



ARTIGO DE REVISÃO

BIOMARCADORES DE METILAÇÃO DE DNA EM BIÓPSIAS LÍQUIDAS NO CÂNCER DE MAMA: REVISÃO INTEGRATIVA

DNA METHYLATION BIOMARKERS IN LIQUID BIOPSIES IN BREAST CANCER: INTEGRATIVE REVIEW

Gisele Aparecida Siqueira¹, Graciele Domitila Tenani²

¹ Discente do Curso de Biomedicina, Faculdade UNITERP – FACTERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

² Doutora em Ciências da Saúde, Faculdade UNITERP – FACTERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Autor Correspondente: Graciele Domitila Tenani

R. Gen. Glicério, 3330, Centro, São José do Rio Preto - SP, CEP: 15015-400

E-mail: gracieletenani@uniterp.com.br

RESUMO

Introdução: O diagnóstico precoce é fundamental para o prognóstico de tumores, especialmente nas neoplasias mamárias, uma das principais causas de mortalidade feminina. A metilação do DNA é uma alteração epigenética comum na carcinogênese. As biópsias líquidas visam detectar o ctDNA antes da progressão clínica. **Objetivo:** Demonstrar a viabilidade da aplicação clínica de biópsias líquidas utilizando biomarcadores de metilação de DNA livre de células circulantes (ccfDNA) no câncer de mama de localização primária. **Métodos:** Estudo de revisão integrativa. As bases de dados Pubmed/Medline e Scielo foram selecionadas, e a busca foi realizada utilizando os seguintes descritores e operadores booleanos “Breast cancer”, “DNA and “Methylation”, “Biomarkers” and “Methylation”, “Liquid biopsy” e “Epigenetics”. Foram incluídos artigos completos e originais publicados nos últimos cinco anos, englobando as informações necessárias sobre biomarcadores de metilação do DNA em biópsias líquidas no câncer de mama. Artigos com câncer de mama masculino, câncer de mama não humano e biópsias líquidas com fluidos não sanguíneos. **Resultados:** No total, 19 estudos foram identificados nas bases de dados eletrônicas, 14 foram excluídos e ao final do processo de seleção 5 estudos foram incluídos na síntese qualitativa. Os estudos revisados identificaram biomarcadores preditivos para diagnóstico precoce de neoplasias mamárias. Destacaram a importância de superar a limitação dos métodos convencionais, especialmente em mulheres jovens, devido ao tecido glandular denso. Análises baseadas no TCGA apresentaram resultados promissores, com sensibilidade e especificidade elevadas. Técnicas como PCR digital foram recomendadas por sua alta precisão diagnóstica. **Conclusão:** A identificação de biomarcadores e o uso de técnicas sensíveis, como a PCR digital, foram consideradas essenciais para o diagnóstico



precoce de neoplasias mamárias, especialmente em mulheres jovens, onde os métodos convencionais apresentam limitações.

Palavras-chave: Câncer de mama; DNA; Metilação; Biomarcadores; Biópsias líquidas; Epigenéticas.

ABSTRACT

Introduction: The prognosis of tumors is directly linked to early diagnosis, making it essential to explore new methods for early detection of breast neoplasms, one of the leading causes of female mortality. DNA methylation is a common epigenetic alteration in carcinogenesis. In this context, liquid biopsies target the detection of circulating tumor DNA (ctDNA) before clinical progression.

Objective: To demonstrate the feasibility of the clinical application of liquid biopsies using circulating cell-free DNA methylation (ccfDNA) biomarkers in primary localization breast cancer.

Methods: An integrative review study. The PubMed/Medline and Scielo databases were selected, and the search was conducted using the following descriptors and Boolean operators: “Breast cancer,” “DNA” and “Methylation,” “Biomarkers” and “Methylation,” “Liquid biopsy,” and “Epigenetics.” Full and original articles published in the last five years were included, encompassing the necessary information on DNA methylation biomarkers in liquid biopsies for breast cancer. Articles focusing on male breast cancer, non-human breast cancer, and liquid biopsies with non-blood fluids were excluded. **Results:** A total of 19 studies were identified in the electronic databases, of which 14 were excluded, and 5 studies were included in the qualitative synthesis after the selection process. The reviewed studies identified predictive biomarkers for early diagnosis of breast neoplasms. They highlighted the importance of overcoming the limitations of conventional methods, especially in young women, due to dense glandular tissue. Analyses based on TCGA presented promising results, with high sensitivity and specificity. Techniques such as digital PCR were recommended for their high diagnostic accuracy. **Conclusion:** The identification of biomarkers and the use of sensitive techniques, such as digital PCR, were considered essential for the early diagnosis of breast neoplasms, particularly in young women where conventional methods have limitations.

Keywords: Breast cancer; DNA; Methylation; Biomarkers; Liquid biopsies; Epigenetics.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia maligna de maior incidência global entre as mulheres, por consequência, uma das principais causas de mortalidade feminina. Segundo dados apresentados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), só no Brasil foram registrados 66.280 novos casos de câncer de mama feminino de localização primária no ano de 2020.^{1,2}

O processo de carcinogênese tem origem multifatorial, mas geralmente inicia-se com uma mutação genética ou epigenética, que faz com que o ácido desoxirribonucleico (DNA) receba informações errôneas, induzindo as células a se multiplicarem desordenadamente, fazendo com que ocorra o surgimento de uma massa tumoral.^{1,3,4}



As alterações mais comuns nos processos epigenéticos de carcinogênese incluem, metilação do DNA, alterações nas histonas e remodelação da cromatina. As mudanças na pós-transcrição do ácido ribonucleico (RNA), também se apresentam como um processo de regulação da expressão gênica.^{1,3}

Os mecanismos epigenéticos são uma ocorrência natural do DNA, onde grupos químicos são adicionados ou removidos na sequência do mesmo, estando envolvidos na alteração dos genes e proteínas. A metilação é um aparato epigenético onde há a adição de um grupo metil ao quinto carbono de citosina, antecedido de uma guanina, conhecido como nucleotídeo CpG.^{1,4}

A metilação ocorre, sobretudo, em regiões do DNA denominadas promotoras, uma desregulação na metilação pode resultar no desenvolvimento de tumores, onde genes que deveriam estar reprimidos passam a ser expressos ocasionando proliferação celular, como os oncogenes.³⁻⁷

Os oncogenes por via de regra são proto-oncogenes, genes normais, responsáveis pelo crescimento e da proliferação celular. Quando estes genes sofrem uma alteração genética seja ela por translocação, inversões, deleção, ampliações ou mutações pontuais, passam a apresentar anomalias. Os proto-oncogenes mutados, passam a ser chamados de oncogenes, o qual, estão envolvidos no aumento da proliferação celular de forma exacerbada e a supressão da apoptose na tumorigênese. Deste modo, os genes mutados participam ativamente em eventos epigenéticos, se envolvendo nos processos de regulação celular negativamente, dando origem a neoplasias.⁸ Por outro lado, temos os genes supressores de tumores que podem ter sua atividade silenciada favorecendo a progressão tumoral. Neste contexto, podemos citar a hipometilação e hipermetilação.³⁻⁷

A hipometilação desregulada aumenta a expressão gênica propiciando multiplicação exacerbada das células, e em contrapartida a hipermetilação desregulada da região promotora causa diminuição da expressão gênica, decorrendo no silenciamento de determinados genes.³⁻⁷

Apesar do câncer de mama apresentar caráter multifatorial, a história familiar da doença é um importante fator epidemiológico de risco em alguns casos. Cerca de 5% a 10% dos casos de câncer de mama estão correlacionados às mutações genéticas. Estudos revelaram que os genes supressores de tumor conhecidos com *Breast Cancer gene 1* e *Breast Cancer gene 2*, (BRCA1 e BRCA2) responsáveis pela regulação gênica, reparo do DNA e controle do ciclo celular, quando mutados, contribuem de forma eminente para desenvolvimento da neoplasia mamária.⁹

O prognóstico em tumores de modo geral, está diretamente relacionado com a precocidade do diagnóstico. Atualmente, o câncer de mama possui método de rastreamento bem estabelecido, através de exames de imagem como mamografia e ultrassonografia, entretanto, a sensibilidade dos exames



diminui de acordo com a densidade mamária da mulher. Logo, é imprescindível que novos métodos de investigação diagnóstica sejam explorados para detecção precoce de neoplasias mamárias, principalmente em mulheres jovens que apresentam predomínio de tecido glandular, dificultando a visualização de massas tumorais nos exames de rastreamento por imagem.^{1,6}

A biópsia líquida é um método que vem ganhando destaque nos últimos anos, essa técnica consiste na retirada de uma amostra de fluido corporal do paciente, onde o alvo é a detecção de DNA livre de células circulantes (ccfDNA), mais precisamente de DNA tumoral circulante (ctDNA) antes da progressão clínica.^{10,11}

Os fluidos corporais passíveis de utilização em biópsias líquidas são vários e incluem: urina, líquido cefalorraquidiano, medula óssea, escarros, saliva e sangue.^{10,11}

O ctDNA é liberado na corrente sanguínea como produto de apoptoses e necroses tumorais. Os perfis de metilação presentes nesses fragmentos do ctDNA auxiliam na diferenciação da neoplasia encontrada, bem como localização primária do tumor.¹²

O câncer de mama possui um método de rastreamento e diagnóstico bem estabelecido, a mamografia, e intervalos de idade são indicados para realização do exame.¹

O Ministério da Saúde recomenda a mamografia de rastreamento para mulheres na faixa etária de 50 a 69 anos de idade, assintomáticas, sem sinais ou sintomas característicos de nódulos mamários. Devido à composição mamária de tecido glandular denso a sensibilidade da mamografia é reduzida, não sendo, portanto, recomendado o rastreamento abaixo da idade indicada. Entretanto, o câncer não apresenta exclusividade etária, a necessidade de novos meios de diagnósticos é uma realidade indeclinável especialmente para mulheres jovens.^{1,2}

Por outra perspectiva, quando já identificadas lesões mamárias, as biópsias complementam o resultado e estratificam a neoplasia, proporcionando escolha do tratamento mais adequado de acordo com as características clínicas das pacientes. A problemática acerca disso é que as biópsias convencionais acabam sendo um método invasivo que podem ocasionar traumas físicos e psicológicos em mulheres expostas a este procedimento. As biópsias líquidas podem ser um desenlace a esta questão, por se tratar de apresentar coleta rápida, indolor e não invasiva.^{1,10,12}

MÉTODOS

Foi realizada uma revisão integrativa da literatura, a fim de obter dados sobre as biópsias líquidas a partir do sangue como fluido de interesse, por apresentar coleta descomplicada, onde a



paciente não precisa passar por procedimentos cirúrgicos invasivos com fim diagnóstico, como nas biópsias convencionais de exames anatomopatológicos e histológicos comumente utilizados, visando proporcionar as mulheres, especialmente mais jovens, um rastreamento indolor e menos traumático.

Foram utilizados os índices PubMed e Scielo. O levantamento de dados teve como base estudos internacionais, nos temas que abrangem metilação do DNA em câncer de mama. Foram utilizados os seguintes descritores: “*Breast cancer*”, “*DNA and methylation*”, “*biomarkers and methylation*”, “*liquid biopsy*” e “*epigenetics*”.

Quanto aos critérios de inclusão, foram considerados artigos publicados no período de até cinco anos, artigos originais com acesso ao texto completo, englobando as informações necessárias sobre biomarcadores de metilação do DNA em biópsias líquidas no câncer de mama. Como critérios de exclusão foram desconsiderados os artigos publicados fora do período estipulado, artigos que tratam sobre o câncer de mama masculino, câncer de mama não humano e biópsias líquidas com fluidos não sanguíneos.

RESULTADOS

O fluxograma abaixo representa toda a abordagem metodológica para elaboração do trabalho, desde a pesquisa pautada com as bases de dados escolhida, exclusões e seleções de acordo com critérios estabelecidos, resultando no número de artigos finais elegidos (Figura 1).

Na revisão foram selecionados cinco artigos, que realizaram ensaios utilizando-se o Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) e ensaios clínicos com pacientes já diagnosticadas com tumores a fim de selecionar e distinguir biomarcadores preditivos para a neoplasia mamária.

Inicialmente utilizando o processo de busca, certificando-se dos critérios de inclusão/exclusão, bem como os termos definidos; foram encontrados 19 artigos para avaliação de elegibilidade, sendo: PubMed (n=17) e Scielo (n=2). Posteriormente, 3 artigos foram excluídos por não termos conseguido acesso à íntegra e, 11 artigos foram excluídos por não se encaixarem com base nos critérios de exclusão. Conforme evidenciado pelo fluxograma, foram obtidos cinco artigos elegíveis ao final da revisão, os mesmos foram organizados em duas tabelas, a seguir, para facilitar o entendimento da relação dos estudos escolhidos.

A Tabela 1 apresenta os artigos do levantamento bibliográfico em ordem cronológica de publicação, autoria com títulos originais e suas respectivas revistas de publicação. A Tabela 2 tem

como finalidade explicitar os objetivos de cada trabalho, nela é possível analisar os biomarcadores alvos das pesquisas e suas analogias.

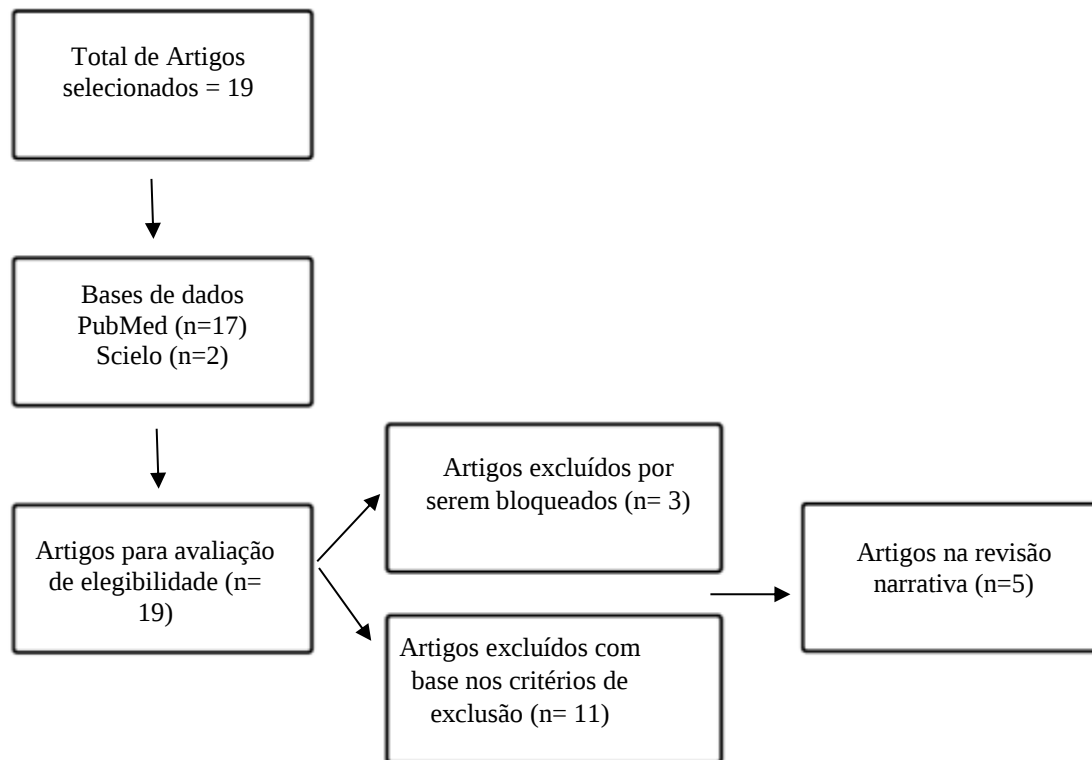


Figura 1. Fluxograma do processo de seleção dos estudos.

Adaptado do *Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA)*.

Tabela 1. Artigos elegíveis na revisão integrativa (n=5).

Ordem	Ano	Autor	Título	Revista
1	2019	Ding W. <i>et al</i>	Integrative analysis identifies potential DNA methylation biomarkers for pan-cancer diagnosis and prognosis. ¹⁵	<i>Epigenetics</i>
2	2019	Almeida BP. <i>et al</i>	Roadmap of DNA methylation in breast cancer identifies novel prognostic biomarker. ¹⁶	<i>BMC Cancer</i>
3	2020	Rahvar F. <i>et al</i>	Plasma GBP2 promoter methylation is associated with advanced stages in breast cancer. ¹⁷	<i>Genet Mol Biol</i>
4	2020	Zhang M. <i>et al</i>	Integrative Analysis of DNA Methylation and Gene Expression to Determine Specific Diagnostic Biomarkers and Prognostic Biomarkers of Breast Cancer. ¹⁹	<i>Frontiers</i>
5	2021	Huai J. <i>et al</i>	Evaluation of Liquid Biopsy in Patients with HER2-Positive Breast Cancer. ²⁰	<i>BioMed Research International</i>



Tabela 2. Objetivos dos artigos elegíveis na revisão integrativa (n=5).

Ordem	Objetivo
1	Rastrear locais CpG comparando amostras normais e amostras com tumores distintos, incluindo o câncer de mama, para biomarcadores preditivos.
2	Avaliar a imunohistoquímica HER2, ER, marcador de proliferação Ki-67 e RP, como fatores preditores para diagnóstico, prognósticos e terapêuticos na prática clínica do câncer de mama.
3	Analisar a proteína GBP2 como biomarcador associado ao câncer de mama, avaliando o status de metilação do promotor GBP2.
4	Analisar os perfis de metilação e identificar locais CpG com foco no diagnóstico específico, recorrendo a dados do Atlas do Genoma do Câncer.
5	Isolar e analisar CTCs, testando a expressão do HER2, RP, ER e a proteína Ki-67, para avaliação de biópsias líquidas.

Abreviações: CpG = dinucleotídeo citosina-fosfato-guanina; HER2= receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2; ER= receptor de estrogênio; RP= receptor de progesterona; GBP2= proteína de ligação ao guanilato 2; CTCs= células tumorais circulantes.

DISCUSSÃO

Os biomarcadores pesquisados e estudados pelos artigos englobaram análise de proteínas e genes. Nas análises de Ding W. *et al.*, 2019¹⁵, foram realizadas com dados do TCGA, e se baseou no rastreamento de locais CpG comparando amostras normais e amostras com tumores distintos, incluindo o câncer de mama. Os locais foram identificados com recursos do *software* XGBoost, que localizou 738 sondas significativas envolvendo 311 genes, devidamente enriquecidos no processo de regulação positiva. Sete sondas principais foram identificadas e validadas pela Curva Característica de Operação do Receptor (ROC), para uma representação gráfica do desempenho do sistema usado. No que se aplica ao câncer de mama o conjunto de dados de metilação de DNA (GSE69914) foi usado, disponível no *Gene Expression Omnibus* (GEO), que identificou a possibilidade de discriminação de amostras normais das amostras tumorais, concluindo que as sondas dos sete locais CpG podem ser biomarcadores para o diagnóstico de câncer incluindo o mamário. As sete principais sondas identificadas foram: cg10995381, cg27019093, cg04396850, cg25351606, cg02064267, cg20300343 e cg13974761.¹⁵

O estudo de Almeida BP. *et al.*, 2019¹⁶, realizou uma análise, colocando a avaliação de imunofluorescência e imunohistoquímica do receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), receptor de estrogênio (ER), marcador de proliferação Ki-67 e receptor de progesterona (RP), como fatores preditores para diagnóstico, prognósticos e terapêuticos na prática clínica do



câncer de mama. Foi realizada uma análise de bioinformática do perfil de metilação de DNA em todo o genoma em um painel de 780 amostras e tumores de mama e 83 amostras normais a partir do banco de dados disponíveis no TCGA. Sete novos genes relacionados o câncer de mama: WT1, BCL9, SMYD3, ZNF154, ZNF177, HOXD9 e ITIH5 e mais sete sem associação publicada com câncer: TMEM132C, TDRD10, RNF220, RIMBP2, PRAC2 (C17orf93), EFCAB1 e ANKRD53, três deles (TDRD10, PRAC2 e TMEM132C), continham locais de CpG que apresentavam valor diagnóstico e prognóstico no câncer de mama, uma análise pan-câncer, ou seja, uma análise de diferentes tipos de tumores, em um banco de dados de tumores primários, facilitada pelo compartilhamento de dados internacionais usando a computação em nuvem, para identificar padrões de mutação em mais de 2.600 genomas inteiros de câncer do *International Cancer Genome Consortium*, confirmou a expressão diferencial desses genes juntamente com o valor diagnóstico e prognóstico de seus respectivos locais de CpG.¹⁶

O estudo de Rahvar F. *et al.*, 2020¹⁷, teve como objetivo analisar a proteína de ligação ao guanilato 2 (GBP2) como biomarcador associado ao câncer de mama, avaliando o status de metilação do promotor GBP2, o estudo foi conduzido com amostras sanguíneas e de tecido. As amostras de tecido foram processadas a fim de se extrair o RNA e posterior síntese de DNA complementar (cDNA), já as amostras de plasma passaram pelo processo de extração de DNA, ambas foram analisadas por transcrição reversa seguida de reação em cadeia polimerase (RT- PCRs) em tempo real. Primers específicos foram adicionados as amostras de RNA para amplificação dos genes, um conjunto de primers experimentais (GBP2) e referência (beta-actina). Nas amostras de DNA o estado de metilação do gene foi determinado qualitativamente pela relação em cadeia polimerase específica para metilação (MS-PCR), com sequencias de primers projetados para uma ilha CpG da região promotora do gene GBP2. Dados dos estudos revelaram status de metilação em 88,1% no plasma e 86,9% de metilação nas amostras de tecido, que também foram utilizadas, e no grupo controle não foram encontradas metilações na região de estudo. O estudo afirma que a hipermetilação de sua região promotora reduz sua expressão, e que o mesmo pode ser considerado supressor tumoral, pois nas amostras positivas para câncer mamário os níveis de GBP2 estavam reduzidos. Os resultados revelam que a metilação no promotor GBP2 como um potencial marcador molecular não invasivo no câncer de mama.¹⁷

A proteína de ligação ao guanilato (GBP) pertence à família das hidrolases, ou seja, enzimas que realizam processo de catalisação de ligações covalentes em reação com água, até o momento



foram relatadas sete proteínas desta família em humanos (GBP 1-7). Sua relação com cânceres já foi apresentada em outro estudo como regulador de processos carcinogênicos.¹⁷

O estudo publicado na revista *Oncology Letter*, avaliou a relação da família das GBPs em melanomas e outras neoplasias e identificou relação destas proteínas com a autoimunidade. Além do melanoma, o câncer colorretal, carcinoma de células orais e câncer de mama também foram relatados com relação à expressão das GBPs. Relacionado ao câncer de mama a alta expressão da GBP2 estava relacionada com sobrevida favorável, o que se corrobora diretamente ao estudo de Rahvar F. *et al.*, 2020¹⁷, que identificou que as amostra positivas para câncer de mama continha uma redução na expressão da proteína.^{17,18}

O estudo de Zhang M. *et al.*, 2020¹⁹, promoveu uma análise de perfis de metilação e identificação de locais CpG com foco no diagnóstico específico, recorrendo a dados do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA, sigla em inglês). Os testes empregados foram Wilcoxon para validação e qui-quadrado de Pearson para locais metilados. Os resultados mostraram 2.362 locais metilados e 2.322 hipometilados no câncer de mama, um fluxo de trabalho foi projetado para encontrar os biomarcadores preditivos, e pôr fim a validação cruzada para alcançar os locais, obtendo-se sete mais representativos com uma sensibilidade de 94,2% e especificidade de 95,25%, sendo eles: cg20383521 (TUFT1), cg09804858 (TRERF1), cg06741896 (CCND1), cg01668352 (SRGAP1), cg10708955 (PER1), cg06998282 (ENPP2), cg04658021 (PER1).¹⁹

Os perfis de metilação encontrados no estudo obtiveram uma taxa de sensibilidade e especificidade superior a outros biomarcadores relatados nos dados do genoma e dados de expressão gênica do câncer de mama, sugerindo elegibilidade dos mesmos para diagnóstico em biopsias líquidas, uma vez que os marcadores ideais devem apresentar sensibilidade alta. Entretanto, o estudo não utilizou amostras biológicas em seus ensaios, baseando-se somente em dados fornecidos pelo TCGA, sendo aconselháveis estudos futuros desenvolvidos a partir de amostras com fluídos sanguíneos para validação dos resultados encontrados.¹⁹

O receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) mais uma vez foi avaliado, no estudo de Huai J. *et al.*, 2021²⁰, o estudo coletou sangue periférico de pacientes (HER2), isolando e analisando as CTCs, testando a expressão do receptor de progesterona (RP), receptor de estrogênio (ER), receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e a proteína Ki-67, para avaliação de biópsias líquidas e aplicabilidade clínica para tratamento orientando. O conteúdo de CTCs foi analisado pelo método de imunofluorescência Cytte®l, para hibridização in situ (FISH)



e imunohistoquímica. Os resultados revelaram que a proteína HER2 foi expressa principalmente na membrana celular do câncer de mama, estatisticamente considerados significantes. A taxa global de detecção de CTC foi de 78,8%. A expressão de ER, PR e Ki-67 em CTCs, 62,0%, apresentaram ER positivos, 47,5%, RP positivo a taxa de Ki-67 positiva foi superior a 50%. O status de metilação em tempo real na detecção destas expressões foi bem dinâmica.²⁰

O estudo de Huai J. *et al.*, 2021²⁰ propõe detecção dinâmica em tempo real também do status de metilação, com base nos receptores alvos do estudo, para fornecer orientações e tratamento personalizado e individualizado no acompanhamento de câncer de mama, uma vez que as biópsias líquidas são pouco traumáticas e convenientes para o monitoramento dinâmico em tempo real, devido à complexidade etiológica e constante mudança ano estado tumoral.²⁰

Os estudos de Huai J. *et al.*, 2021²⁰ e Almeida BP. *et al.*, 2019¹⁶ tiveram como alvo os mesmos receptores, diferenciando-se no método de análise, sendo o estudo de Huai J. *et al.*, 2021²⁰, um estudo com material biológico e o estudo de Almeida BP, *et al.*, 2019¹⁶, uma análise de bioinformática. Entretanto ambos com mesmo objetivo com enfoque em biópsias líquidas.^{16,20}

CONCLUSÃO

Os estudos apresentaram-se semelhantes quanto a seus objetivos no que se diz respeito à identificação de biomarcadores preditivos para diagnóstico, acompanhamento e terapêutica de neoplasias mamárias. Ambos pactuam sobre a importância de um diagnóstico precoce, antes mesmo da massa tumoral apresentar desenvolvimento significativo para diagnóstico em métodos convencionais utilizados atualmente, como ultrassonografia e mamografia.¹⁵⁻²⁰

A dificuldade de visualização de achados radiográficos em mulheres jovens, devido ao tecido glandular denso é um levantamento questionado em todos os artigos revisados, colocando a necessidade de implementações diagnósticas para o público jovem com sensibilidade e especificidade confiáveis. Por outro lado, a desconformidade dos estudos, em métodos e resultados obtidos, substantia a necessidade de estudos prospectivos, pois muitos ainda utilizaram análises de bioinformática com base do TCGA, implicando na validação destes resultados, sendo sugerível estudo com fluidos biológicos, ou seja, estudos clínicos randomizados controlados, com a população para obtenção evidências clínicas fidedignas e padronização de técnicas, como a PCR digital, considerada como padrão-ouro para detecção de ctDNA, devido sua sensibilidade.^{15-17,19,20}



Os estudos que se basearam em dados do TCGA demonstraram resultados bem estratificados, entretanto, já mencionados em outras bibliografias. O estudo de Rahvar F. *et al.*, 2020¹⁷ revelou o status de metilação do promotor GBP2 com metilação em 88,1% e os marcadores de Zhang M. *et al.*, 2020¹⁹ sensibilidade de 94,2% e especificidade de 95,25%, apresentando os maiores valor percentuais de especificidade e sensibilidade, podendo indicar um direcionamento para novos estudos.^{17,19}

FINANCIAMENTOS

Esta pesquisa não recebeu nenhum subsídio específico de agências de financiamento dos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores deste artigo declaram que não possuem conflito de interesse de ordem financeiro, pessoal, político, acadêmico ou comercial.

REFERÊNCIAS

1. Schumann ALP. Aspectos epigenéticos do câncer de mama: revisão bibliográfica dos mecanismos envolvidos na carcinogênese mamária e biomarcadores para a sua detecção precoce [dissertação]. UniCEUB, Brasília, 2020.
2. Instituto Nacional de Câncer [homepage na internet]. Estatísticas de câncer [acesso maio 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/>.
3. Uddin MB, Wang Z, Yang C. The m⁶A RNA methylation regulates oncogenic signaling pathways driving cell malignant transformation and carcinogenesis. *Mol Cancer*. 2021 Apr 4; 20 (1):61. doi: 10.1186/s12943-021-01356-0.
4. Silva GAS, Castro NS, Figueiredo RO. Mecanismos epigenéticos e a ação da expressão da proteína BRCA na carcinogênese mamária. *Braz J. of Develop*. 2020 Oct 10; 6: 82596-82613. doi:10.34117/bjdv6n10-623.
5. Cao YN, Li QZ, Lui YX, Jin W, Hour R. Discovering the key genes and important DNA methylation regions in breast cancer. *Hereditas*. 2022 Jan 7; 159. doi:10.1186/s41065-022-00220-5.
6. Zhang W, Wang H, Qi Y, Li S, Geng C. Epigenetic study of early breast cancer (EBC) based on DNA methylation and gene integration analysis. *Sci Rep*. 2022 Feb 7; 1989. doi.org/10.1038/s41598-022-05486-3.
7. Martisova A, Holcakova J, Izadi N, Sebuyoya R, Hrstka R, Bartosik M. DNA Methylation in Solid Tumors: Functions and Methods of Detection. *Int. J. Mol. Sci*. 2021 Apr; 22(8):4247. doi.org/10.3390/ijms22084247.
8. Brown G. Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2021 Set 7; 22(18):9667. doi: 10.3390/ijms22189667.
9. Coelho AS, Santos MAS, Caetano RI, Piovesan CF, Fiuza La, Machado RLD, *et al.* Predisposição hereditária ao câncer de mama e sua relação com os genes BRCA1 e BRCA2: revisão da literatura. *RBAC*. 2018 Abr 50(1): 17-21. doi: 10.21877/2448-3877.201800615.



10. Tay TKY, Tan PH. Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Focused Review. *Arch Pathol LabMed*. 2021 June 145 (6): 678–686. doi.org/10.5858/arpa.2019-0559-RA.
11. Hirahata T, UlQuraish R, Quraish AU, UlQuraish S, Naz M, Razzaq MA. Liquid Biopsy: A Distinctive Approach to the Diagnosis and Prognosis of Cancer. *Cancer Informatics*. 2022 Feb 21;11769351221076062. doi:10.1177/11769351221076062.
12. Xu Z, Sandler DP, Taylor JA. Blood DNA Methylation and Breast Cancer: A Prospective Case-Cohort Analysis in the Sister Study. *J Natl Cancer Inst*. 2020 Jan 112(1): 87-94. doi:10.1093/jnci/djz065.
13. Constâncio V, Nunes SP, Henrique R, Jerónimo C. DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types. *Cells*. 2020 Mar 5; 9(3):624. doi.org/10.3390/cells9030624.
14. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*. 2020 Jul 84; 106535. doi.org/10.1016/J.INTIMP.2020.106535.
15. Ding W, Chen G, Shi T. Integrative analysis identifies potential DNA methylation biomarkers for pan-cancer diagnosis and prognosis. *Epigenetics*. 2019 Jan;14(1):67-80. doi: 10.1080/15592294.2019.1568178.
16. Almeida BP, Apolónio JD, Binnie A, Castelo-Branco P. Roadmap of DNA methylation in breast cancer identifies novel prognostic biomarkers. *BMC Cancer*. 2019 Mar 12; 19(1):219. doi: 10.1186/s12885-019-5403-0.
17. Rahvar F, Salimi M, Mozdarani H. Plasma GBP2 promoter methylation is associated with advanced stages in breast cancer. *Genet Mol Biol*. 2020 Nov 17; 43(4):e20190230. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0230.
18. Wang Q, Wang X, Liang Q, et al. Distinct prognostic value of mRNA expression of guanylate-binding protein genes in skin cutaneous melanoma. *Oncol Lett*. 2018; 15(5):7914-7922. doi:10.3892/ol.2018.8306.
19. Zhang M, Wang Y, Wang Y, Jiang L, Li X, Gao H, Wei M, Zhao L. Integrative Analysis of DNA Methylation and Gene Expression to Determine Specific Diagnostic Biomarkers and Prognostic Biomarkers of Breast Cancer. *Front CellDev Biol*. 2020 Dec7; 8:529386. doi: 10.3389/fcell.2020.529386.
20. Huai J, Cao M, Jiang Y, Yang X, Zhu Y, Si Y, Xu M, Shen C, Han T, Lian X. Evaluation of Liquid Biopsy in Patients with HER2-Positive Breast Cancer. *Biomed Res Int*. 2021 Dec 3; 2021:6388492. doi: 10.1155/2021/6388492.