



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

BRUNA LAGO DOS REIS

**A METILAÇÃO DO DNA NO CÂNCER DE PULMÃO DE
CÉLULAS NÃO PEQUENAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

SALVADOR – BA

2022

BRUNA LAGO DOS REIS

**A METILAÇÃO DO DNA NO CÂNCER DE PULMÃO DE
CÉLULAS NÃO PEQUENAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Thessika Hialla Almeida
Araújo

SALVADOR – BA

2022

BRUNA LAGO DOS REIS

**A METILAÇÃO DO DNA NO CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO
PEQUENAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovado em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 01 de junho de 2022.



Prof^ª. Dr^ª. Thessika Hialla Almeida Araújo Escola
Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof^ª. Dr^ª. Cinthia Vila Nova Santana Escola
Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Dr^ª. Taisa Manuela Bonfim Machado Lopes
Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1. Artigo científico	
• Introdução.....	8
• Métodos.....	9
• Resultados.....	10
• Discussão.....	16
• Conclusão.....	20
• Referências.....	20
2. Proposta de submissão	
• Normas para publicação.....	24

1. Artigo Científico

A METILAÇÃO DO DNA NO CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Bruna Lago dos Reis¹, Thessika Hialla Almeida Araújo¹.

¹Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil.

***Autor correspondente:** Thessika Hialla Almeida Araújo, biomédica, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Rua Silveira Martins, 100, Cabula, Salvador, Bahia, Brasil.
Telefone para contato: 71 3257-8200. E-mail para contato:
thessikaaraujo@bahiana.edu.br

RESUMO

O câncer de pulmão é um dos mais frequentes e com mais alta taxa de mortalidade, sendo o de células não pequenas o de maior incidência. O baixo índice de sobrevivência dos indivíduos acometidos se deve principalmente ao fato de ser uma doença silenciosa, implicando na sua descoberta tardia. A metilação do DNA é estudada como fator integrante do processo neoplásico, surgindo, então, a possibilidade de ser utilizada como biomarcador capaz de auxiliar na investigação e acompanhamento dessa patologia.

Objetivo: revisar sistematicamente a literatura a fim de avaliar a utilização da metilação do DNA no câncer de pulmão de células não pequenas na prática clínica. **Método:** realizada busca de artigos nas bases de dados PubMed, SciELO e LILACS para elaboração de revisão sistemática seguindo o protocolo PRISMA. **Resultados:** foram selecionados 18 artigos que investigaram e sugeriram a utilização da metilação do DNA de variados genes como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, relacionando os achados às características clínico-patológicas das amostras. **Conclusão:** a metilação do DNA apresenta possível utilização na prática clínica para pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas que deve ser mais amplamente estudada para aplicação definitiva.

Palavras-chave: metilação do DNA, câncer de pulmão de células não pequenas, biomarcadores, epigenética.

ABSTRACT

Lung cancer is one of the most frequent and has the highest mortality rate, with non-small cell cancer having the highest incidence. The low survival rate of affected individuals is mainly due to the fact that it is a silent disease, implying its late discovery. DNA methylation is studied as an integral factor in the neoplastic process, thus giving rise to the possibility of being used as a biomarker capable of assisting in the investigation and monitoring of this pathology. **Objective:** to systematically review the literature in order to evaluate the use of DNA methylation in non-small cell lung cancer in clinical practice. **Method:** articles were searched out in the PubMed, SciELO and LILACS databases to prepare a systematic review following the PRISMA protocol. **Results:** 18 articles were selected that investigated and suggested the use of DNA methylation of various genes as diagnostic and prognostic biomarkers, relating the findings to the clinical-pathological characteristics of the samples. **Conclusion:** DNA methylation presents a possible use in clinical practice for patients with non-small cell lung cancer that should be more widely studied for definitive application.

Key words: DNA methylation, non-small cell lung cancer, biomarkers, epigenetics

INTRODUÇÃO

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de pulmão é o segundo processo neoplásico que mais acomete indivíduos por ano, tendo representado em 2020 cerca de 11,4% de todos os casos¹. Com uma alta taxa de mortalidade, esse tipo de câncer ocupa o primeiro lugar em números de morte advindas da doença em homens e segunda causa nas mulheres, atrás apenas do câncer de mama^{2,3}.

O câncer de pulmão pode ser dividido entre o de células pequenas (CPPC) e células não-pequenas (CPCNP), sendo o último responsável por cerca de 85% das ocorrências¹. O CPPC representa apenas 15% dos casos de câncer e acredita-se que se origine de células neuroendócrinas⁴. Esse tipo de câncer se diferencia do CPCNP pelo fato de crescer e se espalhar mais rápido e com maiores chances de metástase, além de estar mais comumente associado ao uso do cigarro⁵. O CPCNP possui diferentes subtipos, entre eles os adenocarcinomas, originados de células secretoras e mais frequente em ex-fumantes e não fumantes, carcinomas de células escamosas, que recebe o nome da sua origem, e carcinoma de grandes células, que se assemelha ao CPPC por ter avanço rápido⁶. Dentre esses subtipos, os adenocarcinomas (AC), e os carcinomas de células escamosas são os mais comuns (CPCE)⁷.

A maioria dos casos dessa patologia é diagnosticada apenas nos estágios mais avançados da doença, o que torna o prognóstico desfavorável. O diagnóstico é realizado através de exames de imagem como radiografia e PET-CT, broncoscopia e biópsia, que é um procedimento cirúrgico para retirada de fragmentos do tecido tumoral. Devido a isso, descobrir um diagnóstico preciso, precoce e menos invasivo representaria um grande auxílio no processo do câncer de pulmão⁸. Nesse quesito, está sendo estudado cada vez mais o grande potencial da epigenética para auxiliar em diferentes aspectos do processo dessa doença.

A epigenética é uma área da ciência que estuda as mudanças reversíveis no DNA, que não alteram sua sequência. As marcas epigenéticas funcionam fornecendo às células um sistema de sinalização dinâmico que atua na regulação da expressão dos genes e ajuste da replicação e reparo do DNA^{9,10}. A modificação desregulada do DNA pelas alterações epigenéticas podem ter resultados patológicos, como o câncer¹¹.

Os três principais mecanismos epigenéticos são a modificação de histonas, regulação por RNA não codificante e metilação do DNA. A metilação do DNA nas ilhas CpG é o mecanismo epigenético mais bem caracterizado de um fenômeno crítico na manutenção da integridade genética e regulação das transcrições. A maioria dessas ilhas está metilada naturalmente, mas as alterações anormais nessa metilação estão associadas ao silenciamento de genes supressores de tumor e outros genes relacionados ao câncer, pois elas impedem o acesso da maquinaria de transcrição ao promotor, impossibilitando a expressão normal dos genes¹².

As alterações epigenéticas apresentam a possibilidade de serem utilizadas como biomarcadores no câncer, por serem indicadores biológicos capazes de serem mensurados, inclusive em diferentes amostras, tanto de fluidos corporais quanto de tecidos¹³. Entretanto, até o momento, um número muito pequeno de biomarcadores baseados em epigenética está disponível para uso comercial, sendo apenas um deles para o câncer de pulmão¹⁴. Entender e estudar de que formas esse processo pode ser aplicado para investigação do processo patológico, sua gravidade ou resposta a tratamentos é

essencial para apresentar definitivamente a sua aplicação como uma alternativa ou análise complementar aos atuais procedimentos padrão para análise do câncer. Diante o exposto, esse trabalho de revisão sistemática visa avaliar o processo de metilação nos principais tipos de câncer de pulmão de células não pequenas, considerando a prática clínica.

MÉTODOS

O trabalho foi realizado seguindo as etapas do formato de revisão sistemática. Para a construção da pergunta central do trabalho foi aplicada a metodologia PICO, tendo como pergunta “Como a metilação do DNA participa como biomarcador no câncer de pulmão de células não pequenas?”. O processo de condução do estudo teve como base o *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA)¹⁵, cumprindo os itens estabelecidos pelo protocolo.

Foi realizada uma pesquisa nas bases de dados PubMed, Biblioteca Eletrônica Científica Online (SciELO) e Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), onde foram analisados artigos nas línguas inglesa e portuguesa. Como estratégia de busca, foram aplicados nas ferramentas os termos identificados através de Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) *dna methylation*, *non-small cell lung cancer*, e *biomarkers*, juntamente aos operadores booleanos “AND”, “OR” e “NOT”, resultando na estratégia de busca “non-small cell lung carcinoma” OR “non-small cell lung cancer” AND “dna methylation” AND “biomarkers” NOT review. Para delimitar a seleção, foram aplicados os limites “humans” e “in-the-last-5-years”

A partir da triagem inicial com a leitura dos títulos e resumos, consideramos como critérios de inclusão os artigos de estudos observacionais de caso-controle, coorte, corte transversal e experimentais de ensaios clínicos, realizados em humanos, no período de 2017 a 2022 (5 anos), que possuíssem relação com a metilação do DNA no câncer de pulmão de células não pequenas. Nos critérios de exclusão foram desconsiderados artigos de revisão sistemática, os que não realizassem uma observação individual da metilação do DNA e sua aplicação como biomarcador, aqueles que não fosse possível obter acesso ao texto completo, artigos duplicados nas diferentes bases de dados e com alto risco de viés.

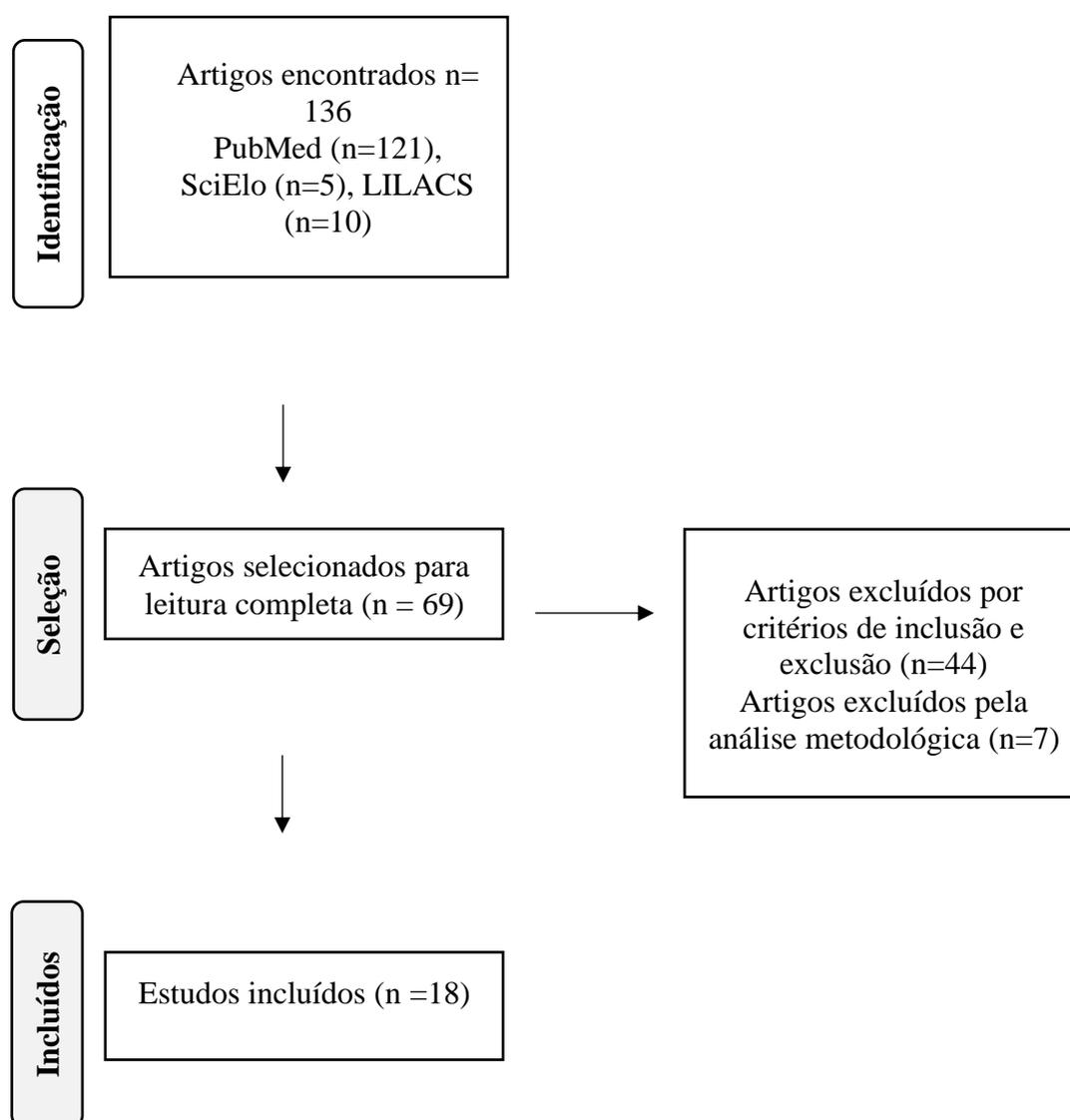
Após a realização dessa seleção, foi feita a leitura completa dos textos e foram incluídos apenas aqueles que estudassem a metilação do DNA como biomarcador, realizassem análises com diferentes tipos de CPCNP e possuíssem informações relacionadas às características da população incluída.

A análise dos artigos selecionados resultou na extração das informações de interesse em relação autoria, ano e local de publicação, amostragem do estudo, métodos utilizados, características da população, objetivos e desfecho. A análise de qualidade metodológica dos estudos foi realizada através do método do Instituto Joanna Briggs (JBI), seguindo para cada artigo a *checklist* designada para cada desenho de estudo. Os trabalhos foram classificados como: baixo risco de viés (acima de 70% de respostas positivas), moderado risco de viés (entre 70 e 50%) e alto risco de viés (menos de 50%), sendo os últimos excluídos.

RESULTADOS

Na pesquisa inicial, foi encontrado um total de 136 estudos relacionados ao tema proposto, sendo 121 da base PubMed, 10 da base LILACS e 5 do Scielo. A partir da análise do título e resumo, foram selecionados 69 artigos para a leitura completa. Aplicando os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos, 25 estudos foram elegíveis (incluídos) nesta revisão sistemática. Após a análise metodológica realizada com base nos critérios do Instituto Joanna Briggs, 15 estudos foram considerados como tendo baixo risco de viés, 3 receberam a classificação de médio risco e 7 foram excluídos por demonstrarem alto risco de viés. Essa seleção está representada no fluxograma do PRISMA.

Fluxograma do PRISMA com os passos para a seleção dos artigos



Dos 18 artigos incluídos, todos eram estudos observacionais (coortes n=12, caso-controle n=3, corte-transversal n=3). Os estudos analisados realizaram diferentes

investigações quanto à metilação do DNA no câncer e sua possível aplicação. Dentre eles, 55,5% verificaram a metilação como biomarcador diagnóstico^{16, 18, 19, 20, 22, 24, 25, 26-28}, e a mesma porcentagem investigou sua aplicação como fator prognóstico^{17, 18, 19, 23, 25-27, 31-33}, destacando o estudo de Jae-Won Cho et al³³, que observou mais especificamente a metilação como um biomarcador de progressão da doença em relação a resposta a tratamento com anti-PD-1. A tabela 1 mostra as características dos estudos incluídos.

Os estudos avaliados utilizaram diferentes tipos de amostras, como tecidos tumorais, presentes em 66,7% (12/18) dos artigos avaliados, os fluidos corporais, em 16,7% (3/18) e em ambos (tecidos e fluidos) em 16,67% (3/18) dos artigos. Dentre as amostras de fluidos, 33,33% dos estudos analisavam plasma (6/18); 11,11% escarro (2/18) e 5,55% de urina (1/18). Além disso, informações de bases de dado para validação e identificação de genes para estudo foram utilizadas por 61,11% (11/18), entre elas: Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) em 44,4% (8/18); *Gene Expression Omnibus* (GEO), *Genomic Data Commons* (GDC), *Cancer Genomics Browser* e *MethHC* em 5,55% (1/18) cada uma (tabela 1).

Uma grande variedade de genes está associada ao desenvolvimento do câncer de pulmão de células não pequenas. Os genes onde a metilação foi avaliada com mais frequência foram o *HOXA7*^{16, 19, 20}, presente em 16,7% (3/18) dos artigos, seguido por *SOX17*, *TAC1*, *CDO1*, *ZFP42*, *HOXA9*^{16, 20}, presentes em 11,11% (2/18) dos artigos, assim como o *PRKCB*^{19, 25}, com a mesma porcentagem. O *LINE1*, que é um elemento transponível, também foi visto com maior frequência, em 11,11% dos artigos (2/18). Em 15 artigos, o local de investigação da metilação ocorreu na região promotora dos genes, sendo que em um desses, além da região promotora, foram utilizadas também sondas CpG no gene inteiro e na região não codificante 3'UTR¹⁷, enquanto outro analisou também os acentuadores além dos promotores³³. Apenas os artigos de Ruochuan Zang et al²⁸ e Andrea Imperatori et al³² não especificaram a região analisada (tabela 1).

Dentro dos estudos, 50% (9/18) dos artigos investigaram se a análise conjunta da metilação de diferentes genes e outros fatores poderia ampliar a capacidade de atuação deles, e 8 estudos encontraram que essa associação gerou resultados superiores. No trabalho de Alicia Hulber et al¹⁶, a junção dos genes que tiveram a melhor performance no plasma (*CDO1*, *TAC1* e *SOX17*) e no escarro (*TAC1*, *HOXA7* e *SOX17*) mostraram resultados melhores em relação a sua análise individual. De maneira análoga, o estudo de Bin Liu et al²⁰ observou que quando pelos três genes estavam metilados simultaneamente no plasma e na urina, a habilidade preditiva foi melhor tanto para diagnóstico quanto para análise de risco (*CDO1*, *TAC1* e *SOX17*). Lukas Vrba et al¹⁹ e Shunlin Liu et al²⁵ também investigaram em seus estudos a aplicação de um painel de diferentes genes, e o primeiro observou que grupos de 5 dos 10 genes incluídos possuíam melhor capacidade diagnóstica em relação aos genes individuais, mesmo resultado observado pelo segundo realizando a análise em conjunto dos genes *SFRP1*, *SFRP2*, *PRKCB* e *WIF1*. Ruochuan Zang et al²⁸ estudou os níveis de *IDH1* junto da metilação dos genes *SHOX2* e *PTGER4* e obteve sensibilidade, especificidade e acurácia maiores em relação a análise desses parâmetros de forma independente. Dois desses artigos encontraram resultados positivos com a junção de dois genes, tendo R. F. H. Walter et al³⁰ visto grande capacidade diagnóstica na análise da metilação de *LINE1* e *RARB* ou *LINE1* e *RASSF1*, enquanto Jae-Won Cho et al³³ obteve bons resultados da associação entre *CYTIP* e *TNFSF8*. De modo diferente, Sipeng Shen et al³¹ encontrou resultados superiores com a integração da análise

da metilação com a expressão do gene investigação e as características clínicas dos pacientes.

Dentre os tipos de tumor, 100% dos artigos possuíam pacientes com um dos dois principais tipos: adenocarcinoma (AC) e carcinoma de células escamosas (CPCE). Um total de 27,77% (5/18) dos estudos continham outros tipos de câncer de pulmão de células não pequenas, sendo eles: 11,11% adenoescamoso (2/18), 5,55% (1/18) carcinoma de grandes células, 5,55% (1/18) com uma amostra indiferenciada e 11,11% (2/18) com os outros tipos não especificados (tabela 1). Baseando-se nessas informações, 72,22% (13/18) dos estudos fizeram a relação do tipo histológico com a metilação encontrada no gene de interesse. Dessa investigação, apenas 27,78% (5/18) encontraram diferenças entre os tipos, sendo que em apenas três deles esses resultados se mostraram significativos. Shuye Lin et al²⁴ observou que o gene *MUC22* apresentou níveis moderados e elevados de metilação nos tecidos de CPCE, mas, de forma contrária, foi vista a hipometilação nos tecidos de AC ($P < 0.001$). Ruochuan Zang et al²⁸ encontrou no seu estudo que a análise do painel de biomarcadores mostrou melhor habilidade diagnóstica em cânceres que não eram CPCE em relação a análise individual de *PTGER4* ($p = 0.0034$) e *IDH1* ($p < 0.0001$). No trabalho de R. F. H. Walter et al³⁰, os níveis de metilação nos genes observados conseguiram separar os subtipos do câncer de pulmão entre si, exceto o CPCE, com uma taxa de falha de 51%.

Considerando as principais características clínicas, em 44,44% (8/18) deles havia amostras de pacientes de todos os quatro estágios do câncer, em 16,66% (3/18) havia amostras de apenas os três primeiros estágios, sendo eles Yao Dong et al²², Showkat A. Malik et al²⁴ e Shuya Lin et al²⁵. No artigo de Alicia Hulber et al¹⁶, foram vistos apenas os estágios I e II. Apenas o estudo de Sipeng Shen et al³² utilizou pacientes exclusivamente no estágio I. Os estudos de Jing LI et al²³, Ruochuan Zang et al²⁹ e Jae-Won Cho et al³³ não forneceram essa informação, representando 16,67% (3/18) do total. Tendo em vista esses dados, 61,11% (11/18)^{16-21, 23, 25, 28, 29, 31} dos estudos relacionou a metilação com o estágio, e apenas 16,67% (3/18)^{19, 20, 28} encontraram resultados significativos. Lukas Vrba et al¹⁹ observou que em estágios mais avançados, o nível de metilação encontrado era mais alto ($p=0.02$). De forma similar, Bin Liu et al²⁰ observou no gene *HOXA7*, em amostras de plasma e urina, porcentagens de metilação mais altas nos estágios III e IV, em comparação a I e II ($p < 0.05$) e a análise individual de genes teve também sensibilidade maior em estágios mais tardios no plasma (65% a 100%) e sensibilidade e especificidade maiores na urina (63% a 96%). Ruochuan Zang et al²⁸ encontrou que em estágios mais avançados, a metilação de *SHOX2* e *PTGER4* possuía habilidade discriminatória melhor que o nível de *IDH1* ($p < 0.0001$).

Levando em conta o sexo dos pacientes, 77,7% (14/18)^{16-24, 26, 27, 29-31} fizeram análises para relacionar a metilação entre homens e mulheres, mas nenhum deles encontrou significância. Considerando as idades dos pacientes dos estudos, 72,22% (13/18)^{16-23, 26, 27, 29-31} deles tentaram estabelecer relação entre a idade e a metilação, sendo que os únicos a encontrar diferença significativa foram os artigos de R. F. H. Walter et al³⁰, que descobriu uma correlação inversa entre os níveis de metilação no gene *RASSF1* e a idade ($p = 0.0015$) e Wen-Bin Liu et al²⁹, que observou frequência de metilação maior nos tecidos em pacientes mais velhos ($p < 0.05$), mas essas observações não impactaram os seus potenciais de utilização. Em relação ao uso do cigarro, 66,66% (12/18) dos artigos correlacionaram esse aspecto com a metilação observada, tendo três deles observado diferenças significativas^{21, 23, 32}. Yao Dong et al²¹ percebeu níveis maiores de metilação

no *FBPI* nos tecidos de fumantes ($p < 0.001$). Showkat A. Malik et al²³, de modo similar, também observou maior frequência de hipermetilação em fumantes em relação a não fumantes nos genes *LATS1* ($p = 0.013$) e *LATS2* ($p = 0.005$). Enquanto isso, Andrea Imperatori et al³² encontrou a hipometilação do *LINE1* exclusivamente em fumantes com CPCNP ($p = 0.003$).

Outras características observadas incluíam: etnia, que foi observada por Bin Liu et al²⁰, mas sem resultados com significância estatística; tamanho do tumor, considerada significativa por Showkat A. Malik et al²³, com a hipermetilação do *LATS2* sendo mais frequente em tumores maiores ($p = 0.038$); a utilização de terapia adjuvante pelos pacientes, onde Sipeng Shen et al³¹ observou que a análise integrada da metilação teve resultados melhores naqueles que receberam terapia adjuvante ($p = 0.006$); e presença de metástase linfonodal, avaliada por Showkat A. Malik et al²³, onde a hipermetilação do *LATS2* estava relacionada a presença de metástase ($p = 0.011$), Lin Ye et al²⁶, que observou que a presença da metilação se relacionava a presença da metástase ($p = 0.0345$) e R. F. H. Walter et al²⁰, não tendo este último encontrado uma relação com significância.

Tabela 1. Autor, ano, local de publicação, tipo de amostra, população, tipos histológicos de CPCNP incluídos, métodos de análise da metilação do DNA e objetivo

Referências	Amostra	População	Tipo histológico	Métodos	Objetivo
Alicia Hulber et al ¹⁶ Estados Unidos (2017)	Plasma, escarro e tecidos	n= 210 Homens= 63 doentes e 33 controles Mulheres= 87 doentes e 27 controles Idade média casos= 68 Idade média controles= 63	AC n= 121 CPCE n= 26 Adenoescamoso n= 3	<i>Methylation on beads (MOB)</i> otimizado PCR quantitativa metilação-específica (qMSP)	Metilação da região promotora de <i>SOX17</i> , <i>TAC1</i> , <i>HOXA7</i> , <i>CDO1</i> , <i>ZFP42</i> e <i>HOXA9</i>
Sofia Mastoraki et al ¹⁷ Grecia (2020)	Tecidos, plasma, TCGA	n= 139 Homens n= 34* Mulheres n= 6* Idade média n= 61	AC n= 28* CPCE n= 19* Indiferencia do n= 1*	<i>EZ DNA Methylation Gold Kit</i> PCR metilação-específica (MSP) otimizado	Metilação na região promotora do <i>KMT2C</i>
Federico Pio Fabrizio et al ¹⁸ Italia (2020)	Tecidos FFPE, TCGA	n= 59 Homens n= 50 Mulheres n= 9 Idade média = 67,7 ± 8,4	AC n= 34 CPCE n= 25	<i>Epitect Bisulfite Kit</i> qMSP	Metilação na região promotora do <i>SPARC</i>
Lukas Vrba et al ¹⁹ Estados Unidos (2019)	Plasma, GEO	n= 65 Homens= 6 doentes e 16 controles Mulheres= 12 doentes e 31 controles	AC n= 15 CPCE n= 3	<i>EZ DNA Methylation Gold Kit</i> qPCR	Metilação da região promotora de um grupo de 10 marcadores

Bin Liu et al ²⁰ Estados Unidos (2020)	Plasma e urina	Idade média casos= 70 Idade média controles= 48 n=101 Homens= 34 doentes e 18 controles Mulheres= 40 doentes e 9 controles Idade média = 64	AC n= 65 CPCE n= 9	MOB otimizado qMSP	Metilação na região promotora de <i>SOX17</i> , <i>TAC1</i> , <i>HOXA7</i> , <i>CDO1</i> , <i>ZFP42</i> e <i>HOXA9</i>
Yao Dong et al ²¹ China (2018)	Tecidos	n= 107 Homens n= 90 Mulheres n= 17 Idade média = 59,6±8,3	AC n= 37 CPCE n= 70	Conversão com bissulfito Pirosequenciamento	Metilação na região promotora do <i>FBP1</i>
Jing LI et al ²² China (2022)	Tecidos, TCGA	n= 44 Homens n=21 Mulheres n=23 Idade média = 62,91±9,05	AC n= 32 CPCE n=12	<i>EZ DNA Methylation Gold Kit</i> qMSP	Metilação na região promotora de <i>PRKCDP</i>
Showkat A. Malik et al ²³ India (2017)	Tecidos, TCGA	n= 69 Homens n= 43 Mulheres n=26 Idade = 57,80 ± 10,97	AC e outros n=26 CPCE n= 43	<i>EZ DNA Methylation Gold Kit</i> MSP	Metilação na região promotora de <i>LATS1</i> e <i>LATS2</i>
Shuye Lin et al ²⁴ China (2021)	Tecidos	n= 48 Homens n=33 Mulheres n= 15 Idade = 60,38±12,19	AC n= 24 CPCE n= 24	<i>EZ DNA Methylation Kit</i> qMSP	Metilação na região promotora de <i>MUC22</i>
Shunlin Liu et al ²⁵ China (2019)	Tecidos FPPE, TCGA, Cancer Genomics Browser	n= 111 Homens n= 73 Mulheres n= 38 Idade= 63,59 ± 10,19	AC n= 69 CPCE n= 42	<i>EZ DNA Methylation Gold Kit</i> qMSP	Metilação na região promotora de <i>SFRP1</i> , <i>SFRP2</i> , <i>WIF1</i> e <i>PRKCB</i>
Lin Ye et al ²⁶ China (2018)	Tecidos, MethHC	n= 54 Homens n= 53 Mulheres n=11 Idade média= 50-74 anos	AC n= 24 CPCE n= 27 Adenoescamoso n= 3	<i>EZ DNA Methylation gold Kit</i> MSP	Metilação na região promotora de <i>IFR8</i>

Maria Villalba et al ²⁷ Espanha (2019)	Tecidos, TGCA	n= 444 Homens n= 254 Mulheres n= 190 Idade= 65	AC n= 322 CPCE n= 122	<i>EZ-96 DNA Methylation-Lightning Kit</i> Pirosequenciamento	Metilação na região promotora de <i>TMPRSS4</i> e <i>DDR1</i>
Ruochuan Zang et al ²⁸ China (2019)	Plasma	n= 221 Homens n=102 Mulheres n=119 ≤ 60 anos n=164 >60 n= 57	AC n=112 CPCE n= 19	<i>Plasma Preparation Kit</i> qPCR ELISA	Metilação de <i>SHOX2</i> , <i>PTGR4</i> e níveis de <i>IDH1</i>
Wen-Bin Liu et al ²⁹ China (2018)	Tecidos, plasma, escarro, TCGA	n= 155 [†] Homens n= 38 Mulheres n= 13 > 60 anos n= 18 <60 anos n= 33	AC n= 22 CPCE n= 24 Outros n= 5	<i>EZ DNA Methylation Gold Kit</i> MSP	Metilação na região promotora de <i>TMEM196</i>
R. F. H. Walter et al ³⁰ Estados Unidos (2018)	Tecidos FFPE TCGA	n= 138 Mulheres n= 64 [‡] Homens n= 47 [‡] Idade = 61,9	AC n= 23 CPCE n= 15 Células grandes n= 19	<i>EpiTect Bisulfite Kit</i> Pirosequenciamento	Metilação na região promotora em <i>APC</i> , <i>CDH1</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>EFEMP1</i> , <i>FHIT</i> , <i>LINE1</i> , <i>MGMT</i> , <i>PTEN</i> , <i>RARB</i> e <i>RASSF1</i>
Sipeng Shen et al ³¹ Estados Unidos (2018)	Tecidos, GDC	n= 1230 Homens n= 678 Mulheres n= 552 Idade = 66,47	AC n = 824 CPCE n = 406	<i>Infinium Human Methylation 450 BeadChip</i>	Metilação da região promotora, corpo do gene e 3'UTR de <i>BTG2</i>
Andrea Imperatori et al ³² Italia (2017)	Tecidos FFPE	n= 167 Homens n= 15 Mulheres n= 32 Idade média= 66	AC n= 100 CPCE n= 67	<i>EZ DNA Methylation Gold Kit</i> Pirosequenciamento	Metilação de <i>LINE1</i>
Jae-Won Cho et al ³³ Coreia (2020)	Tecidos frescos e FFPE	n= 74 Homens n= 45 Mulheres n= 20 Idade média= 64 e 65 [§]	AC n= 48 CPCE n= 26	<i>EZ DNA Methylation Kit</i> <i>EZ DNA Methylation Lightning Kit</i> Pirosequenciamento	Metilação de acentuadores de <i>MHC-II</i> e promotores de <i>CYTIP</i> e <i>TNFSF8</i>

*Informações clínicas não estavam disponíveis para todos os pacientes

[†]Apenas 51 tinham as características dos pacientes disponíveis

[‡]Informação baseada apenas nos pacientes com câncer

[§]Amostras foram divididas em dois grupos

DISCUSSÃO

Como método diagnóstico, a metilação do DNA já vem sendo investigada há anos e seus resultados foram reportados nos artigos avaliados nesta revisão. Dois estudos investigaram a aplicação do mesmo painel de genes como um método de biópsia líquida: o primeiro avaliando em amostras de plasma e escarro¹⁶ e o segundo no plasma e na urina²⁰. As observações feitas por eles foram similares, sendo descoberto que a combinação de três genes com melhores resultados individuais, gerava resultados superiores tanto no plasma (*CDOI*, *TAC1* e *SOX17*), com sensibilidade de 93%, especificidade de 62%, quanto no escarro (*CDOI*, *HOXA7* e *SOX17*), com sensibilidade de 98%, especificidade de 71%¹⁶. De forma similar, a junção de três genes dentre *CDOI*, *TAC1*, *HOXA9* e *SOX17* que estivessem positivamente metilados no plasma e na urina, possuíam sensibilidade de 73% e especificidade 92%²⁰. Esses resultados afirmam observações já realizadas anteriormente, onde o *CDOI*^{34, 35}, gene codificador do aminoácido cisteína que funciona mantendo a integridade de proteínas³⁶, *TAC1*³⁵, que age na codificação de peptídeos que atuam em respostas inflamatórias³⁷, e *SOX17*³⁸, que codifica fatores de transcrição responsáveis por crescimento celular³⁹, foram identificados como metilados anormalmente no câncer de pulmão, demonstrando seu potencial de aplicação como biomarcador diagnóstico.

O gene *HOXA9*, que já foi evidenciado como tendo participação na proliferação e diferenciação celular no câncer⁴⁰, apesar de incluído por ambos os estudos e apresentar a metilação alterada no plasma^{16, 20}, urina²⁰ e escarro¹⁶, a sua análise nas amostras de escarro não obteve resultado diagnóstico satisfatório quando analisado individualmente, o que já havia sido observado anteriormente⁴¹, sugerindo que mesmo estando hipermetilado no epitélio pulmonar, essa diferença no escarro não é tão específica para detecção do câncer de pulmão. Esses dois estudos se aproximam em outro aspecto, pois ambos utilizaram o método MOB de forma otimizada, que permite uma análise mais sensível da metilação do DNA se comparado a métodos de PCR, por diminuir a perda de amostras, probabilidade de contaminação ou erro analítico⁴². Apesar disso, os autores apontam a necessidade de estudos maiores para validar seus resultados.

Também foram realizados estudos considerando mais de um gene por Lukas Vrba et al¹⁹ e Shunlin Liu et al²⁵, onde o trabalho do primeiro grupo testou um grupo com 10 diferentes marcadores metilados no plasma, e descobriu que a combinação de 5 deles de forma variada apresentou resultados melhores que os genes individuais. Porém, devido a quantidade de amostras ser relativamente pequena, não foi possível definir o grupo de 5 marcadores final, estabelecendo a necessidade de mais estudos para sua validação.

A junção de *SFRP1*, *SFRP2*, *WIFI* e *PRKCB*²⁴ mostrou bom potencial, com sensibilidade de 70,3% e especificidade de 73,9%, afirmando resultados anteriores utilizando esses genes de forma individual^{43, 44, 45} e demonstrando como essa capacidade pode ser potencializada ao se analisar mais de um gene simultaneamente. Apesar do gene *PRKCB*, que participa na indução de apoptose e proliferação celular, ter sido também um dos genes incluídos no painel de Lukas Vrba et al¹⁹, no trabalho de Shin Liu et al²⁵ foram utilizadas apenas amostras de tecidos tumorais, sendo necessária realização dessa investigação em amostras de fluidos para validar a sua função como biópsia líquida. Isso também foi observado no gene *SPARC*¹⁸, com a metilação em tecidos tendo apresentado sensibilidade de 61%, especificidade de 100%, deixando a necessidade de comparar esses resultados com amostras de fluidos.

No painel de genes usando amostras de tecidos, a combinação de *LINE1* com *RASSF1* ou *RARB* apresentou grande potencial como biomarcador diagnóstico, com sensibilidade e especificidade chegando até 91% e 100% respectivamente³⁰. Nesse estudo foi utilizada árvore de classificação e regressão (CART) para tentar diferenciar os subtipos do câncer, onde o *RASSF1* individualmente mostrou boa capacidade para discriminar entre CPCNP e CPPC, mas não entre AC e CPCE, e *LINE1* teve capacidade melhor para diferenciar entre AC e não doentes, mostrando menor habilidade em diferenciar CPCE dos outros tipos. Vale ressaltar que, apesar de terem sido vistas essas diferenças entre os tipos^{28,30}, elas não impediram os genes estudados de diferenciar entre CPCNP e pacientes não doentes.

A investigação do *MUC22*²⁴ descreveu resultados diferentes dos demais, onde foi observado que a metilação deste se encontrava em níveis maiores no AC, mas não no CPCE ($p < 0.001$), o que fornece a esse biomarcador capacidade de ser utilizado como diagnóstico diferencial entre os tipos de câncer de pulmão de células não pequenas²⁴. Esse gene faz parte do grupo das mucinas, que já vinham tendo sua regulação epigenética descrita como fator relacionado ao processo neoplásico^{46, 47, 48}, reafirmando o potencial de utilização desse gene.

A combinação da metilação com outros fatores, como a expressão do gene, também foi testada. O *SHOX2* e *PTGER4*, genes já descritos como biomarcadores do câncer de pulmão e sendo os únicos utilizados na prática clínica¹⁴, foram analisados junto aos níveis de expressão *IDH1* no plasma, mostrando que a combinação dos três parâmetros apresentou capacidade diagnóstica superior em relação à avaliação individual desses genes, sensibilidade de 80% e especificidade de 87,5%²⁸.

O gene *PRKCDBP* resultou em sensibilidade e especificidade de 59,9% e 77,2%, respectivamente, quando avaliado no âmbito do diagnóstico²². Embora tenha observado diferença nos níveis entre os sexos, com as mulheres obtendo especificidade levemente elevada, esse aspecto não representou significância no resultado. O mesmo ocorreu analisando a metilação no gene *TMEM196*, não apenas em amostras de tecidos, mas também plasma e escarro, onde foi vista uma tendência a níveis de metilação maiores em mulheres, mas sem que isso interferisse no potencial diagnóstico²⁹. Apesar de nenhum artigo presente nessa revisão ter apontado o sexo como sendo significativo, há estudo realizados anteriormente que descrevem relação entre esses fatores tanto no câncer de pulmão^{49, 50} quanto em outros cânceres^{51, 52, 53}.

O *RASSF1* já foi descrito como tendo níveis de metilação mais elevados no sexo masculino, o que não foi observado por R. F. H. Walter et al³⁰ nesta revisão. Entretanto, o primeiro estudo apresenta proporção entre amostras de homens de mulheres menos equilibrada, tornando-se interessante investigar a fundo, com amostras mais semelhantes entre si, a possível relação entre a metilação nos genes com o sexo, para concluir se eles podem ser aplicados como um biomarcador.

Para além de métodos diagnósticos, a metilação do DNA também é muito investigada como possível fator prognóstico em diferentes cânceres^{13, 45, 54, 55, 56}. Alguns dos artigos apresentaram potencial dos genes estudados como biomarcadores com aplicação tanto diagnóstica quanto prognóstica^{18, 25}, sendo que apenas um deles encontrou potencial prognóstico, com a metilação no gene *SPARC*¹⁸ sendo associada a maior risco de mortalidade (Razão de Risco (HR)= 1.46; 95% CI: 1.07–2.00; $p = 0.018$). *LINE1*, que já havia sido aplicado como biomarcador diagnóstico em um painel genético por outro

estudo³⁰, foi investigado individualmente como prognóstico³², encontrando que níveis mais baixos de metilação se relacionavam a pior progressão da doença (HR=1.98 1.09–3.58 0.025).

Além disso, vale salientar que esse estudo descobriu uma relação entre o hábito de fumar e o nível de metilação de *LINE1*, onde as amostras consideradas hipometiladas (metilação <58%) eram exclusivamente de pacientes fumantes. Essa associação foi vista ainda por mais dois estudos, que encontraram aumento na metilação em amostras de fumantes no *FBP1* ($p < 0.001$)²¹, *LATS1* ($p = 0.0013$)²³ e *LATS2* ($p = 0.0011$)²⁴. O uso do cigarro é um dos fatores mais bem relacionados ao surgimento do câncer de pulmão⁵⁷, e já foi observado como elemento capaz alterar a metilação do DNA em células do pulmão^{58, 59}, tornando necessário que pesquisas sobre o assunto deem atenção a esse aspecto, utilizando número satisfatório de amostras que sejam semelhantes entre si e comparando especificamente se o hábito de fumar pode influenciar nos resultados.

O gene *IFR8*²⁶, concordando com estudos realizados previamente⁶⁰, mostrou também relação entre seu status de metilação do DNA e menor chance de sobrevivência dos pacientes ($p = 0.02705$), além de trazer o diferencial de mostrar associação entre a metilação do *IFR8* e a presença de metástase linfonodal ($p = 0.034525$), tornando-se alvo interessante para realização de pesquisas acerca da sua utilização como um biomarcador na descoberta de metástases ocultas. O *KMT2C*¹⁷ também apresentou resultados que apontam potencial divergente dos demais, pois, tendo separado os pacientes em grupos de tumores operáveis e inoperáveis, foi observada a habilidade dos níveis elevados de metilação de atuarem como fator de previsão de sobrevida livre de progressão (HR:0.431, 95% CI: 0.239–0.779, $p = 0.005$) e sobrevida geral (HR: 0.306, 95% CI: 0.173–0.541, $p < 0.001$), em amostras de plasma em pacientes inoperáveis, o que não havia sido observado em nenhum estudo anteriormente, e deve ser investigado mais a fundo para confirmação dos resultados.

Foi testada a associação entre o *TMPRSS4* e o *DDR1*, que havia sido descrito como possível ator no processo neoplásico^{61, 62}, onde o resultado não foi significativo, mostrando que a hipometilação *DDR1* individualmente é superior como biomarcador prognóstico em relação a sobrevida livre de doença ($p = 0.016$)²⁷. De forma distinta, a metilação do DNA do *BTG2*³¹ associada ao nível de expressão desse gene e as características dos pacientes demonstraram melhor habilidade como biomarcador prognóstico (HR = 2.80, 95% CI 1.96–4.28) se comparado à metilação individualmente, agregando valor a estudos já realizados com o *BTG2* isolado^{63, 64}. Curiosamente, diferente dos demais artigos, esses resultados encontrados não foram vistos analisando a região promotora do gene, e sim outras regiões e na região 3'UTR. Também foram analisadas outras regiões nos genes *MHC-II*, *CYTIP* e *TNSFS8*³³, mas diferentemente do *BTG2*³¹, apenas a metilação na região promotora foi identificada como possível biomarcador.

A maioria dos estudos sobre biomarcadores foca na região promotora do gene, que é onde ocorre a metilação com mais frequência, entretanto, já foram observados resultados com valor clínico em outras regiões que são menos exploradas, como os acetuadores e éxons, em que sua metilação participa de processos relacionados ao surgimento de doenças⁶⁵, sendo assim interessante que pesquisas sejam realizadas considerando esse aspecto. A metilação da região promotora de *CYTIP* e *TNSFS8* mostrou não apenas potencial em prever os pacientes que responderiam ao tratamento com anti-PD-1, com valor preditivo positivo (VPP) de 70% e valor preditivo negativo

(VPN) de 69%, mas também em prever a progressão da doença, com a hipometilação de ambos estando relacionada a maior chance de sobrevida livre de progressão ($p=0.0044$) e sobrevida geral ($p=0.0043$). A utilização da metilação relacionada a resposta ao anti-PD-1 já vem sendo investigada em outros cânceres^{66,67}, mas há a necessidade de avaliar esses genes descobertos para o *CPCNP* com maior número de amostras e métodos mais específicos, como o qMSP ou pirosequenciamento, para validar esses resultados.

Fatores como etnia e país de origem, apesar de não terem sido considerados pelos estudos, já foram descritos como agentes que podem influenciar na metilação do DNA^{68,69,70} tanto através da hereditariedade quanto da exposição ao ambiente. Com isso em mente, estudos que visem investigar a metilação do DNA como biomarcador no *CPCNP* poderiam encontrar resultados ainda mais significativos através de estudos multicêntricos que incluíssem em suas pesquisas diferentes grupos étnicos e variados países de origem, para ter a capacidade de afirmar se o seu resultado pode ser aplicado de forma mais abrangente para a população geral, ou se possui aplicação melhor em grupos populacionais específicos.

A idade, apesar de considerada pelos estudos, não se apresentou como um fator de interferência nos seus resultados, possivelmente devido ao fato das amostras serem mais equivalentes entre si nesse aspecto, de forma que todos os estudos apontam a idade média perto dos 60 a 70 anos. Essa característica é coerente com o fato de que a maioria dos casos de câncer de pulmão é diagnosticado nessa idade⁷¹. Entretanto, é vantajoso realizar a análise da metilação nas variadas faixas etárias em subgrupos e comparando seus resultados, pois a confirmação de que o biomarcador utilizado é capaz de diferenciar entre doentes e não doentes, independentemente da idade, reafirma o seu valor clínico.

Isso vale também para os outros fatores que possam interferir na metilação, como sexo^{51,52,53,54,55} e uso do cigarro^{57,58,59}, demonstrando a necessidade de que pesquisas nessa área sejam realizadas com grande quantidade de amostras mais pareadas possíveis, permitindo a análise relacionando a metilação e esses subgrupos específicos de modo a garantir a validade do resultado obtido de forma ampla e definitiva. Junto a isso, mesmo a metilação do DNA analisada individualmente ter mostrado seu potencial clínico, foi visto que a investigação conjunta da metilação em diferentes genes ou sendo associada com outros fatores como a expressão do gene, permite incrementar o seu poder de utilização como biomarcador, apontando uma vantagem em direcionar pesquisas para criação de painéis genéticos e integrar alterações na metilação com outros aspectos para chegar ao melhor resultado possível. Esta revisão, como todo estudo científico, não esteve livre de limitações, considerando que não foi realizada por pares.

CONCLUSÃO

A metilação do DNA apresenta potencial como biomarcador no câncer de pulmão de células não pequenas, principalmente quando analisada em grupos de genes ou integrada a outros fatores genéticos, mas ainda são necessários estudos mais abrangentes e bem delimitados para validar os achados e definir biomarcadores precisos e eficazes que possam ser utilizados de forma abrangente na prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. Suster DI, Mino-Kenudson M. Molecular Pathology of Primary Non-small Cell Lung Cancer. *Arch Med Res*. 2020 Nov;51(8):784-798.
2. Nasim F, Sabath BF, Eapen GA. Lung Cancer. *Med Clin North Am*. 2019 May;103(3):463-473.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249.
4. Park KS, Liang MC, Raiser DM, Zamponi R, Roach RR, Curtis SJ, Walton Z, Schaffer BE, Roake CM, Zmoos AF, Kriegel C, Wong KK, Sage J, Kim CF. Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell Cycle*. 2011 Aug 15;10(16):2806-15.
5. What is lung cancer?: Types of lung cancer [Internet]. American Cancer Society. [cited 2022 Apr 18]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/what-is.html>
6. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Dec;1856(2):189-210.
7. Parkin M, Tyczynski JE, Boffetta P, Samet J, Shields P, Caporaso N. Lung cancer epidemiology and etiology. In: Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK. *World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon: IARC Publications; 2005. p. 12–15.
8. Goebel C, Loudon CL, McKenna R Jr, Onugha O, Wachtel A, Long T. Diagnosis of Non-small Cell Lung Cancer for Early-Stage Asymptomatic Patients. *Cancer Genomics Proteomics*. 2019 Jul-Aug;16(4):229-244.
9. Biswas S, Rao CM. Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. *Pharmacol Ther*. 2017 May; 173:118-134.
10. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004 Feb;4(2):143-53.
11. Vieira G. Admirável mundo novo: a epigenética. In: Araújo L. *Evolução Biológica: da pesquisa ao ensino*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Editora Fi; 2017. p. 177–85.
12. Feng L, Lou J. DNA Methylation Analysis. *Methods Mol Biol*. 2019; 1894:181-227.
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.
14. Weiss G, Schlegel A, Kottwitz D, König T, Tetzner R. Validation of the SHOX2/PTGER4 DNA Methylation Marker Panel for Plasma-Based Discrimination between Patients with Malignant and Nonmalignant Lung Disease. *J Thorac Oncol*. 2017 Jan;12(1):77-84.
15. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, Shamseer L, Tetzlaff JM, Akl EA, Brennan SE, Chou R, Glanville J, Grimshaw

- JM, Hróbjartsson A, Lalu MM, Li T, Loder EW, Mayo-Wilson E, McDonald S, McGuinness LA, Stewart LA, Thomas J, Tricco AC, Welch VA, Whiting P, Moher D. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021 Mar 29;372:n71.
16. Hulbert A, Jusue-Torres I, Stark A, Chen C, Rodgers K, Lee B, Griffin C, Yang A, Huang P, Wrangle J, Belinsky SA, Wang TH, Yang SC, Baylin SB, Brock MV, Herman JG. Early Detection of Lung Cancer Using DNA Promoter Hypermethylation in Plasma and Sputum. *Clin Cancer Res*. 2017 Apr 15;23(8):1998-2005.
 17. Mastoraki S, Balgkouranidou I, Tsaroucha E, Klinakis A, Georgoulas V, Lianidou E. KMT2C promoter methylation in plasma-circulating tumor DNA is a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Mol Oncol*. 2021 Sep;15(9):2412-2422.
 18. Fabrizio FP, Sparaneo A, Fontana A, Mazza T, Graziano P, Pantalone A, Parente P, Centra F, Orlando N, Trombetta D, Torre A, Ferretti GM, Turchini M, Micco CMD, Maiello E, Fazio VM, Rossi A, Muscarella LA. Potential Prognostic Role of *SPARC* Methylation in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cells*. 2020 Jun 22;9(6):1523.
 19. Vrba L, Oshiro MM, Kim SS, Garland LL, Placencia C, Mahadevan D, Nelson MA, Futscher BW. DNA methylation biomarkers discovered *in silico* detect cancer in liquid biopsies from non-small cell lung cancer patients. *Epigenetics*. 2020 Apr;15(4):419-430.
 20. Liu B, Ricarte Filho J, Mallisetty A, Villani C, Kottorou A, Rodgers K, Chen C, Ito T, Holmes K, Gastala N, Valyi-Nagy K, David O, Gaba RC, Ascoli C, Pasquinelli M, Feldman LE, Massad MG, Wang TH, Jusue-Torres I, Benedetti E, Winn RA, Brock MV, Herman JG, Hulbert A. Detection of Promoter DNA Methylation in Urine and Plasma Aids the Detection of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2020 Aug 15;26(16):4339-4348.
 21. Dong Y, Huaying S, Danying W, Chihong Z, Ruibin J, Xiaojiang S, Jianguo F. Significance of Methylation of FBP1 Gene in Non-Small Cell Lung Cancer. *Biomed Res Int*. 2018 Jun 10; 2018:3726091.
 22. Li J, Qi L, Zhang M, Yao C, Feng J, Zheng Z, Chen C, Duan S, Qi Y. PRKCDBP Methylation is a Potential and Promising Candidate Biomarker for Non-small Cell Lung Cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2022 Feb 20;25(2):78-85.
 23. Malik SA, Khan MS, Dar M, Hussain MU, Shah MA, Shafi SM, Mudassar S. Molecular Alterations and Expression Dynamics of LATS1 and LATS2 Genes in Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2018 Apr;24(2):207-214.
 24. Lin S, Tian C, Li J, Liu B, Ma T, Chen K, Gong W, Wang JM, Huang J. Differential *MUC22* expression by epigenetic alterations in human lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 2021 May;45(5):78.
 25. Liu S, Chen X, Chen R, Wang J, Zhu G, Jiang J, Wang H, Duan S, Huang J. Diagnostic role of Wnt pathway gene promoter methylation in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017 May 30;8(22):36354-36367.
 26. Ye L, Xiang T, Zhu J, Li D, Shao Q, Peng W, Tang J, Li L, Ren G. Interferon Consensus Sequence-Binding Protein 8, a Tumor Suppressor, Suppresses Tumor Growth and Invasion of Non-Small Cell Lung Cancer by Interacting with the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(2):961-978

27. Villalba M, Redin E, Exposito F, Pajares MJ, Sainz C, Hervas D, Guruceaga E, Diaz-Lagares A, Cirauqui C, Redrado M, Valencia K, de Andrea C, Jantus-Lewintre E, Camps C, Lopez-Lopez R, Lahoz A, Montuenga L, Pio R, Sandoval J, Calvo A. Identification of a novel synthetic lethal vulnerability in non-small cell lung cancer by co-targeting TMPRSS4 and DDR1. *Sci Rep*. 2019 Oct 28;9(1):15400.
28. Zang R, Wang X, Jin R, Lei Y, Huang J, Liu C, Zheng S, Zhou F, Wu Q, Sun N, Gao S, He J. Translational value of IDH1 and DNA methylation biomarkers in diagnosing lung cancers: a novel diagnostic panel of stage and histology-specificity. *J Transl Med*. 2019 Dec 30;17(1):430.
29. Liu WB, Han F, Huang YS, Chen HQ, Chen JP, Wang DD, Jiang X, Yin L, Cao J, Liu JY. TMEM196 hypermethylation as a novel diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer. *Mol Carcinog*. 2019 Apr;58(4):474-487.
30. Walter RFH, Rozynek P, Casjens S, Werner R, Mairinger FD, Speel EJM, Zur Hausen A, Meier S, Wohlschlaeger J, Theegarten D, Behrens T, Schmid KW, Brüning T, Johnen G. Methylation of L1RE1, RARB, and RASSF1 function as possible biomarkers for the differential diagnosis of lung cancer. *PLoS One*. 2018 May 31;13(5):e0195716.
31. Shen S, Zhang R, Guo Y, Loehrer E, Wei Y, Zhu Y, Yuan Q, Moran S, Fleischer T, Bjaanaes MM, Karlsson A, Planck M, Staaf J, Helland Å, Esteller M, Su L, Chen F, Christiani DC. A multi-omic study reveals BTG2 as a reliable prognostic marker for early-stage non-small cell lung cancer. *Mol Oncol*. 2018 Jun;12(6):913-924.
32. Imperatori A, Sahnane N, Rotolo N, Franzi F, Nardecchia E, Libera L, Romualdi C, Cattoni M, Sessa F, Dominioni L, Furlan D. LINE-1 hypomethylation is associated to specific clinico-pathological features in Stage I non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2017 Jun; 108:83-89.
33. Cho JW, Hong MH, Ha SJ, Kim YJ, Cho BC, Lee I, Kim HR. Genome-wide identification of differentially methylated promoters and enhancers associated with response to anti-PD-1 therapy in non-small cell lung cancer. *Exp Mol Med*. 2020 Sep;52(9):1550-1563.
34. Yin W, Wang X, Li Y, Wang B, Song M, Hulbert A, Chen C, Yu F. Promoter hypermethylation of cysteine dioxygenase type 1 in patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2020 Jul;20(1):967-973.
35. Wrangle J, Machida EO, Danilova L, Hulbert A, Franco N, Zhang W, Glöckner SC, Tessema M, Van Neste L, Easwaran H, Schuebel KE, Licchesi J, Hooker CM, Ahuja N, Amano J, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG, Brock MV. Functional identification of cancer-specific methylation of CDO1, HOXA9, and TAC1 for the diagnosis of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2014 Apr 1;20(7):1856-64.
36. Brait M, Ling S, Nagpal JK, Chang X, Park HL, Lee J, Okamura J, Yamashita K, Sidransky D, Kim MS. Cysteine dioxygenase 1 is a tumor suppressor gene silenced by promoter methylation in multiple human cancers. *PLoS One*. 2012;7(9):e44951.
37. Kang HS, Trzaska KA, Corcoran K, Chang VT, Rameshwar P. Neurokinin receptors: relevance to the emerging immune system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2004 Sep-Oct;52(5):338-47.

38. Yin D, Jia Y, Yu Y, Brock MV, Herman JG, Han C, Su X, Liu Y, Guo M. SOX17 methylation inhibits its antagonism of Wnt signaling pathway in lung cancer. *Discov Med*. 2012 Jul;14(74):33-40.
39. Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N, Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, Iwama A. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood*. 2013 Jan 17;121(3):447-58.
40. Zhou C, Li J, Li Q, Liu H, Ye D, Wu Z, Shen Z, Deng H. The clinical significance of HOXA9 promoter hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Lab Anal*. 2019 Jun;33(5):e22873.
41. Hwang SH, Kim KU, Kim JE, Kim HH, Lee MK, Lee CH, Lee SY, Oh T, An S. Detection of HOXA9 gene methylation in tumor tissues and induced sputum samples from primary lung cancer patients. *Clin Chem Lab Med*. 2011 Apr;49(4):699-704.
42. Guzzetta AA, Pisanic Ii TR, Sharma P, Yi JM, Stark A, Wang TH, Ahuja N. The promise of methylation on beads for cancer detection and treatment. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014 Sep;14(7):845-52.
43. Yu J, Xie Y, Li M, Zhou F, Zhong Z, Liu Y, Wang F, Qi J. Association between SFRP promoter hypermethylation and different types of cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncol Lett*. 2019 Oct;18(4):3481-3492.
44. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, Mikami I, Reguart N, Rosell R, McCormick F, Jablons DM. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res*. 2004 Jul 15;64(14):4717-20.
45. Li J, Huang KL, Zhang T, Li H, Zhao J, Wang H. Pan-cancer methylation and expression profiling of adenocarcinomas revealed epigenetic silencing in the WNT signaling pathway. *Neoplasma*. 2016;63(2):208-14.
46. Yamada N, Kitamoto S, Yokoyama S, Hamada T, Goto M, Tsutsumida H, Higashi M, Yonezawa S. Epigenetic regulation of mucin genes in human cancers. *Clin Epigenetics*. 2011 Aug;2(2):85-96.
47. Jonckheere N, Vincent A, Neve B, Van Seuning I. Mucin expression, epigenetic regulation and patient survival: A toolkit of prognostic biomarkers in epithelial cancers. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021 Aug;1876(1):188538.
48. Lakshmanan I, Ponnusamy MP, Macha MA, Haridas D, Majhi PD, Kaur S, Jain M, Batra SK, Ganti AK. Mucins in lung cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *J Thorac Oncol*. 2015 Jan;10(1):19-27.
49. Vaissière T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, Ferro G, Paliwal A, Hainaut P, Brennan P, Tost J, Boffetta P, Herceg Z. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res*. 2009 Jan 1;69(1):243-52.
50. Wu JY, Wang J, Lai JC, Cheng YW, Yeh KT, Wu TC, Chen CY, Lee H. Association of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation with p53 mutation occurrence in non-small cell lung cancer with different histology, gender, and smoking status. *Ann Surg Oncol*. 2008 Nov;15(11):3272-7.

51. Lopes-Ramos CM, Quackenbush J, DeMeo DL. Genome-Wide Sex and Gender Differences in Cancer. *Front Oncol.* 2020 Nov 23; 10:597788.
52. Smits A, Lysiak M, Magnusson A, Rosell J, Söderkvist P, Malmström A. Sex Disparities in *MGMT* Promoter Methylation and Survival in Glioblastoma: Further Evidence from Clinical Cohorts. *J Clin Med.* 2021 Feb 3;10(4):556.
53. Han R, Sun W, Huang J, Shao L, Zhang H. Sex-biased DNA methylation in papillary thyroid cancer. *Biomark Med.* 2021 Feb;15(2):109-120.
54. Dai J, Nishi A, Li ZX, Zhang Y, Zhou T, You WC, Li WQ, Pan KF. DNA methylation signatures associated with prognosis of gastric cancer. *BMC Cancer.* 2021 May 25;21(1):610.
55. Zhang S, Zhang J, Zhang Q, Liang Y, Du Y, Wang G. Identification of Prognostic Biomarkers for Bladder Cancer Based on DNA Methylation Profile. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jan 31; 9:817086.
56. Xu RH, Wei W, Krawczyk M, Wang W, Luo H, Flagg K, Yi S, Shi W, Quan Q, Li K, Zheng L, Zhang H, Caughey BA, Zhao Q, Hou J, Zhang R, Xu Y, Cai H, Li G, Hou R, Zhong Z, Lin D, Fu X, Zhu J, Duan Y, Yu M, Ying B, Zhang W, Wang J, Zhang E, Zhang C, Li O, Guo R, Carter H, Zhu JK, Hao X, Zhang K. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat Mater.* 2017 Nov;16(11):1155-1161.
57. Ozlü T, Bülbül Y. Smoking and lung cancer. *Tuberk Toraks.* 2005;53(2):200-9.
58. Lee KW, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet.* 2013 Jul 17; 4:132.
59. Ringh MV, Hagemann-Jensen M, Needhamsen M, Kular L, Breeze CE, Sjöholm LK, Slavec L, Kullberg S, Wahlström J, Grunewald J, Brynedal B, Liu Y, Almgren M, Jagodic M, Öckinger J, Ekström TJ. Tobacco smoking induces changes in true DNA methylation, hydroxymethylation and gene expression in bronchoalveolar lavage cells. *EBioMedicine.* 2019 Aug; 46:290-304.
60. Suzuki M, Ikeda K, Shiraishi K, Eguchi A, Mori T, Yoshimoto K, Shibata H, Ito T, Baba Y, Baba H. Aberrant methylation and silencing of *IRF8* expression in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2014 Sep;8(3):1025-1030.
61. Chen L, Kong X, Fang Y, Paunekar S, Wang X, Brown JAL, Bourke E, Li X, Wang J. Recent Advances in the Role of Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 1 and Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2 in Breast and Ovarian Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Nov 3; 9:747314.
62. Rammal H, Saby C, Magnien K, Van-Gulick L, Garnotel R, Buache E, El Btaouri H, Jeannesson P, Morjani H. Discoidin Domain Receptors: Potential Actors and Targets in Cancer. *Front Pharmacol.* 2016 Mar 14; 7:55.
63. Zhang XZ, Chen MJ, Fan PM, Jiang W, Liang SX. *BTG2* Serves as a Potential Prognostic Marker and Correlates with Immune Infiltration in Lung Adenocarcinoma. *Int J Gen Med.* 2022 Mar 8; 15:2727-2745.
64. Bai Y, Qiao L, Xie N, Shi Y, Liu N, Wang J. Expression and prognosis analyses of the Tob/BTG antiproliferative (APRO) protein family in human cancers. *PLoS One.* 2017 Sep 18;12(9):e0184902.
65. Koch A, Joosten SC, Feng Z, de Ruijter TC, Draht MX, Melotte V, Smits KM, Veeck J, Herman JG, Van Neste L, Van Criekinge W, De Meyer T, van Engeland M. Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018 Jul;15(7):459-466.

66. Xue G, Cui ZJ, Zhou XH, Zhu YX, Chen Y, Liang FJ, Tang DN, Huang BY, Zhang HY, Hu ZH, Yuan XY, Xiong J. DNA Methylation Biomarkers Predict Objective Responses to PD-1/PD-L1 Inhibition Blockade. *Front Genet.* 2019 Aug 16; 10:724.
67. Starzer AM, Berghoff AS, Hamacher R, Tomasich E, Feldmann K, Hatzioannou T, Traint S, Lamm W, Noebauer-Huhmann IM, Furtner J, Müllauer L, Amann G, Bauer S, Schildhaus HU, Preusser M, Heller G, Brodowicz T. Tumor DNA methylation profiles correlate with response to anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor monotherapy in sarcoma patients. *J Immunother Cancer.* 2021 Mar;9(3):e001458.
68. Apprey V, Wang S, Tang W, Kittles RA, Southerland WM, Ittmann M, Kwabi-Addo B. Association of Genetic Ancestry with DNA Methylation Changes in Prostate Cancer Disparity. *Anticancer Res.* 2019 Nov;39(11):5861-5866.
69. Galanter JM, Gignoux CR, Oh SS, Torgerson D, Pino-Yanes M, Thakur N, Eng C, Hu D, Huntsman S, Farber HJ, Avila PC, Brigino-Buenaventura E, LeNoir MA, Meade K, Serebrisky D, Rodríguez-Cintrón W, Kumar R, Rodríguez-Santana JR, Seibold MA, Borrell LN, Burchard EG, Zaitlen N. Differential methylation between ethnic sub-groups reflects the effect of genetic ancestry and environmental exposures. *Elife.* 2017 Jan 3;6:e20532. doi: 10.7554/eLife.20532. PMID: 28044981; PMCID: PMC5207770.
70. Li B, Aouizerat BE, Cheng Y, Anastos K, Justice AC, Zhao H, Xu K. Incorporating local ancestry improves identification of ancestry-associated methylation signatures and meQTLs in African Americans. *Commun Biol.* 2022 Apr 29;5(1):401.
71. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, Aluru JS, Barsouk A. Epidemiology of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn).* 2021;25(1):45-52.

2. Proposta de submissão

Revista

Revista Pan-Amazônica de Saúde

Normas para publicação

- **Revisão sistemática** - Deve incluir as seções: Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Referências (máximo de 5.000 palavras, excluindo resumos, figuras/tabelas e referências).
- **Estrutura geral do documento** - Os trabalhos ser digitados para papel tamanho A4; com tipo de fonte Times New Roman, tamanho 12 pt; com espaçamento simples entre linhas e 6 pt para parágrafos em todo o texto; e margens superior, inferior, esquerda e direita igual a 3 cm. Cada arquivo (texto, figuras, documentos etc.) não deve ultrapassar 5 MB.
Título: Deve ser apresentado centralizado, em negrito e em minúsculo, a exceção de início de frase e nomes próprios.
Resumo: digitado em um único parágrafo, com até 250 palavras. Para manuscritos Revisão Sistemática, o resumo deve ser estruturado nas seguintes seções: Objetivo, Materiais e Métodos, Resultados, Conclusão.

Palavras-chave: indicar de três a seis termos que mais representem o conteúdo central da pesquisa.

Referências - para citação das referências no texto, deve ser utilizado o sistema de chamada numérico sequencial (ordem de aparecimento no texto), que corresponde ao número sobrescrito, sem parêntese, disposto imediatamente após o trecho a que se refere. No caso de mais de uma citação para o mesmo trecho, os números devem ser separados entre si por vírgulas. As referências devem ser listadas ao final do manuscrito, em ordem sequencial numérica, conforme ordem de aparecimento no texto; e normalizadas segundo os Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos. Títulos de periódicos deverão ser abreviados de acordo com o estilo utilizado no Index Medicus. Observar os exemplos abaixo:

-Artigos de periódicos:

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006 Dec;22(12):583-8.

-Livros quando o autor do capítulo não é o mesmo do livro:

Dewey WL, Martin BR. Abuso de drogas. In: Craig CR, Stitzel RE. *Farmacologia moderna: com aplicações clínicas*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kroogan; 2011. p. 380-94.

-Websites e base de dados na Internet:

PubMed Central [Internet]. Bethesda (MD): NCBI/NLM; [cited 2015 Feb 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>.

- **Tabelas e quadros** - recomenda-se seguir Normas de Apresentação Tabular da Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Todas as explicações devem ser apresentadas nas legendas (rodapé) da tabela/quadro e não no título, identificadas por símbolos nesta ordem: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡. Não sublinhar ou desenhar linhas dentro das tabelas/quadros e não usar espaços para separar colunas.
- **Siglas e Acrônimos** - Para siglas e acrônimos estrangeiros, recomenda-se a designação correspondente em português, se a forma traduzida for largamente aceita; ou sua utilização na forma original se não houver correspondência em português, ainda que o nome por extenso em português não corresponda à sigla. Em sua primeira aparição no texto, siglas e acrônimos deverão ser escritos por extenso e acompanhados da respectiva redução entre parênteses. A partir daí, utilizar apenas a sigla ou acrônimo no restante do texto.