevidamente ativados.(11-12) É o caso do oncogene MYC, necessário para o crescimento dependente de androgénios em tecidos normais. Quando sobreexpresso, causa um crescimento descontrolado do tumor e de forma independente da estimulação pelos androgénios.(12)

Relativamente à hipermetilação, é uma das alterações mais bem estudadas, estando descrito acontecer em centenas de genes. O gene da *Glutathione S-transferase P* (GSTP1) é um dos genes mais abundantemente hipermetilados, em mais de 90% dos cancros da próstata, apesar de não o estar em tecidos normais. Codifica uma proteína envolvida na desintoxicação e na eliminação de compostos potencialmente genotóxicos, protegendo o material genético e sendo, por isso, um forte candidato a ser usado como biomarcador, por ser capaz de distinguir entre estados benignos e pré-malignos.(10-12)

Para ajudar no diagnóstico têm-se tentado desenvolver métodos que consigam detetar a hipermetilação do DNA, tanto em biópsias da próstata, como também em amostras de sangue periférico ou de urina, estes dois últimos com particular interesse por serem pouco invasivos, podendo complementar o uso da PSA ou do toque retal para que se conseguisse realizar um diagnóstico inicial com um valor preditivo mais forte.(11)

Analisado as amostras de urina citologicamente, só são encontradas células de tumor da próstata nessas amostras em estádios mais avançados da doença. No entanto, DNA livre das células do tumor pode ser detetado mesmo na ausência de células propriamente ditas. O problema é que por vezes não se conseguem obter amostras com quantidades de células ou DNA satisfatórias, dando origem a resultados insatisfatórios quanto à sensibilidade.(13)

Para melhorar a qualidade da amostra, tentando aumentar a quantidade de células na urina, alguns estudos têm realizado a colheita da urina depois do toque retal, embora esse método não seja o mais prático. O uso da primeira urina da manhã seria mais fácil de implementar, além de ter a possibilidade de colher várias amostras, reduzindo a possibilidade de eventuais erros acontecerem.(13-14)

Brikun et al (14) realizou um estudo com o intuito de desenvolver um painel de marcadores de metilação de DNA, usando amostras colhidas das duas formas. Foram selecionadas 19 ilhas CpG associadas a 18 genes (ADCY4, AOX1, APC, CXCL14, EPHX3, GFRA2, GSTP1, HEMK1, KIFC2, MOXD1, HOXA7, HOXB5, HOXD3 (duas ilhas), HOXD9, HOXD10, NEUROG3, NODAL e RASSF5). Com a intenção de chegar a um resultado final de positivo ou negativo para cada teste realizado, o limiar usado foi de 6 marcadores positivos em 19. Com isso conseguiram um valor preditivo negativo superior a 0,90 para ambas as amostras, com uma sensibilidade de 0,89 para as amostras obtidas depois do toque retal e de 0,94 para as amostras da primeira urina da manhã. Mostrou, assim, que a colheita da primeira urina da manhã pode ser uma boa forma de avaliar a metilação do DNA. Além disso, as possibilidades deste método não se cingem somente a resultados binários de positivo ou

negativo, permitindo a formação de recomendações personalizadas para cada doente, através da avaliação da assinatura de metilação de cada um, uma área que merece mais investigação para o desenvolvimento de painéis de genes que o permitam.(14)

Para além da urina, têm sido desenvolvidos testes também para o sangue periférico, dado o facto de que existe um aumento de DNA livre em diversos cancros, incluindo o da próstata.(11)

Com a intenção de desenvolver um teste que detetasse precocemente, simultaneamente, cancro da próstata, colorretal e do pulmão, Constâncio V et al (15) desenvolveu um estudo, obtendo uma sensibilidade e especificidade de 72% para a deteção de cancro da próstata com um painel com os genes FOXA1, RAR β 2, RASSF1A e GSTP1. Usando outro painel, “Pan-Cancer” (FOXA1, RAR β 2 e RASSF1A), identificaram cancro da próstata e cancro do pulmão com uma sensibilidade de 64% e uma especificidade de 70%. Analisando esse painel para a capacidade de identificar cancro da próstata clinicamente significativo precocemente, conseguiram discriminar entre pacientes de risco intermédio e alto de pacientes de baixo risco com 71% de sensibilidade e 65% de especificidade. Por fim, seguiram a cohort por 85 meses e verificaram que doentes com níveis detetáveis de APC, GSTP1, RAR β 2, RASSF1A, SEPT9 e SOX17 apresentavam valores aumentados de mortalidade específica pela doença, mostrando serem marcadores com potencial para previsão do prognóstico. Assim, conseguiram um painel com a capacidade de detetar cancro da próstata com uma especificidade superior ao do PSA (cerca de 20 a 45%), embora com uma sensibilidade limitada, mostrando que poderá ser uma boa adição à medição do PSA para o diagnóstico em fase precoce da doença.(15)

1.2. Modificações de histonas

Como dito anteriormente, também as histonas são um importante ponto de regulação da expressão de genes. Essa regulação é feita através da adição de compostos, de forma reversível, alterando a sua estrutura e, conseqüentemente, alterando a conformação da cromatina. São diversos os compostos envolvidos nesse processo, mas dois dos mais bem estudados são a acetilação e a metilação. A acetilação, adição de um grupo acetilo a resíduos de lisina, leva à ativação de genes.(7) A metilação é a adição de um grupo metilo (um, dois ou três) a resíduos de lisina e arginina, podendo levar à ativação ou inativação de genes. Sabe-se que a metilação do resíduo de lisina 4 e 36 da histona 3 (H3K4, H3K36) leva à ativação de genes, enquanto que a metilação em H3K9 e H3K27 leva a estados mais restritivos.(8-9)

No cancro da próstata, estes mecanismos estão desregulados. Por exemplo, comparando com o tecido normal, os níveis de H3K4me1, H3K9me2, H3K9me3, H3Ac e H4Ac em cancros da próstata estão reduzidos.(9,11-12,16) Níveis de H3K18Ac e H3K4me2

globalmente aumentados estão relacionados com recorrência do tumor.(11,16) Além disso, tanto H3Ac, como H3K9me2 têm a capacidade de diferenciar amostras entre malignas ou benignas.(11) Também se verificou que H3K27me1 e H3K27me3 estão relacionados com tumores com características mais agressivas,(16) associadas a uma alteração da expressão das enzimas responsáveis por estas alterações nas histonas,(7,16) como o *enhancer of zeste homolog 2* (EZH2), discutida em mais pormenor a seguir;(7) o *bromodomain adjacent to zinc finger domain 2A* (BAZ2A), que promove crescimento celular e proliferação;(7) o *lysine-specific demethylase 4A* (KDM4A), correlacionada com cancro em estado mais avançado e metastases;(7) o *Jumonji AT-rich interactive domain 1 protein* (JARID1), que regula a sobrevivência da célula e a metastização;(7) ou o *lysine-specific demethylase 1* (LSD1), que pode ter funções como ativador ou repressor.(11)

O grupo de proteínas polycomb, do qual fazem parte a *polycomb repressive complex 1* (PRC1) e a *polycomb repressive complex 2* (PRC2), são dois complexos responsáveis pela metilação das histonas, sendo o PRC2 de grande importância. Este complexo é composto por quatro unidades, uma delas o EZH2, a unidade enzimática responsável pela trimetilação de H3K27, resultando, então, em H3K27me3. Isso irá ter um efeito silenciador em vários genes e está associado com tumores mais agressivos, a metastases resistentes ao tratamento hormonal e a um pior prognóstico.(7,17) Esses efeitos causados por EZH2, acontecem devido à repressão de diversos genes supressores de tumor, além de também promover a secreção de metaloproteínas da matrix e a angiogénese mediada pelo *vascular endothelial growth factor* (VEGF).(12,17) O gene CDH1 é outro gene inibido, resultando numa redução de *E-cadherin*, levando a uma transição epitélio-mesenquimal, promovendo a invasão e migração celular.(12,17) Como este, muitos outros genes, são reprimidos por EZH2, acabando por levar a que haja uma indiferenciação da célula, com a aquisição de um estado semelhante a células tronco embrionárias.(17)

Um grande impacto que as modificações no perfil de metilação de histonas têm é na regulação da atividade do recetor androgénico (AR), um dos mais importantes fatores para a formação e progresso destes tumores, essencial para a sobrevivência das células do cancro da próstata.(8-9)

Isto porque AR exerce o seu efeito ligando-se a partes do DNA específicas, *androgen responsive element* (ARE), estimulando a expressão desses genes. No entanto para aceder aos ARE, a cromatina tem que estar no estado mais aberto, sendo que AR recruta diversas enzimas para esse efeito.(18) Também LSD1 está envolvida no processo, porque não só consegue demetilar o H3K4me1 e o H3K4me2, levando a um efeito inibitório na ação de AR, como também consegue ter um efeito estimulador, sendo capaz de demetilar H3K9me1 e H3K9me2.(8,18) Outra proteína recrutada por AR é EZH2, mas neste caso com o intuito de reprimir a transcrição de genes, através da trimetilação de H3K27, como descrito em

cima.(8,18) Para além da metilação, a atividade de AR também é regulada através de acetilação, sendo que um aumento na acetilação em células com uma expressão excessiva de AR está relacionada com o desenvolvimento de resistências ao tratamento hormonal. Isso significa que enzimas com atividade de acetiltransferase, têm um impacto positivo na ativação de AR, enquanto que enzimas com a função de desacetilase iram inibir a atividade de AR.(8,18)

1.3. NcRNA

Como referido anteriormente, ncRNAs são moléculas de RNA transcritas de DNA, mas que não codificam proteínas. Em vez disso, a sua função passa pela regulação da expressão de diversos genes, aqui a nível pós-transcricional.(7,16) Relativamente aos sncRNAs, existem várias categorias, sendo os mais bem estudados no contexto da carcinogénese o miRNA, que atua inibindo a tradução do mRNA do gene a inibir.(16) Além disso, alguns miRNAs têm um efeito regulatório positivo, ligando-se à extremidade 5' do mRNA, que nesse caso estimulará a sua tradução.(19)

Existem miRNAs com efeitos oncogénicos, tal como existem outros com efeitos supressores de tumor.(11,16) No caso do miRNA-101 (miR-101), esta é uma molécula com um efeito supressor tumoral, tendo uma expressão reduzida em células de cancro da próstata. Atua regulando a enzima EZH2, que comumente tem uma expressão aumentada, sendo que miR-101 a inibe, resultando numa redução da invasão e da migração das células tumorais.(7,11,19) A família miR-200, tal como miR-205, têm como alvo as proteínas *zinc finger E-box-binding homeobox 1 e 2* (ZEB1 e ZEB2), promotoras da transição epitélio-mesenquimal pela repressão de *E-cadherin*. Assim, estes miRNAs têm também um efeito supressor de tumor, estando normalmente diminuídos nestes tumores.(19) Outro miRNA com funções de supressor de tumor é miR-449a, com efeitos na célula que incluem a interrupção do ciclo celular e a aquisição de um fenótipo senescente. Normalmente tem níveis diminuídos em células tumorais, inversamente à enzima que regula, a HDAC1.(19) O MiR-34a é mais um gene supressor tumoral, com uma expressão frequentemente diminuída no cancro da próstata, dado que o promotor do seu gene está metilado em cerca de 80% dos casos.(16) Tem diversos alvos, sendo um deles a proteína CD44, que está presente em níveis aumentados em células com características de células estaminais, mostrando que miR-34a é uma interessante possibilidade terapêutica para tumores CD44 positivos, por este seu efeito inibitório.(16,19) No entanto, também está relacionado, de forma positiva, com o gene p53, um inibidor de proteínas envolvidas no ciclo celular e na apoptose, sendo que o miR-34a também inibe o ciclo celular em G1 e, como tal, inibe o crescimento tumoral.(11,19)

Existem muitos miRNAs regulados através da hipermetilação como miR-196b ou miR-193b, estando este último relacionado com uma inibição do crescimento tumoral,(19) e outros, como miR-615, hipometilados com níveis aumentados nestas células e associados ao mau prognóstico do cancro da próstata.

Os miRNAs como miR-21, miR-221 e miR-222 têm efeitos oncogénicos.(11,16,19) Com o miR-21 ainda não está completamente esclarecido qual o seu verdadeiro papel no cancro da próstata, mas parece que está relacionado com o desenvolvimento de resistências ao tratamento hormonal, visto que um aumento na sua expressão estimula um crescimento independente de androgénios. No entanto, os seus níveis em células de cancro da próstata estão muitas vezes diminuídos, o que é mais característico de genes supressores tumorais. Além disso, quando inativado, não se associa à agressividade do tumor, o que acaba por gerar algumas dúvidas quanto ao seu papel nesta patologia.(19) Os miRNAs miR-221 e miR-222, por sua vez, estão muitas vezes sobreexpressos em tumores mais agressivos. Têm como alvo o mRNA de p27, resultando numa repressão da enzima *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* (CDKN1B), que inibe a progressão do ciclo celular de G1 para S. O resultado é um grande crescimento do tumor, sendo um sinal de mau prognóstico.(11,16)

Mas não são só os miRNAs que influenciam a formação e progressão desta doença. Também vários lncRNAs estão implicados. Um dos mais frequentemente elevados é o *prostate cancer antigen 3* (PCA3), sendo o caso em mais de 95% de tumores da próstata. Regula a expressão de diversos genes, tendo um impacto na transição epitélio-mesenquimal, angiogénese, adesão celular e apoptose, tendo sido sugerido como um possível alvo terapêutico, além de um biomarcador que talvez possa ajudar no diagnóstico precoce.(16,20) O *second chromosome locus associated with prostate-1* (SchLAP1) é outro lncRNA que também pode ter valor como um biomarcador que ajude na avaliação do prognóstico, tendo demonstrado um grande valor preditivo para a ocorrência de metastases.(16,20) O *prostate cancer gene expression marker 1* (PCGEM1) é mais um gene cuja expressão aumentada promove a proliferação, tal como *focally amplified lncRNA in epithelial cancer* (FALEC), sendo este último induzido por ambientes em hipóxia.(16) Mais um exemplo de um lncRNA envolvido é o *prostate cancer associated transcript 1* (PCAT1), com uma alta expressão em tumores em estádios iniciais.(16,20)

1.4. Terapêutica

Atualmente, as várias opções terapêuticas para o cancro da próstata incluem *watchful waiting*, tratamento cirúrgico, radioterapia, terapia hormonal, entre outros. O intuito, é de melhorar a qualidade de vida dos doentes e inibir ou atrasar o crescimento e a evolução da doença. E o nível de sucesso destas terapêuticas em estádios iniciais é grande (nos casos que a doença está localizada, os mais usados são a prostatectomia radical e a radioterapia),

no entanto, para casos mais avançados, com metástases e resistências à quimioterapia, o prognóstico torna-se muito reservado.(7) Em casos mais avançados o bloqueio hormonal é o mais utilizado, com a supressão da produção androgénica, inibindo os ARs. Tem uma boa resposta inicial, mas acaba por evoluir para uma fase resistente à terapêutica, tendo uma sobrevivência média depois do início do bloqueio de 23 a 37 meses.(8) Posto isto, novas opções terapêuticas são necessárias e os mecanismos epigenéticos atrás referenciados são um potencial alvo. Já existem alguns fármacos com ação epigenética aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de síndrome mielodisplásica, mieloma múltiplo e linfoma de células T, no entanto nenhum deles é aplicado a tumores sólidos.(16) Dois dos fármacos aprovados são inibidores de DNMT, 5-azacytidina e decitabina, mas apenas o segundo mostrou ter alguma ação contra cancro da próstata resistente à castração.(16,21) Esses dois compostos são inibidores nucleosídeos, mas apresentam alta toxicidade.(7,21) Assim tem havido tentativas de desenvolver inibidores não-nucleosídeos para tumores sólidos, como o da próstata.(21) Foi com essa intenção que Graça I et al (21) avaliaram as propriedades da hidralazina contra o cancro da próstata, um vasodilatador, usado no tratamento da hipertensão arterial e insuficiência cardíaca, que também está descrito como tendo um efeito inibidor na metilação de DNA. Provaram, de facto, que tem um efeito anti-tumoral, sendo 40 µM a dose mais eficaz. Mostrou uma redução da expressão de DNMTs, o que levou à ativação de vários genes supressores de tumor. Resultou na redução da viabilidade celular, indução de apoptose e redução do potencial invasivo das células tumorais. Também foi referido o seu potencial efeito como sensibilizador a tratamentos quimioterapêuticos, visto induzir o dano de DNA, uma vantagem para tratamentos oncológicos. Comparando com decitabina, a hidralazina parece ser mais eficaz, visto conseguir manter a expressão de genes por períodos de tempo mais longos, além de ser uma substância que, embora para outras finalidades, já é usada como uma terapêutica de longo prazo e com reduzidos efeitos secundários, o que a tornam uma interessante possibilidade.(21)

Também diversas enzimas modificadoras de histonas estão a ser alvo de diversos estudos para o desenvolvimento de tratamentos, uma delas sendo inibidores de EZH2. É o caso de *3-deazaneplanocin-A* (DZNep) que reduz os níveis de PRC2, incluindo EZH2, através da inibição de um cofator necessário para o funcionamento da enzima. No entanto, existem dúvidas quanto à especificidade desta molécula, resultando não só na redução de H3K27me3, mas também de outras marcas em histonas que não deveriam ser reduzidas.(17)

Inibidores de HDACs é outro grupo de agentes com propriedades interessantes no combate a esta doença, embora também tenham a mesma limitação que os inibidores de DNMTs, a falta de especificidade epigenética.(17) *Dois* substâncias incluídas neste grupo são

verinostat, que inibe a proliferação celular e metastases, e romidepsina, que se liga ao átomo de zinco no sítio ativo de HDACs, inativando-as.(7,17) Estas duas moléculas quando usadas em combinação com outros agentes quimioterapêuticos, apresentam um efeito sinérgico, promovendo a apoptose das células mais eficazmente.(7)

Outra enzima utilizada como alvo é LSD1, que se associa a fenótipos mais agressivos, com uma grande expressão em situações resistentes à castração. Existem moléculas, como NCL1, que conseguem inibir seletivamente e suprimem o crescimento de tumores, independente de androgênios, com reduzidos efeitos adversos. Etani T et al (22) analisaram o potencial terapêutico de NCL1, que já tinha sido provado que inibia a proliferação celular em tumores sensíveis à castração. Aqui, NCL1 mostrou que através da inibição da proliferação celular e da angiogénese, suprime o crescimento de tumores resistentes à castração, de forma segura e eficaz. São, no entanto, necessários mais estudos *in vivo*, já que este foi *in vitro* e *ex vivo*.(22)

Por outro lado, com uma grande especificidade existem os miRNAs, que também têm sido investigados para fins terapêuticos, bloqueando ou induzindo a produção de proteínas, tanto com inibidores de miRNAs oncogénicos, como com miRNAs artificiais que simulem miRNAs supressores de tumor, embora ainda existam algumas dúvidas quanto aos vetores que possam ser usados, efeitos secundários possíveis ou regimes terapêuticos.(8,16) Dois compostos que têm efeitos antitumorais são o resveratrol e o pterostilbene (análogo de resveratrol mais potente), ambos estudados por Dhar S et al (23). Além de antioxidantes, antiinflamatórios e cardioprotetores, também têm efeitos anti oncológicos, alterando a expressão de miRNAs, nomeadamente da família miR-17. Os miRNAs desta família têm como função a redução da proteína *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), que tem efeitos supressores tumorais. O resveratrol e pterostilbene aumentam a expressão da PTEN em células de cancro da próstata, através da repressão desses miRNAs. Entre os dois compostos o pterostilbene mostrou-se mais eficaz e foi capaz de contrariar o crescimento acelerado de tumores.(23)

Noutro estudo, Sousa EJ et al (24) estudaram uma outra substância que também aumenta a expressão de miRNA supressor de tumor, enoxacina. É uma fluoroquinolona, que inibe o crescimento de células tumorais, pela estimulação da expressão de certos miRNAs. Em células de cancro da próstata expostas a enoxacina verificou-se uma redução da viabilidade celular, da capacidade de invasão das células e um aumento da morte celular por apoptose. Também houve um aumento de miRNAs com efeitos supressores de tumor: miR-29b, miR-146a e miR-34a. Também neste estudo foi avaliado o miR-17, tal como no estudo anterior, embora aqui tivessem registado um aumento da sua expressão. Além disso, mais uma vez, contrariamente ao estudo anterior, referiram-no como tendo um efeito supressor tumoral, através da inibição de enzimas mitocondriais antioxidantes.(24)

Uma outra substância estudada é *phenethyl isothiocyanate* (PEITC), um produto de glucosinolato. Zhang C et al (25) avaliou os efeitos de PEITC no cancro da próstata e verificou que estimulou a expressão de miR-194 e miR-659 e reduziu a de miR-17, miR-18a, miR-20a, miR-106a/b e miR-301a. O aumento de miR-194 é responsável pelo efeito supressor da metastização que PEITC, visto que este miRNA vai inibir metaloproteinases da matriz, reprimindo, assim, a invasão celular. De notar que também este composto teve um efeito na expressão de miR-17, mas, tal como registado por Dhar S et al (23), exerceu uma regulação negativa, com a diminuição deste miRNA, que foi referido sendo benéfico para o combate a esta doença pelos efeitos oncogénicos que apresenta.(25)

2. Cancro da mama

O cancro da mama é o cancro mais comum em mulheres em todo o mundo, com a prevalência a aumentar nos últimos anos, devido, entre outros fatores, à aplicação de rastreios. A mortalidade por esta doença apresenta uma variação em termos geográficos, estando a aumentar em países asiáticos, africanos e sul americanos; e a diminuir em países europeus e na América do Norte, devido a um diagnóstico mais precoce e uma maior eficácia no tratamento.(27-28)

Os carcinomas da mama, dependendo do padrão histológico que tiverem, podem ser classificados em diferentes categorias, sendo os mais comuns carcinoma ductal invasivo, carcinoma ductal *in situ* e carcinoma lobular invasivo e *in-situ*.(32) No entanto existem outras características que o ajudam a caracterizar, já que o aspeto histológico não é suficiente para predizer com segurança o resultado clínico. Avalia-se também o prognóstico quanto ao tamanho, invasão dos vasos linfáticos e sanguíneos e a nível molecular, para uma orientação terapêutica mais eficaz. Avalia-se o estado dos recetores hormonais, recetor de estrogénio (ER) e recetor de progesterona (PR), e de *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2).(27,29)

Baseados nestes últimos marcadores, os carcinomas da mama podem ser divididos em várias categorias. Tipo luminal A (ER+ e/ou PR+, HER2-, com baixa proliferação), representando cerca de 50 a 60% dos casos. Tipo luminal B HER- (ER+ e/ou PR+, HER2-, com alta proliferação) e tipo luminal B HER+ (ER+ e/ou PR+, HER2+, com alta proliferação), juntos fazendo 10 a 20% dos casos. Tipo HER2 positivo (ER-, PR- e HER2+), com cerca de 15 a 20%. Por fim, triplo-negativo (ER-, PR- e HER2-), com 10 a 20% dos casos. Destes tipos, os luminais tendem a ter menos tendência a metastizar e menor recorrência.(27) Os triplo-negativos, com características mais agressivas, é um grupo de tumores bastante heterogéneo, subdividindo-se em diversos subtipos. O basal-like é o mais comum (cerca de 80%), embora nem todos os tumores basal-like sejam triplo-negativos.(36)

Tal como no cancro da próstata, também aqui as alterações genéticas não são suficientes para explicar todas as alterações que acontecem. A epigenética apresenta, mais uma vez, um papel preponderante na formação e progressão de tumores, com interessantes aplicações no diagnóstico e tratamento.(28)

2.1. Metilação do DNA

Tal como no cancro da próstata, também no cancro da mama as alterações na metilação do DNA tem um papel preponderante na carcinogénese e na progressão do tumor, interferindo com genes envolvidos na diferenciação celular, controlo da transcrição, reparação do DNA, controlo do ciclo celular, adesão celular, apoptose e metabolismo da célula.(28) Essas alterações estão recorrentemente presentes em vários tumores da mama, e consistem tanto numa hipometilação global do DNA, como também numa hipermetilação em regiões específicas.(28,30) Quanto há hipometilação, é um acontecimento que aumenta com a idade e está relacionado com instabilidade gnómica. Ocorre sobretudo em regiões pobres em genes, sendo raro nos promotores.(30-31) A alteração mais frequente nos promotores dos genes é a hipermetilação, resultando na redução da expressão de genes supressores de tumor.(31)

Uma das mutações mais associadas a este cancro são mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, genes cujos produtos participam na reparação do DNA. A sua perda representa um grande aumento na suscetibilidade de vir a desenvolver a doença e estão relacionados com o fenótipo triplo-negativo.(33-34) No entanto, mutações nestes genes não são a única forma de reprimir os seus efeitos. No que toca a doença esporádica, a sua repressão através da hipermetilação do seu promotor parece ser a forma mais comum da aquisição deste fenótipo.(31,33-34)

Para além desse, outros genes têm sido encontrados frequentemente hipermetilados, como APC,(31-33) ATM,(34), CDKN2A,(30-35) CDH1,(31,35) CST6,(33) GSTP1,(33-35) MGMT,(30,35) MLH1,(30,35) PALB2,(34) PITX2,(33) PTEN,(30) RARB2,(34) RASSF1A.(32-34)

Mas não são sempre os mesmos genes metilados em todos os tumores, havendo padrões de metilação de DNA distintos entre os vários tipos de cancro da mama.(30,34) Os tipos luminais são os que parecem ser mais hipermetilados a nível dos promotores, enquanto que os tumores triplo-negativos têm menos alterações deste tipo.(34-35) Stefansson OA et al (37) chegou aos mesmos resultados num estudo realizado com o objetivo de identificar as assinaturas de metilação de DNA mais associadas com os distintos tipos de cancro da mama. Nesse estudo encontraram uma propensão mais alta dos tumores luminais B para terem os promotores metilados, enquanto que nos tumores do subtipo basal-like fosse mais comum uma hipometilação do corpo do gene (sugerido em alguns estudos como sendo uma

possível forma de repressão do gene), sugerindo que o mecanismo por detrás das alterações epigenéticas destes dois subtipos de cancro da mama sejam diferentes.(37)

Relativamente aos tumores do tipo luminal, outra característica está relacionada com o gene ESR1. Apresenta a capacidade de identificar tumores deste tipo com pior prognóstico, visto que codifica o recetor de estrogénio. Isso significa que, não estando metilado, o tumor irá ser ER positivo tendo uma boa resposta ao tratamento anti-estrogénio com tamoxifeno,(33-34) embora 30% a 40% dos pacientes acabem por desenvolver resistências.(33)

Os tumores triplo-negativos, dada a sua heterogeneidade e escassez de opções terapêuticas, têm sido alvo de diversos estudos focados nas suas características epigenéticas, para que se consiga uma melhor abordagem destas doentes. Normalmente os que apresentam um perfil de hipometilação têm melhor prognóstico, enquanto que os mediantemente metilados são os que apresentam pior sobrevivência. Também relacionado com o prognóstico destes tumores está o estado de metilação dos promotores de alguns genes. Um deles é o BRMS1, que está relacionado com metastases em gânglios linfáticos. É um gene supressor de tumor que tem níveis de expressão tipicamente reduzidos em tumores deste tipo, sendo que a sua metilação se relacionou com tumores de maiores dimensões e com metastases ganglionares.(36)

No entanto, a estratificação do prognóstico dos pacientes com este tipo de tumores continua a ser um desafio e foi nesse sentido que Stirzaker C et al (38) realizaram um estudo em que encontraram 36 regiões diferentemente metiladas, específicas para tumores triplo negativos. Sendo essas regiões mais hipermetiladas neste tipo de tumores, conseguiram diferenciar as amostras entre triplo negativos ou não triplo negativos com uma sensibilidade de 0,72 e uma especificidade de 0,94. Além disso, conseguiram também dividir os tumores triplo negativos em três grupos, sendo o mais hipometilado o que se associou a melhor prognóstico comparativamente aos outros dois.(38) De facto, diversos estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de identificar biomarcadores que consigam analisar a metilação do DNA, dado ser um evento comum nesta patologia e que acontece desde cedo na sua evolução, e com isso conseguir ajudar no diagnóstico e avaliação do prognóstico.(33)

A implementação de rastreios através de mamografias conseguiu reduzir a mortalidade por cancro da mama em cerca de 28 a 45%, mas é uma técnica com uma grande frequência de falsos positivos, com uma especificidade de 92% e uma sensibilidade de 70% na deteção da patologia. Além de que não é suficientemente eficaz na estratificação dos pacientes constante a agressividade do tumor, havendo ainda uma alta taxa de mortalidade pela doença devido a recorrências e desenvolvimento de metástases.(39)

Assim, Salta S et al (39) desenvolveram um teste para complementar o diagnóstico inicial com uma melhor estratificação do prognóstico, tendo chegado a um painel de genes (APC, FOXA1, RASSF1A e SCGB3A1) capaz de detetar cancro da mama com uma precisão de 94%

(sensibilidade de 60 a 80% e especificidade de 78 a 100%), em amostras de tecido. Além disso, dadas as vantagens de um teste diagnóstico feito a partir de biópsias líquidas, tentaram também realizar um teste através do DNA livre de células circulantes, retirado do plasma. Com um painel de três genes (APC, FOXA1 and RASSF1A) conseguiram uma sensibilidade, especificidade e precisão acima dos 75%. Uma alternativa interessante inclusivamente para mulheres com mamas mais densas em que a mamografia não é tão eficaz.(39)

Num outro estudo, Li Y et al (40) focaram-se no problema de não se conseguir prever com grande certeza se vão haver recorrências. Para isso identificaram perfis de metilação que resultaram num painel de genes com capacidade de classificar binariamente a progressão do tumor. Tendo em conta os genes selecionados (BRCA1, DAPK1, MSH2, CDKN2A, PGR, PRKCDBP, RANKL), a avaliação usando o painel com os sete genes mostrou uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 100%, com um forte poder estatístico, o que mostra a eficácia deste método para a avaliação do prognóstico.(40)

2.2. Modificações de histonas

Juntamente com a metilação do DNA, as modificações nas histonas estão também frequentemente associadas com a repressão de genes supressores de tumor e instabilidade genética, sendo a acetilação e a metilação mais uma vez as modificações mais comuns no cancro da mama.(41) A leitura da acetilação é mais fácil, uma histona acetilada resulta sempre num estado de eucromatina, ou seja, com genes ativos. Exemplos disso são os resíduos de lisina K5, K8, K9, K12, K14, K18 da histona H3 e o resíduo K16 da histona H4, que acetilados dão origem a esse estado mais permissivo.(28) Diversos tumores têm sido associados a atividade aberrante de HDACs, com enzimas como HDAC1 relacionadas com estádios mais avançados e agressivos.(41)

A metilação já é um processo mais complexo, mas também reversível.(42) Neste caso, alterações como a metilação dos resíduos K4, K36, K79 da histona H3 resultam num estado ativo da cromatina, enquanto que metilação dos resíduos K9, K20 K27 da histona H3 numa cromatina mais repressiva.(31,35,42)

A desregulação destes processos resulta no aparecimento e progressão de cancros, bem como na sua metastização, muitas vezes com padrões específicos.(28) Um aumento na acetilação de H3K4 está associado à progressão do cancro e transição epitélio-mesenquimal.(33) Um desequilíbrio na acetilação de H3K9 está associado a genes relacionados com a proliferação celular, apoptose, sinalização entre células, migração celular e processos metabólicos.(28) A trimetilação de H3K27 associa-se a genes relacionados com o ciclo celular, estando muitas vezes presente em células resistentes ao tratamento.(28) Tudo isto leva a que o perfil das alterações das histonas tenham algum

valor preditivo em relação ao prognóstico da doença, com uma diminuição nos níveis de acetilação de lisinas e dos níveis de metilação de lisinas e arginias manifestando um pior prognóstico, associando-se a subtipos que o refletem.(28,32,36)

De facto, à semelhança do que acontece com a metilação do DNA, também o perfil das modificações de histonas varia dependendo do tipo de cancro da mama de que se esteja a falar. Em tumores do tipo luminal A existe um aumento global de H3K27me3, mas que diminui no tipo HER2 e no subtipo basal-like. Tumores do tipo HER2 têm menor frequência de alterações nas histonas.(28,36) Relativamente a tumores triplo-negativos, as modificações H3K4me1, H3K4me3, H3K9me3, H3K9ac, H3K27me3, H3K27ac, H3K36me3 e H3K79me2 foram identificadas em diversos tumores.(36)

Mas, como dito anteriormente, existem diversas enzimas responsáveis pela regulação dessas modificações e, tal como no cancro da próstata, EZH2 é uma das principais. É uma metiltransferase responsável por trimetilar H3K27 (H3K27me3), uma marca repressiva.(35,42-43) É uma enzima bastante associada com fenótipos mais agressivos, expressada em grande quantidade no subtipo basal-like,(34-35,42) e relacionada com uma proliferação aumentada.(42) Também existem dados que sugerem que tem um papel na repressão do gene reparador de DNA RAD51, visto que a marca repressiva H3K27me3 foi encontrada na região do promotor deste gene.(34)

Existem, no entanto, outras HMTs envolvidas. É o caso da *euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2* (G9a) e da *SET and MYND domain-containing protein 3* (SMYD3). A G9a é responsável por metilar H3K9. Trata-se de uma marca restritiva, que contribui para a agressividade do tumor, silenciando genes supressores de tumor. A SMYD3 está presente em maior quantidade em células de cancro da mama. Tem como alvo H3K4, através do qual interfere no crescimento das células de cancro, sendo que a repressão desta enzima resultou numa inibição desse crescimento.(35)

Outra proteína importante é a *coactivator-associated arginine methyltransferase 1* (CARM1), um co-ativador do recetor de estrogénio alfa, mediando as alterações H3R17me e H3R26me. Controla cerca de 16% de genes dependentes de estrogénio e influencia a proliferação do cancro da mama.(43)

Relativamente às HDMs, a LSD1 foi uma das primeiras a ser identificada. Demetila H3K4me1 e H3K4me2, resultando numa repressão de genes supressores de tumor. Está presente em níveis bastante elevados em tumores ER negativos, sendo um marcador da agressividade do tumor.(35,42) Além disso, também contribui para a demetilação de H3K9 na presença de recetores de estrogénio alfa ativados e ainda é capaz de demetilar outras proteínas para além das histonas como DNMT1 ou p53, mostrando que tem um campo de ação mais alargado.(35,42-43) Outras demetilases com um papel importante na tumorigenese são KDM3A, diminuindo a quantidade de H3K9me2, (33) e KDM5A, que

contribui para o desenvolvimento de tolerância ao tratamento farmacológico pelas células do tumor.(42)

Outro aspeto no qual estes processos epidemiológicos estão envolvidos é na transição epitelio-mesenquimal, essencial para a disseminação para tecidos distantes e formação de metástases. É um processo que resulta da ativação excessiva de genes como BMI1 (altamente expresso em tumores *basal-like*), ou pela inibição de genes como CDH1 (que codifica a proteína *E-cadherin*). (26,31)

2.3. NcRNA

Também no cancro da mama os ncRNA desempenham um importante papel, sobretudo miRNAs. Controlam processos como a diferenciação, proliferação, apoptose e metabolismo.(27) Tudo isto pode levar ao desenvolvimento de características malignas e a sua expressão está frequentemente alterada em cancros da mama.(31,35) Desempenham um papel importante tanto no início do tumor, como na sua progressão e crescimento, desenvolvimento de resistências ao tratamento farmacológico, metastização e angiogénese.(27-28,44)

Alguns funcionam como supressores de tumor, inibindo a expressão de proteínas com efeitos oncogénicos, e normalmente apresentam níveis mais baixos. Exemplos disso são miRs como let-7 (inibe a migração e invasão) e miR-31.(27,44-45)

Outros miRNAs funcionam como oncogenes, reprimindo a expressão de genes supressores de tumor, e estão habitualmente presentes em quantidades elevadas.(27,44) Exemplos deste tipo de miRNAs são miR-10b (sobreexpresso em células de tumores da mama metastizados) e miR-21 (associado a tumores em estádios avançados, com altos índices de proliferação e envolvimento de gânglios linfáticos).(27,44-45)

Tendo tantos campos de atuação, o perfil de miRNAs expressos em determinado tumor da mama, para além de conseguir diferenciar de tecidos normais, consegue providenciar informações importantes relativamente ao subtipo de cancro, tratamento e prognóstico.(28,35) O miR-342 é um exemplo de miRNA que está aumentado em tumores luminais B, com recetores de estrogénio e HER2 positivos, mas diminuído em tumores triplo negativos. Enquanto que o miR-375 é característico de tumores com recetores de estrogénio e progesterona negativos. Além disso, este último também está associado a eficácia de tratamentos de quimioterapia neoadjuvantes em tumores HER2 positivos.(27)

Em tumores triplo-negativos a análise do perfil de miRNAs torna-se ainda mais interessante, dada quantidade de informações adicionais que pode oferecer neste grupo de tumores tão heterogéneo. Neste tipo de tumores os miRNAs miR-145 e miR-205 mostraram ter uma expressão reduzida, o que não acontece em células normais.(32) No que toca a BRCA1, a sua expressão é inibida por miR-10b e miR-26a, ao contrário de miR-153, que

estimula a sua expressão.(36) Tem ainda influência sobre a transição epitelio-mesenquimal, com níveis elevados de miR-9 a predizer a existência de metastases.(27,36)

Como tal, os miRNAs têm sido alvo de diversos estudos com o intuito de desenvolver ferramentas que permitam um diagnóstico mais eficaz.(28,32) Dado que os miRNAs podem ser encontrados em diversos fluidos, incluindo saliva, urina, soro e plasma, os miRNAs circulantes apresentam uma oportunidade interessante, visto que os seus padrões também estão alterados na presença de tumor desde estados iniciais.(27,32) Existem, no entanto, diferenças entre os padrões de miRNA encontrados no tumor, relativamente aos que circulam no soro. Isto sugere a possibilidade serem secretados seletivamente pelas células malignas como uma forma de comunicação célula-célula, o que os torna bastante estáveis.(27) Para além do seu pequeno tamanho, a sua grande estabilidade vem também do facto de serem transportados conjugados em complexos através de vesículas, em complexos lipoproteicos de HDL ou LDL, em complexos da proteína Ago ou envolvidos em corpos apoptóticos.(27,32) Assim, resistentes a RNases, flutuações do pH, vários ciclos de congelamento e descongelamento e a longos períodos de tempo de armazenamento. Tornam-se moléculas bastante apropriadas para serem usadas como biomarcadores.(27) Especificamente em relação ao prognóstico, atualmente, a sua avaliação faz-se sobretudo tendo como base o sistema de estadiamento tumor-nódulo-metástase (TNM), servindo depois também para orientar as opções de tratamento. No entanto, este sistema não consegue prever com eficácia o prognóstico de cada caso individual, por não contemplar a heterogeneidade do tumor. Como tal, Lai J et al (46) realizaram um estudo para desenvolver uma forma de identificar mais eficazmente quais as pacientes com maior risco, tendo como base miRNAs. Utilizando uma assinatura composta por seis miRNAs (hsa-miR-549a, hsa-miR-6715a, hsa-miR-4501, hsa-miR-7974, hsa-miR-4675 e hsa-miR-147b) conseguiram encontrar uma associação significativa com a taxa de sobrevivência, sendo os resultados melhorados ainda mais quando se associou a fatores de risco clínico, encontrando assim um modelo composto por quatro variáveis (assinatura de miRNA, idade, classificação TNM e estado dos recetores de estrogénio). Com esse modelo conseguiram um poder preditivo de 0,758, um valor superior aos 0,650 obtidos quando apenas se usou o modelo de estadiamento TNM. Conseguiram ainda estratificar os pacientes entre grupos de alto risco e baixo risco, tendo em conta a taxa de sobrevivência a cinco anos, mostrando como os miRNAs podem ser ferramentas tão úteis na abordagem a estes doentes.(46)

2.4. Terapêutica

Atualmente, as estratégias terapêuticas usadas para combater o cancro da mama dividem-se entre tratamentos sistémicos e locais, sendo muitas vezes usados em conjunto. Os sistémicos têm como alvo tanto os tumores não metastáticos, como os metastizados,

enquanto que os locais são usados sobretudo para os tumores não metastizados, através de radioterapia ou métodos cirúrgicos. A escolha da melhor abordagem para cada caso baseia-se numa série de fatores, sendo o subtipo moléculas do tumor de grande importância.(28) A positividade dos recetores hormonais, não só reflete um melhor prognóstico, como também revela uma oportunidade de realizar tratamento dirigido, com terapêuticas anti-estrogénio, usando drogas como tamoxifeno.(34-35,43) No entanto, à medida que a doença progride, é comum que o tumor assuma características mais agressivas e ganhe a capacidade de crescer de forma independente. Isso acontece pela perda de expressão do recetor de estrogénio, o que dificulta a escolha da estratégia terapêutica a adotar. Por detrás dessa perda, por vezes estão mutações, mas na maioria das vezes é causada por mecanismos epigenéticos. Sendo essas mudanças epigenéticas reversíveis, tornam-se alvos promissores para melhorar o tratamento e a prevenção do cancro da mama.(28,35)

Uma das classes de fármacos são os inibidores da DNMT, desenvolvidos com o intuito de ativar genes supressores de tumor que estavam hipermetilados. Os mais estudados são 5-azacitidina e decitabina e os dois foram aprovados para o tratamento de síndromes mielodisplásicas de alto risco. São incorporados na cadeia de DNA e formam um complexo irreversível com DNMT1, resultando na degradação dessa enzima, prevenindo a metilação da cópia de DNA depois da replicação. A 5-azacitidina também é incorporada em cadeias de RNA, interferindo com a tradução.(31,41)

Têm-se revelado mais eficazes usados em conjunto com outros agentes quimioterapêuticos. Vários estudos mostram que os inibidores de DNMTs são capazes de sensibilizar tumores da mama à doxorubicina, um fármaco pertencente à classe das antraciclina, medicamentos antitumorais usadas no tratamento do cancro da mama. No entanto, com administrações repetidas de doxorubicina, as células do tumor desenvolvem resistência.(32,41) Vijayaraghavalu S et al (47) realizaram um estudo nesse sentido, e chegaram à conclusão de que o tratamento sequencial com decitabina e doxorubicina foi eficaz, ultrapassando a resistência que as células tinham previamente. No entanto, cerca de 20% das células resistentes não responderam ao tratamento, possivelmente por estarem noutra fase do ciclo celular que não a fase S (quando a decitabina seria incorporada no DNA) ou pela instabilidade que a decitabina tinha no meio de cultura (tendo uma semi-vida curta, os níveis de DNMT1 voltaram ao normal no dia 2 pós tratamento).(47) De facto, a instabilidade, juntamente com a toxicidade e a falta de especificidade são as maiores barreiras que algumas destas drogas epigenéticas apresentam.(32)

Para além dos inibidores da DNMT, os inibidores da HDAC são outra classe de fármacos bastante estudada nesta área, dada a redução global na acetilação das histonas que acontece nos tumores devido ao aumento de HDAC. Assim, conseguem modificar a estrutura da cromatina e voltar a expressar genes previamente silenciados. O problema destes inibidores

é a falta de especificidade, reduzindo também a acetilação de outras proteínas para além das histonas.(31-32) Atualmente estão a ser estudados em diversos cancros sólidos e hematológicos, por mostrarem diminuir o tamanho do tumor e induzir apoptose, sendo que já existem dois aprovados para linfomas cutâneos de células T (vorinostat e romidepsin).(31,35-36)

Outro aspeto bastante interessante é o efeito que o cotratamento com inibidores de HDAC e inibidores de DNMT têm. Levam à restauração da expressão dos recetores de estrogénio, voltando a sensibilizar tumores que eram ER negativos para terapia hormonal.(28,31-32,35,41) A combinação destas duas drogas resulta numa sinergia que aumenta a expressão de genes previamente silenciados. Com a intenção de avaliar a sua aplicação na reversão da transição epitelio-mesenquimal em tumores triplo negativo, SU Y et al (48) observaram que resulta numa redução da agressividade do tumor, com menor proliferação celular, motilidade, invasão e formação de colónias, induzindo ainda apoptose. Os melhores resultados foram obtidos com o inibidor de DNMT guadecitabina com o inibidor de HDAC entinostat.(48)

Finalmente, relativamente aos miRNAs, uma vez que participam em processos importantes da carcinogénese, são alvos a serem considerados para um tratamento mais eficaz e personalizado.(27) Existem diversos mecanismos para os usar na abordagem ao cancro da mama. Um deles centra-se em inibir miRNAs oncogénicos através de esponjas, que se ligam a miRNAs endógenos reprimindo a sua atividade. Outro método semelhante, também focado em inibir miRNAs oncogénicos, são antagomiRs. Estas últimos funcionam como as esponjas, ligam-se aos miRNAs alvo através da complementaridade de bases, inibindo-os. A diferença entre estes dois métodos passa pelo seu tamanho, as esponjas são maiores, sendo que cada uma possui mais que um local de ligação aos miRNAs alvo. Outro método, Inforna, inibe a transcrição de miRNAs oncogénicos ou o seu processamento. Apesar de ter um efeito semelhante aos métodos anteriores, não apresenta tantos problemas na sua entrega nas células ou com a resposta imune. Relativamente aos miRNAs supressores de tumor, normalmente presentes em menores quantidades, existem miRNAs *mimics*, moléculas de RNA sintéticos, que mimetizam os miRNAs endógenos em falta.(27-28) O grande desafio com o uso de miRNAs para fins terapêuticos é a sua entrega na célula, havendo dois tipos de estratégias, virais e não-virais. Sistemas de entrega virais entregam os miRNAs em questão através de vetores virais com uma grande capacidade de transfeção. São eficazes na inibição de cancro da mama metastático, mas têm uma alta imunogenicidade, para além das partículas virais terem grande potencial para mutações. Os sistemas não-virais são menos eficazes, mas também menos imunogénicos e altamente biocompatíveis.(27)

Para além de fármacos, as modificações epigenéticas também podem ser influenciadas por fatores ambientais e pela dieta. Diversos fitoquímicos presentes em alimentos (como por exemplo polifenóis presentes no chá verde ou preto; genisteína presente na soja; curcumina presente no açafrão; sulforafano; ou resveratrol) interagem com as enzimas envolvidas na regulação dos processos epigenéticos. Portanto, um possível método de prevenção baseia-se na adesão a dietas específicas, compostas maioritariamente por vegetais, fruta, peixe e soja, que estão associados a uma diminuição do risco de cancro da mama.(28,31,35)

Conclusão

O estudo do epigenoma é uma área em evolução e com a tecnologia a evoluir a uma velocidade enorme, é certo que a compreensão sobre os seus mecanismos continuará a evoluir. Sabe-se que interferem nos mais diversos processos celulares como a diferenciação celular, controlo da transcrição, reparo do DNA, controlo do ciclo celular, adesão celular, apoptose e metabolismo da célula, e é importante que se continue a aprofundar esse conhecimento.(28)

Mas mesmo tendo ainda muito caminho pela frente, já se tornou claro que as alterações epigenéticas são uma parte integral na formação e evolução de tumores e o contributo que está a trazer na criação de novas formas de abordar esta doença é bastante promissor.

Uma das áreas onde o seu contributo tem sido mais notório é na definição do prognóstico, por se tratarem de alterações que estão presentes desde o início da doença. Capazes de discriminar entre diferentes subtipos, de uma boa estratificação de risco e até de prever o nível de agressividade do tumor,(31) os mecanismos epigenéticos e os novos potenciais biomarcadores descobertos com o avanço no conhecimento neste domínio fazem parte do futuro das técnicas de diagnóstico e prognóstico na abordagem a doentes com cancro.

Além disso, com o conhecimento de novos processos envolvidos na carcinogénese, vem também a identificação de potenciais alvos terapêuticos. A influência que a epigenética está a ter nesta área, para além de conseguir ajudar a identificar qual a melhor estratégia terapêutica a adotar, passa pela possibilidade do desenvolvimento de fármacos que tenham estes mecanismos como alvo. Embora ainda estejam numa fase inicial, com muitas destas moléculas a registarem uma falta de especificidade e um excesso de toxicidade, existem estudos com resultados promissores, nomeadamente quando aplicadas em conjunto com terapêuticas já usadas, com sinergias interessantes a serem descobertas, como na superação de resistências.(47)

Apesar de todas estas dificuldades, não há dúvida que o desenvolvimento dos conhecimentos sobre o epigenoma, com uma compreensão mais aprofundada da metilação do DNA, das modificações das histonas e de miRNA, bem como o investimento da sua aplicação em novas ferramentas para o diagnóstico, prognóstico e tratamento farão parte do futuro da abordagem ao cancro e têm a possibilidade de contribuir para que a mortalidade e mobilidade causadas por estas doenças continuem a descer.

Bibliografia

1. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012 July 6; 150(1):12-27. doi:10.1016/j.cell.2012.06.013
2. Nebbioso A, Tambaro FP, Aversana CD, Altucci L. Cancer epigenetics: moving forward. *PLoS genet*. 2018 June 7; 14(6):1-25. doi:10.1371/journal.pgen.1007362
3. Ramassone A, Pagotto S, Veronese A, Visone R. Epigenetics and microRNAs *Cancer International Int J Mol Sci*. 2018 February 3; 19(2):1-28. doi:10.3390/ijms19020459.
4. Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE. Epigenetic plasticity and hallmarks of cancer. *Science*. 2017 July 21; 357(6348). doi:10.1126/science.aal2380
5. Wong CC, Qian Y, Yu J. Interplay between epigenetics and metabolism in oncogenesis: mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene*. 2017 January 16; 36(24):3359-3374. doi:10.1038/onc.2016.485
6. Humphries B, Wang Z, Yang C. MicroRNA regulation of epigenetic modifiers in breast cancer. *Cancers*. 2019 June 27; 11(7). doi:10.3390/cancers11070897
7. Kgatle MM, Kalla AA, Islam MM, Satheke M, Moorad R. Prostate Cancer: Epigenetic Alterations, Risk Factors, and Therapy. *Prostate Cancer*. 2016 November 06; 2016. doi:10.1155/2016/5653862
8. Cucchiara V, Yang JC, Mirone V, Gao AC, Rosenfeld MG, CP. Epigenomic regulation of androgen receptor signaling: Potential role in prostate cancer therapy. *Cancers*. 2017 January 16; 9(1):1-29. doi:10.3390/cancers9010009
9. Chinaranagari S, Sharma, P, Bowen NJ, Chaudhary J. Prostate Cancer Epigenome. *Methods Mol Biol*. 2015; 1238: 125–140. doi: doi:10.1007/978-1-4939-1804-1_7
10. Lorincz AT. Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014 March 21; 14(3):293–305. doi:10.1586/14737159.2014.897610
11. Chin SP, Dickinson JL, Holloway AF. Epigenetic regulation of prostate cancer. *Clin Epigenet*. 2011 June 14; 2(2):151-169. doi:10.1007/s13148-011-0041-7
12. Albany C, Alva AS, Aparicio AM, Singal R, Yellapragada S, Sonpavde G, Hahn NM. Epigenetics in Prostate Cancer. *Prostate Cancer*. 2011 November 30; 2011:1-12. doi:10.1155/2011/580318
13. Blute ML, Damaschke NA, Jarrard DF. The Epigenetics of pca Diagnosis and Prognosis: Update on Clinical Applications. *Curr Opin Urol*. 2015 January; 25(1):83–88. doi:10.1097/MOU.0000000000000132
14. Brikun I, Nusskern D, Decatus A, Harvey E, Li L, Freije D. A panel of DNA methylation markers for the detection of prostate cancer from FV and DRE urine DNA. *Clinical Epigenetics*. 2018 July 3; 10:1-15. doi:10.1186/s13148-018-0524-x

15. Constâncio V, Nunes SP, Moreira-Barbosa C, Freitas R, Oliveira J, Pousa I, Oliveira J, Soares M, Dias CG, Dias T, Antunes L, Henrique R, Jerónimo C. Early detection of the major male cancer types in blood-based liquid biopsies using a DNA methylation panel. *Clinical Epigenetics*. 2019 December 2;11:1-18. doi:10.1186/s13148-019-0779-x
16. Liao Y, Xu K. Epigenetic regulation of prostate cancer: the theories and the clinical implications. *Asian J Androl*. 2019; 21:279–290. doi: 10.4103/aja.aja_53_18
17. Yang YA, Yu J. EZH2, an epigenetic driver of prostate cancer. *Protein Cell*. 2013 May; 4(5):331–341. doi:10.1007/s13238-013-2093-2
18. Cai C, Yuan X, Balk SP. Androgen receptor epigenetics. *Transl Androl Urol* 2013 September 10; 2(3):148-157. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.02
19. Paone A, Galli R, Fabbri M. MicroRNAs as new characters in the plot between epigenetics and prostate cancer. *Front Genet*. 2011 September 6; 2:1-6. doi:10.3389/fgene.2011.00062
20. Guo H, Ahmed M, Hua J, Soares F, He HH. Crucial role of noncoding RNA in driving prostate cancer development and progression. *Epigenomics*. 2017 November 25; 9(1):1–3.
21. Graça I, Sousa EJ, Costa-Pinheiro P, Vieira FQ, Torres-Ferreira J, Martins MG, Henrique R, Jerónimo C. Anti-neoplastic properties of hydralazine in prostate cancer. *Oncotarget*. 2014 April 17; 5(15):5950-5964. doi:10.18632/oncotarget.1909
22. Etani T, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki T, Iida K, Nozaki S, Kato H, Nagayasu Y, Suzuki S, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. NCL1, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy. *J Clin Med*. 2019 March 31; 4(4):1-15. doi:10.3390/jcm8040442
23. Dhar S, Kumar A, Rimando AM, Zhang X, Levenson AS. Resveratrol and pterostilbene epigenetically restore PTEN expression by targeting oncomiRs of the miR-17 family in prostate cancer. *Oncotarget*. 2015 August 6; 6(29):27214-27226. doi:10.18632/oncotarget.4877
24. Sousa EJ, Graça I, Baptista T, Vieira FQ, Palmeira C, Henrique R, Jerónimo C. Enoxacin inhibits growth of prostate cancer cells and effectively restores microRNA processing. *Epigenetics*. 2013 May; 8(5):548-558. doi:10.4161/epi.24519
25. Zhang C, Shu L, Kim H, Khor TO, Wu R, Li W, Kong ANT. Phenethyl isothiocyanate (PEITC) suppresses prostate cancer cell invasion epigenetically through regulating microRNA-194. *Mol Nutr Food Res*. 2016 June; 60(6):1427–1436. doi:10.1002/mnfr.201500918

26. Holliday H, Baker LA, Junankar SR, Clark SJ, Swarbrick A. Epigenomics of mammary gland development. *Breast Cancer Res.* 2018 September 3; 20(100):1-11. doi:10.1186/s13058-018-1031-x
27. 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 Oncol.* 2018 July 18; 14(18):1847-1867. doi:10.2217/fo-2018-0061
28. Rahman MM, Brane AC, Tollefsbol TO, MicroRNAs and Epigenetics Strategies to Reverse Breast Cancer. *Cells.* 2019 October 8; 70(8):515-517. doi:10.3390/cells8101214
29. Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama JV. Epigenetics in Breast and Prostate Cancer. *Methods Mol Biol.* 2015; 1238: 425–466. doi:10.1007/978-1-4939-1804-1_23
30. Jeschke J, Collignon E, Fuks F. DNA methylome profiling beyond promoters – taking an epigenetic snapshot of the breast tumor microenvironment. *FEBS Journal.* 2015; 282(9):1801-1814. doi:10.1111/febs.13125
31. Basse C, Arock M. The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. *Int J Cancer.* 2015; 137(12):2785-2794. doi:10.1002/ijc.29347
32. Cava C, Bertoli G, Castiglioni I. Integrating genetics and epigenetics in breast cancer : biological insights , experimental , computational methods and therapeutic potential. *BMC Syst Biol.* 2015; 9(62):1-36. doi:10.1186/s12918-015-0211-x
33. Davalos V, Martinez-Cardus A, Esteller M. The Epigenomic Revolution in Breast Cancer: From Single-Gene to Genome-Wide Next-Generation Approaches. *Am J Pathol.* 2017 October; 187(10):2163-2174. doi:10.1016/j.ajpath.2017.07.002
34. Stefansson OA, Esteller M. Epigenetic Modifications in Breast Cancer and Their Role in Personalized Medicine. *Am J Pathol.* 2013 October; 183(4):1052-1063. doi:10.1016/j.ajpath.2013.04.033
35. Abdel-Hafiz HA, Horwitz KB. Role of epigenetic modifications in luminal breast cancer. *Epigenomics.* 2015; 7(5):847–862. doi:10.2217/epi.15.10
36. Temian DC, Pop LA, Irimie AI, Berindan-Neagoe I. The epigenetics of triple-negative and basal-like breast cancer: Current knowledge. *J Breast Cancer.* 2018 September; 21(3):233-243. doi:10.4048/jbc.2018.21.e41
37. Stefansson OA, Moran S, Gomez A, Sayols S, Arribas-Jorba C, Sandoval J, Hilmarisdottir H, Olafsdottir E, Tryggvadottir L, Jonasson JG, Eyfjord J, Esteller M. A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. *Mol Oncol.* 2015; 9(3):555-568. doi:10.1016/j.molonc.2014.10.012

38. Stirzaker C, Zotenko E, Clark SJ. Genome-wide DNA methylation profiling in triple-negative breast cancer reveals epigenetic signatures with important clinical value. *Mol Cell Oncol*. 2016; 3(1):1-3. doi:10.1080/23723556.2015.1038424
39. Salta S, Nunes SP, Fontes-Sousa M, Lopes P, Freitas M, Caldas M, Antunes L, Castro F, Antunes P, Sousa SP, Henrique R, Jerónimo C. A DNA Methylation-Based Test for Breast Cancer Detection in Circulating Cell-Free DNA. *J Clin Med*. 2018 November 7; 7(11): 1-15. doi:10.3390/jcm7110420
40. Li Y, Melnikov AA, Levenson V, Guerra E, Simeone P, Alberti S, Deng Y. A seven-gene CpG-island methylation panel predicts breast cancer progression. *BMC Cancer*. 2015; 15(1): 1-12. doi:10.1186/s12885-015-1412-9
41. Connolly R, Stearns V. Epigenetics as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2012 December; 17(3-4): 191–204. doi:10.1007/s10911-012-9263-3
42. Huang Y, Nayak S, Jankowitz R, Davidson NE, Oesterreich S. Epigenetics in breast cancer: What's new?. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(225): 1-11. doi:10.1186/bcr2925
43. Hervouet E, Cartron PF, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. *Epigenetics*. 2013 March; 8(3): 237-245. doi:10.4161/epi.23790
44. Al-Khanbashi M, Al-Moundhri M. Micro-ribonucleic acid and carcinogenesis: Breast cancer as an example. *Oncol Rev*. 2015; 9(1):28-34. doi:10.4081/oncol.2015.279
45. Weidle UH, Dickopf S, Hintermair C, Kollmorgen G, Birzele F, Brinkmann U. The role of micro RNAs in breast cancer metastasis: Preclinical validation and potential therapeutic targets. *Cancer Genomics Proteomics*. 2018; 15(1):17-39. doi:10.21873/cgp.20062
46. Lai J, Wang H, Pan Z, Su F. A novel six-microRNA-based model to improve prognosis prediction of breast cancer. *Aging (Albany NY)*. 2019 January 30; 11(2):649-662. doi:10.18632/aging.101767
47. Vijayaraghavalu S, Dermawan JK, Venugopalan C, Labhasetwar V. Highly synergistic effect of sequential treatment with epigenetic and anticancer drugs to overcome drug resistance in breast cancer cells is mediated via activation of p21 gene expression leading to G2/M cycle arrest. *Mol Pharm*. 2013 January 7; 10(1): 337–352. doi:10.1021/mp3004622.
48. Su Y, Hopfinger NR, Nguyen TD, Pogash TJ, Santucci-Pereira J, Russo J. Epigenetic reprogramming of epithelial mesenchymal transition in triple negative breast cancer cells with DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018; 38(1):1-18. doi:10.1186/s13046-018-0988-8