

Adhara Brandão Lima

ANÁLISE DA METILAÇÃO DOS GENES SUPRESSORES TUMORAIS *SEPT9* E *BMP3* NO PLASMA DE PARTICIPANTES DO PROGRAMA DE RASTREAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL DO HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII- Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dr^a. Denise Peixoto Guimarães
Coorientadores: Dr. Rui Manuel Reis
Dr^a. Mariana Bizarro dos Reis

Barretos, SP

2021

Adhara Brandão Lima

ANÁLISE DA METILAÇÃO DOS GENES SUPRESSORES TUMORAIS *SEPT9* E *BMP3* NO PLASMA DE PARTICIPANTES DO PROGRAMA DE RASTREAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL DO HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII- Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dr^a. Denise Peixoto Guimarães

Coorientadores: Dr. Rui Manuel Reis

Dr^a. Mariana Bizarro dos Reis

Barretos, SP

2021

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito de financiamento pela Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, por meio do Auxílio de Apoio ao Pesquisador (PAIP), bolsa individual pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Ministério Público do Trabalho (MPT) de Campinas.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão das instituições supracitadas.

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Dedico este trabalho aos meus pais (Suely e Roberto) que através de muito esforço, me ajudaram a alcançar todas as conquistas da minha vida com paciência e gratidão. Obrigada pela dedicação em me educar e por me ensinarem os valores e princípios que construíram a pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial aos meus pais Suely e Roberto, por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas. Pela batalha diária que enfrentaram para que eu tivesse acesso a uma educação de qualidade, por me ensinarem a seguir a vida sempre lembrando de quem eu sou e agradecendo as alegrias e tristezas que surgem pelo caminho, mas acima de tudo, por todas as vezes que abdicaram de suas vontades para que meu sonho fosse realizado. Eu amo vocês infinitamente.

Ao Rafael, por ser uma pessoa maravilhosa que tenho o prazer de compartilhar a vida. Agradeço por incansavelmente me lembrar da minha capacidade e não permitir que as frustrações pudessem me atingir de forma negativa. Por me incentivar a desbravar novos conhecimentos, e sempre me levantar e seguir ao meu lado quando algum baque era muito forte. Toda minha admiração e amor para você.

A Dr^a. Denise e Dr. Rui pela oportunidade em conduzir este projeto. Por todos os ensinamentos, conversas e conselhos que acrescentaram na minha formação pessoal e profissional. Agradeço por concluir esta etapa da minha vida tendo vocês como referências, com a certeza de que realizei o melhor que pude durante estes dois anos graças a confiança de vocês no meu trabalho e no meu potencial. Muito obrigada.

A Dr^a. Mariana pela paciência e compreensão durante meu período inicial no mestrado e pela amizade durante todo o trajeto, muito obrigada por participar da minha formação. **Aos amigos do grupo de câncer colorretal**, em especial Wellington e Guilherme pela amizade e pelas conversas que sempre serviram como suporte.

Aos amigos que se tornaram minha família em Barretos: Marcos, Daniel, Adeylson, Luciane, Marco, Thaís, Leo. Obrigada pela amizade, por tantos conselhos durante nossas conversas e por tornarem mais fácil a distância e a saudade da minha família.

Aos membros da Banca de Acompanhamento, Dra. Carmen Jeronimo e Dr. Vinicius Vazquez pela disponibilidade em contribuir com o estudo desde o início e participarem do meu crescimento acadêmico no decorrer das apresentações do projeto.

Aos membros da Banca de Defesa, Dra. Dirce Carraro e Dra. Carmen Jeronimo pela disponibilidade em avaliar e contribuir com o projeto. Obrigada por fazerem parte deste momento.

Aos estatísticos do Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística, pela paciência em discutir os resultados e auxílio nas análises estatísticas do trabalho.

Ao **Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular**, à **pós-graduação**, aos **participantes do Programa de Rastreamento do Câncer Colorretal** por possibilitarem a realização deste trabalho e a geração do conhecimento nele contido.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e pelo **Ministério Público do Trabalho (MPT)** de Campinas e ao **Hospital de Câncer de Barretos** pelo financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia do câncer colorretal	1
1.2	História natural e biologia do câncer colorretal	2
1.3	Biópsia líquida	8
1.4	Programa de rastreamento do CCR no Hospital de Câncer de Barretos	12
2	JUSTIFICATIVA	14
3	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivo geral	15
3.2	Objetivos específicos	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	Tipo de estudo e população	16
4.2	Cálculo amostral	16
4.3	Critérios de seleção da população	16
4.3.1	Critérios de inclusão	16
4.3.2	Critérios de exclusão	17
4.4	Variáveis coletadas	17
4.5	Coleta das amostras e extração de cfDNA	18
4.6	Análise do tamanho de fragmentos de cfDNA	19
4.7	Modificação do cfDNA por bissulfito de sódio	21
4.8	Padrão de metilação dos genes <i>SEPT9</i> e <i>BMP3</i> por <i>droplet digital</i> PCR.	22
4.8.1	Padronização dos ensaios de <i>droplet digital</i> PCR.	25
4.9	Cálculo do número de cópias de DNA por ml de plasma	42
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	44
7	RESULTADOS	45
7.1	Descrição da população incluída	45
7.2	Descrição da concentração de cfDNA nas amostras dos participantes.	48
7.3	Análise da metilação para o gene <i>SEPT9</i> por <i>droplet digital</i> PCR	50
7.4	Análise da metilação para o gene <i>BMP3</i> por <i>droplet digital</i> PCR	55
7.5	Performance dos genes <i>SEPT9</i> e <i>BMP3</i> para detecção da metilação do cfDNA nos pacientes com CCR ou sem lesões colorretais	60
7.6	Distribuição das amostras quanto ao status de metilação e o grupo de pior lesão...	68
7.7	Modelo de combinação dos genes <i>SEPT9</i> e <i>BMP3</i>	69
8	DISCUSSÃO	72
9	CONCLUSÃO	81
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias moleculares envolvidas na progressão do CCR	3
Figura 2 - Metilação de ilhas CpGs promotoras e em sequências repetitivas de DNA em células normais e em células tumorais.....	4
Figura 3 - Comparação entre as frequências de metilação para cada gene nos diferentes achados histopatológicos do estudo	6
Figura 4 - <i>Forest Plot</i> de efeito aleatório para associação da metilação do promotor do gene <i>NDRG4</i> em amostras de fezes e o risco de câncer colorretal	10
Figura 5 - <i>Forest Plot</i> de efeito aleatório para associação da metilação do promotor do gene <i>BMP3</i> em amostras de plasma e o risco de câncer colorretal.	10
Figura 6 - <i>Forest Plot</i> de efeito aleatório para associação da metilação do promotor do gene <i>BMP3</i> em amostras de fezes e o risco de câncer colorretal	11
Figura 7 - <i>Forest Plot</i> de efeito aleatório para associação da metilação do promotor do gene <i>BMP3</i> em amostras de fezes e o risco de adenomas	11
Figura 8 - Tamanhos dos fragmentos de DNA livre circulante extraídos de três amostras representativas incluídas no estudo.	20
Figura 9 - Etapas para a realização da técnica de droplet digital PCR (ddPCR)	24
Figura 10 - Ensaio de padronização realizados para a técnica de droplet digital PCR (ddPCR).	25
Figura 11 - Gradiente de temperatura para o gene <i>SEPT9</i>	27
Figura 12 - Gradiente de temperatura para o gene <i>BMP3</i>	27
Figura 13 - Curva de amplificação dos primers e sondas metilada e não-metilada para o gene <i>SEPT9</i>	30
Figura 14 - Curva de amplificação dos primers e sonda metilada para o gene <i>SEPT9</i>	31
Figura 15 - Curva de amplificação dos primers e sonda não-metilada para o gene <i>SEPT9</i>	32
Figura 16 - Curva de amplificação dos primers e sondas metilada e não-metilada para o gene <i>BMP3</i>	33
Figura 17 - Análise da curva de amplificação dos primers e sonda metilada para o gene <i>BMP3</i>	34
Figura 18 - Análise da curva de amplificação dos primers e sonda não-metilada para o gene <i>BMP3</i>	35

Figura 19 - Ensaio de confirmação em amostras de DNA de tecido para o gene <i>SEPT9</i>	37
Figura 20 - Ensaio de confirmação em amostras de DNA de tecido para o gene <i>BMP3</i>	38
Figura 21 - Diluição seriada para o cálculo do Limite de detecção	41
Figura 22 - Fluxograma de seleção e inclusão dos participantes do estudo.....	45
Figura 23 – Relação entre a concentração de cfDNA (ng/ml) e a pior lesão detectada.	49
Figura 24 - Relação entre a concentração de cfDNA (ng/ml) e os estadiamentos do câncer .	50
Figura 25 - Relação entre o número de cópias metiladas do gene <i>SEPT9</i> e a pior lesão detectada	52
Figura 26 - Relação entre o número de cópias metiladas do gene <i>SEPT9</i> e os estadiamentos do câncer	53
Figura 27 - Relação entre o status de metilação do gene <i>SEPT9</i> e a pior lesão detectada	54
Figura 28 - Relação entre o status de metilação do gene <i>SEPT9</i> e os estadiamentos do câncer	55
Figura 29 - Relação entre o número de cópias metiladas do gene <i>BMP3</i> e os quatro grupos de pior lesão	57
Figura 30 - Relação entre o número de cópias metiladas do gene <i>BMP3</i> e os estadiamentos do câncer	58
Figura 31 - Relação entre o status de metilação do gene <i>BMP3</i> e os quatro grupos de pior lesão	59
Figura 32 - Relação entre o status de metilação do gene <i>BMP3</i> e os estadiamentos do câncer	59
Figura 33 - Curvas ROC utilizando os dois métodos de cálculo para análise da metilação dos genes <i>SEPT9</i> e <i>BMP3</i> no grupo sem lesões significativas vs grupo câncer.	61
Figura 34 - Curvas ROC para análise da metilação dos genes <i>SEPT9</i> e <i>BMP3</i>	63
Figura 35 - Status de metilação para os genes <i>SEPT9</i> e <i>BMP3</i> no total de amostras analisadas por ddPCR.	68
Figura 36 – Curvas ROC do <i>status</i> de metilação para análise individual dos genes e para os modelos de combinação.....	70
Figura 37 – Comparação entre as distribuições de probabilidade predita do modelo de combinação dos genes e idade média entre o grupo sem lesão e o grupo câncer.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos <i>primers</i> senso e anti-senso, tamanhos dos produtos de amplificação e sítios CpGs analisados por ddPCR.....	22
Tabela 2 - Valores experimentais para análise dos primers e sondas por qMSP	29
Tabela 3 - Dados demográficos, endoscópicos, anátomo-patológicos e de estadiamento dos participantes do estudo.....	47
Tabela 4 - Valores da concentração de cfDNA nas amostras dos participantes incluídos no estudo.....	48
Tabela 5 - Dados das análises de ddPCR para o número de cópias/ml de plasma e status de metilação do gene <i>SEPT9</i>	51
Tabela 6 - Dados das análises de ddPCR para o número de cópias/ml de plasma e status de metilação do gene <i>BMP3</i>	56
Tabela 7 - Valores de <i>cutoff</i> para o status de metilação dos genes <i>SEPT9</i> e <i>BMP3</i> de acordo com os grupos de pior lesão.....	62
Tabela 8 - A associação dos níveis de metilação do gene <i>SEPT9</i> com características clínico-patológicas dos participantes.....	65
Tabela 9 - A associação dos níveis de metilação do gene <i>BMP3</i> com características clínico-patológicas dos participantes.....	67
Tabela 10 - Análise de regressão logística utilizando os <i>cutoffs</i> do <i>status</i> de metilação para os genes <i>SEPT9</i> e <i>BMP3</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ALX4	Aristaless-like homeobox-4
AUC	Área Abaixo da Curva
BMP3	Bone morphogenetic protein 3
CCR	Câncer colorretal
cfDNA	DNA Livre Circulante
ctDNA	DNA Tumoral Circulante
CTC	Célula Tumoral Circulante
CpG	Citosina Fosfato Guanina
CIMP	Fenótipo metilador das ilhas CpG
CIN	Instabilidade cromossômica
ddPCR	Droplet Digital Polymerase Chain Reaction
FIT	Teste Imunoquímico de Sangue Oculto nas Fezes
GTP	Guanosina Trifosfato
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
PB	Pares de Base
PH	Pólipo hiperplásico
PPV	Valor Preditivo Positivo
PPN	Valor Preditivo Negativo
LSS	Lesão Sésil Serrilhada
LoB	Limite de Branco
LoD	Limite de Detecção
MLH1	MutL homolog 1
MSI	Instabilidade de microssatélites
NDRG4	Family member 4
qMSP	PCR em Tempo Real Quantitativo Metilação Específica
ROC	Receiver Operating Characteristic
SEPT9	Septin 9
TGFB	Fator de Crescimento Transformador Beta

RESUMO

Introdução: No Brasil, o câncer colorretal (CCR) aparece como o segundo câncer mais incidente tanto em homens como em mulheres, com a maioria dos casos diagnosticados em estágios avançados quando o tratamento curativo já não é mais possível. Este cenário pode ser modificado através da detecção precoce do CCR e remoção de suas lesões precursoras, com consequente redução da mortalidade. O uso de estratégias menos invasivas, tais como a biópsia líquida, e o estudo das alterações epigenéticas na progressão da doença, podem contribuir para a identificação de biomarcadores de detecção do CCR. **Objetivo:** Analisar a metilação dos genes supressores de tumor *SEPT9* e *BMP3* no plasma como biomarcadores de detecção do CCR e de suas lesões precursoras. **Materiais e métodos:** Estudo retrospectivo e transversal incluindo amostras de plasma de participantes do programa de rastreamento submetidos à colonoscopia diagnóstica (n= 232) e pacientes com CCR (n=30) atendidos no Hospital de Câncer de Barretos. A extração de cell-free DNA (cfDNA) foi realizada utilizando kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) e o cfDNA extraído foi modificado por bissulfato de sódio para a análise do status de metilação através do sistema de *droplet digital PCR* (ddPCR). Os participantes foram agrupados de acordo com a pior lesão detectada na colonoscopia: Sem lesão, lesão serrilhada séssil (LSS), pólipos hiperplásicos (PH), adenoma precoce (AP), adenoma avançado (AA), e câncer (CCR). A curva ROC foi construída para determinar os *cutoff* do status de metilação dos genes e discriminar o grupo sem lesão do grupo CCR e do grupo com CCR + AA. **Resultados:** Um total de 262 participantes foram incluídos: sem lesão (43), LSS (3), PH (13), AP (119), AA (46), e CCR (38). O grupo CCR apresentou a maior concentração de cfDNA (10,4 ng/ml), com diferença significativa entre os grupos CCR + AA e sem lesão (p=0,047). Os valores de mediana do status de metilação no CCR foram de 2,2% e 0,0% para os genes *SEPT9* e *BMP3*, respectivamente. Para o gene *SEPT9*, o *cutoff* de 0,84% (AUC=0,645) do status de metilação que discrimina o grupo CCR + AA vs sem lesão, obteve a sensibilidade de 64% e especificidade de 57%, com uma frequência de casos positivos de 40,5% para o grupo sem lesão, 41,7% para PH, 57,5% para AP, 52,3% para AA e 63,9% para CCR. Considerando o *cutoff* de 2,50% (AUC=0,681) a sensibilidade foi de 50% e especificidade de 90% com 9,5% de casos considerados positivos para o grupo sem lesão, 0% para PH, 15,9% para AP, 16,0% para AA e 52,7% para CCR (p<0,001). No grupo CCR as maiores frequências de casos positivos foram o do estadiamento IV, 100% em ambos os *cutoffs*. Para o gene *BMP3*, o *cutoff* de 0,16% (AUC=0,557) obteve a sensibilidade de 45% e especificidade

de 62%, sendo casos positivos 38,1% grupo sem lesão, 33,3% do PH, 45,5% do AP, 46,7% AA e 42,9% do grupo CCR. Para o *cutoff* de 2,30% (AUC=0,576) a sensibilidade foi de 40% e especificidade de 90% e a frequência de casos positivos foi de 11,9% do grupo sem lesão, 8,3% do PH, 18,2% do AP, 13,3% do AA e 37,1% para o grupo CCR ($p=0,047$). O modelo de combinação do *SEPT9* + *BMP3*+ idade acima de 60 anos, mostrou melhor performance para detecção do CCR (AUC= 0,845) com a sensibilidade de 80% e especificidade de 81%, quando comparado com o modelo dos genes individuais. **Conclusão:** Em relação ao *SEPT9*, a distribuição do status de metilação apresentou maiores valores no câncer, especialmente nos estádios mais avançados. Em relação ao *BMP3*, as medianas foram zero para todos os grupos e não houve diferença na distribuição do status de metilação nas amostras. Menores valores de *cutoffs* do status de metilação para cada gene isolado permitiram identificar mais casos de AA e CCR, mas com uma especificidade mais baixa do que maiores valores de *cutoff*. Por outro lado, o modelo de combinação dos genes *SEPT9* e *BMP3*, e a combinação dos genes mais a idade média de 60 anos, demonstrou melhor performance para detecção do CCR. Concluindo, nossos resultados sugerem que esses biomarcadores isolados não são ideais para serem utilizados no rastreamento do CCR.

Palavras-chave: Biópsia líquida, metilação do DNA, câncer colorretal, adenoma, cell-free DNA, biomarcadores.

ABSTRACT

Introduction: In Brazil, colorectal cancer (CRC) is the second most frequent cancer in men and women, and most cases are diagnosed in advanced stages when curative treatment is no longer possible. This scenario can be modified through early detection of CRC and removal of precursor lesions, with a consequent reduction in mortality. The use of less invasive strategies such as liquid biopsy and the study of epigenetic changes in disease progression, can contribute to the identification of CRC detection biomarkers. **Objective:** To evaluate the methylation of the tumor suppressor genes *SEPT9* and *BMP3* in plasma as biomarkers for detecting of CRC and its precursor lesions. **Materials and methods:** Retrospective and cross-sectional study, using plasmas samples from screening program participants who had positive fecal occult blood test and underwent colonoscopy (n= 232) and cancer patients treated at Barretos Cancer Hospital (n=30). Cell free circulating DNA (cfDNA) isolation was performed using a QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) and the cfDNA obtained was converted by sodium bisulfite for analysis of methylation status by the droplet digital PCR system (ddPCR). Participants were grouped according to the worst lesion detected in colonoscopy: No lesion, sessile serrated lesion (SSL), hyperplastic polyp (HP), early adenoma (EA), advanced adenoma (AA) and cancer (CRC). ROC curves were constructed for both genes to determine the best cutoff value of methylation status to discriminate between group without lesions and CRC group and CRC + AA. **Results:** A total of 262 participants were included: no lesion (43), SSL (3), HP (13), EA (119), AA (46), and CRC (38). The CRC group showed the highest cfDNA concentration (10.4 ng/ml) with a significant difference between the CCR + AA and no lesion groups (p=0.047). The median values of CRC methylation status were 2.2% and 0.0% for the *SEPT9* and *BMP3* genes, respectively. For *SEPT9* gene, the cutoff of 0.84% (AUC=0.645) of the methylation status that discriminates the CRC + AA group vs no lesion, obtained a sensitivity of 64% and specificity of 57%, with 40.5% of cases considered positive for the group without lesion, 41.7% for HP, 57.5% for EA, 52.3% for AA and 63.9% for CRC. Considering the cutoff of 2.50% (AUC=0.681), the sensitivity was 50% and specificity was 90% with 9.5% of cases considered positive for the group without lesion, 0% for HP, 15.9% for EA, 16.0% for AA and 52.7% for CRC (p<0.001). The highest frequencies of positive cases in CRC group were stage IV, 100% for both cutoffs. For *BMP3* gene, the cutoff of 0.16% (AUC=0.557) had a sensitivity of 45% and a specificity of 62%, with 38.1% of cases considered positive for group without

lesion, 33.3% for HP, 45.5 % for EA, 46.7% for AA and 42.9% for CRC. The cutoff of 2.30% (AUC=0.576) showed the sensitivity of 40% and specificity of 90%, with 11.9% of cases considered positive for group without lesion, 8.3% for HP, 18, 2% for EA, 13.3% for AA and 37.1% for the CRC ($p=0.047$). The combination model of *SEPT9* + *BMP3*+ aged over 60 years showed better performance to detect CRC (AUC = 0.845) with sensitivity of 80% and specificity of 81%, when compared to the model of individual genes. **Conclusion:** Regarding *SEPT9*, the distribution of methylation status showed higher values in cancer, especially in more advanced stages. Regarding *BMP3*, the medians were zero for all groups and there was no difference in the distribution of methylation status. Lower cutoff values for each gene isolated allowed to identify more cases of AA and CCR, but with a lower specificity than higher cutoff values. However, the combination model of the *SEPT9* and *BMP3* genes, and the combination of genes plus the average age of 60 years, showed better performance for detection of CRC. In conclusion, our results suggest that the isolated biomarkers are not ideal for use in screening for CRC.

Keywords: Liquid biopsy, methylation of DNA, colorectal cancer, adenoma, cell-free DNA, biomarkers.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado no mundo (1.8 milhões de casos, 10,2% do total) e classificado como o segundo em termos de mortalidade (881.000 de mortes, 9,2% do total). Mundialmente, este tipo de câncer aparece como o segundo tipo mais incidente nas mulheres (9,4%) e o terceiro (10,6%) nos homens, de acordo com dados do GLOBOCAN de 2020¹.

No Brasil, segundo a estimativa do INCA (Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – Ministério da Saúde) quanto à incidência do CCR para o triênio de 2020-2022, estimam-se 20.520 novos casos para os homens e 20.470 para as mulheres. Com exceção do câncer de pele não melanoma, o CCR aparece como o segundo câncer mais comum para ambos os sexos ².

O CCR é uma doença multifatorial resultante da interação entre condições ambientais, de hábitos de vida como: tabagismo, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, alta ingestão de carne vermelha e processada, alimentação pobre em frutas e fibras, obesidade e sedentarismo, além de fatores intrínsecos (mutações herdadas ou mutações aleatórias) . Estes fatores causais podem agir tanto em conjunto como em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese colorretal. Dessa forma, as diferenças geográficas na incidência, possivelmente são reflexos dos hábitos de vida de cada população ⁴.

A maioria do CCR é esporádico (sem histórico familiar), correspondendo aproximadamente de 70 a 85% dos casos ³. A maioria dos CCRs esporádicos ocorre em indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos, sendo 66 anos a idade média de diagnóstico ^{5 6 7}. Em 15 a 20% dos casos, existe história familiar de CCR e em um grupo menor, entre 5 a 10%, o CCR está associado a síndromes hereditárias ^{8 9}. O câncer esporádico se desenvolve no cólon proximal (ceco, ascendente, flexura hepática e transversa) em 41% dos casos, no cólon distal (flexura esplênica, cólon descendente, sigmóide) em 22% e no reto em 28% dos casos, considerando homens e mulheres ¹⁰. Essas frequências, entretanto, variam com a idade e sexo. A localização do tumor está associada a diferenças nas características clínicas (sinais e

sintomas) e biológicas, assim como na eficiência de sua detecção, resposta ao tratamento e prognóstico^{3 11}.

O acesso inadequado à detecção precoce pode explicar o aumento na incidência e mortalidade pelo CCR, visto que o diagnóstico é frequentemente realizado em estadios avançados onde a taxa de sobrevida em 5 anos é cerca de 71% para estadiamento III com acometimento de tecidos ou linfonodos regionais, e sobrevida de 12% para estadiamento IV^{7 12}. Neste cenário clínico-epidemiológico, a detecção precoce do câncer colorretal ou ainda, de suas lesões precursoras pode ter um papel fundamental na redução da mortalidade do CCR¹³. Tem sido estimado que cerca de 95% dos pacientes com CCR poderiam se beneficiar de cirurgias curativas se o diagnóstico fosse feito em estádios iniciais¹⁴.

1.2 História natural e biologia do câncer colorretal

Cerca de 90% dos casos de CCR são adenocarcinomas e maioria se origina de lesões precursoras. O adenoma é a principal lesão precursora do CCR, sendo que no modelo clássico de progressão adenoma-adenocarcinoma é sugerido que o desenvolvimento do tumor é dirigido pelo progressivo acúmulo de mutações que pode levar de 7 a 10 anos⁹. Nos adenomas convencionais a displasia pode ser de baixo ou alto grau, dependendo da gravidade das alterações histológicas presentes. Alguns adenomas regridem espontaneamente e outros podem progredir ao carcinoma *in situ* (Tis) restritos à mucosa, e ao câncer invasivo quando invade a submucosa (pT1). O carcinoma *in situ*, apesar de apresentar as alterações citológicas e/ou estruturais de neoplasia maligna, se comporta como um adenoma restrito à camada da mucosa e não apresenta capacidade de metástase, sendo então categorizado no grupo das neoplasias intraepiteliais (adenomas) de alto grau pela Organização Mundial de Saúde (OMS)¹⁵. Os adenomas podem ainda ser divididos em: adenoma tubular, adenoma túbulo-viloso e adenoma viloso, dependendo da presença do componente tubular na sua arquitetura, pelo menos 25% de componente viloso ou mais de 75% de componente viloso, respectivamente¹⁶. Adenoma avançado é classificado quando o adenoma é maior ou igual a 10mm, se apresenta displasia de alto grau ou apresenta componente viloso¹⁶.

A via clássica consiste na transformação do epitélio de cólon normal através de mutações germinativas ou somáticas em genes supressores tumorais (ex: gene *APC*), seguido

da progressão de uma mucosa em risco para adenomas, por meio de mutações em proto-oncogenes como *KRAS*, até o desenvolvimento do câncer (Figura 1 – via 1).

Embora a progressão adenoma-adenocarcinoma seja a principal via de desenvolvimento do CCR, recentemente os pólipos serrilhados têm sido reconhecidos também como lesões precursoras, responsáveis por cerca de 7,5% de todos os casos de CCR¹⁷. As lesões serrilhadas formam um grupo heterogêneo caracterizado morfológicamente pelo arquitetura serrilhada do tecido epitelial no local da lesão, e incluem: os pólipos hiperplásicos (PH) do tipo microvesicular ou do tipo rico em células calciformes, a lesão séssil serrilhada (LSS) com ou sem displasia e o adenoma serrilhado tradicional¹⁶.

Essas lesões apresentam aspectos moleculares e comportamentos biológicos distintos entre si e o adenoma clássico. Os mecanismos genéticos que ocorrem no carcinoma serrilhado ainda são pouco esclarecidos, porém as mutações em *KRAS* e *BRAF* são frequentemente envolvidas, assim como instabilidade de microssatélite (MSI- *Microsatellite instability*) e fenótipo de metilador de ilhas CpG (CIMP- *CpG island methylator phenotype*)¹⁷ (Figura 1 – via 2). Os indivíduos que apresentam as lesões precursoras, apresentam também maior risco de desenvolver novas lesões precursoras e CCR, e a sua remoção pela polipectomia diminui o risco de desenvolvimento da doença⁵.

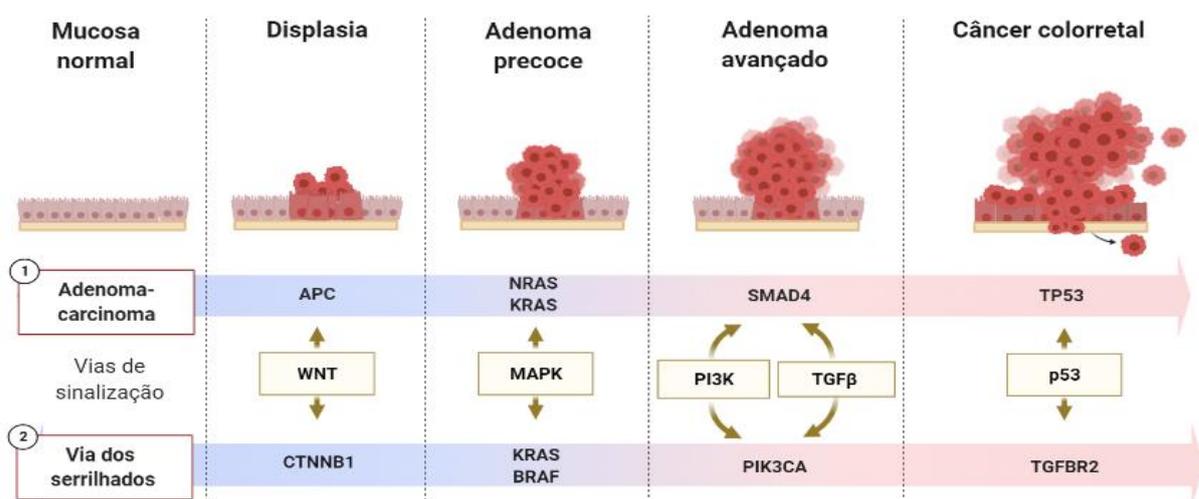


Figura 1 - Vias moleculares envolvidas na progressão do CCR. 1- Adenoma-carcinoma: via tradicional que envolve a progressão de adenoma em adenocarcinoma. 2- Via dos serrilhados: via alternativa que envolve a progressão de lesões serrilhadas em câncer (LIMA, AB et al. Manuscrito em fase de preparação).

Além da instabilidade cromossômica (CIN- *Chromosomal Instability*), observada na sequência adenoma-adenocarcinoma presente na maioria dos CCRs e a instabilidade de microssatélites (MSI), as alterações epigenéticas também são importantes para o desenvolvimento do CCR ¹⁸.

A metilação do DNA envolve a adição do grupo metil na posição 5' do anel de pirimidina da citosina em um contexto de dinucleótidos CpG, sendo um mecanismo fisiológico que influencia a regulação da expressão gênica uma vez que pode ocorrer na região promotora, ricas em citosinas e guaninas, também conhecidas como Ilhas CpGs ¹⁹. As ilhas CpG geralmente não são metiladas nas regiões promotoras de genes supressores tumorais em células normais, e a metilação das regiões CpG pode afetar a condensação da cromatina ²⁰. A alteração dos padrões de metilação do DNA é reconhecido como importante evento durante a carcinogênese. Um exemplo é a hipermetilação das ilhas CpG na região promotora resultando na inativação transcricional de genes supressores tumorais ¹⁹ (Figura 2). Os tumores com hipermetilação em regiões promotoras de genes representam um subgrupo caracterizado pela instabilidade epigenética, conhecido como: fenótipo metilador da ilha CpG (CIMP) ²¹. Vários genes foram identificados como sendo afetados na CIMP, como por exemplo, a metilação da região promotora da ilha CpG do gene de reparo de mau pareamento do bases no DNA, *MLH1*, ocasionando sua inativação transcricional e instabilidade de microssatélite ²².

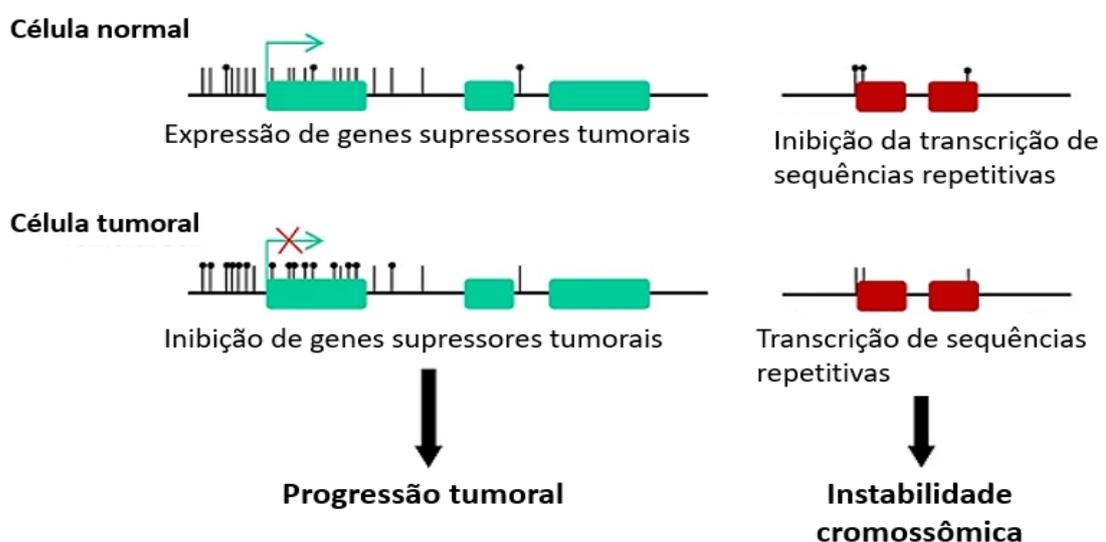


Figura 2 - Metilação de ilhas CpGs promotoras e em sequências repetitivas de DNA em células normais e em células tumorais (Adaptado de LOPEZ-SERRA et al.,2012).

Em um estudo recente do nosso grupo de pesquisa do câncer colorretal do Hospital de Amor – Hospital de Câncer de Barretos, o status de metilação de um painel de 7 genes (*NDRG4*, *BMP3*, *p16*, *APC* e *MLH1*, *ALX4*, *SEPT9*) foi caracterizado em uma série de câncer colorretal, lesões precursoras (adenoma, lesão serrilhada sésil), pólipos hiperplásicos, ressecadas ou biopsiadas durante a colonoscopia de uma população brasileira ²³. As amostras histologicamente normais (de biópsias de colón aparentemente normal pela patologia) não estavam metiladas para a região dos genes analisados (*NDRG4*, *BMP3*, *p16*, *APC* e *MLH1*), com exceção dos genes *ALX4* (50%) e *SEPT9* (37,5%). Nas lesões serrilhadas sésseis, as frequências de amostras metiladas foram significativamente maiores do que as das amostras normais para os genes *ALX4* (90%), *SEPT9* (78%), *NDRG4* (78%), e *BMP3* (67%). Nos adenomas, as maiores frequências foram encontradas para os genes *ALX4* (95%), *SEPT9* (83%), *NDRG4* (73,6%) e *BMP3* (55,3%). No câncer colorretal, as maiores frequências foram para os genes *SEPT9* (91,8%), *ALX4* (85,1%), *NDRG4* (73,7%), e *BMP3* (65,6%) e nas amostras de tecido normal adjacente, foram detectadas frequências de 27%, 6%, 6% e 0% dos casos para estes genes, respectivamente (Figura 3). Nesse contexto a metilação de *NDRG4* e *BMP3* foram sugeridas como possíveis candidatos a biomarcadores para o rastreamento molecular do CCR ²³.

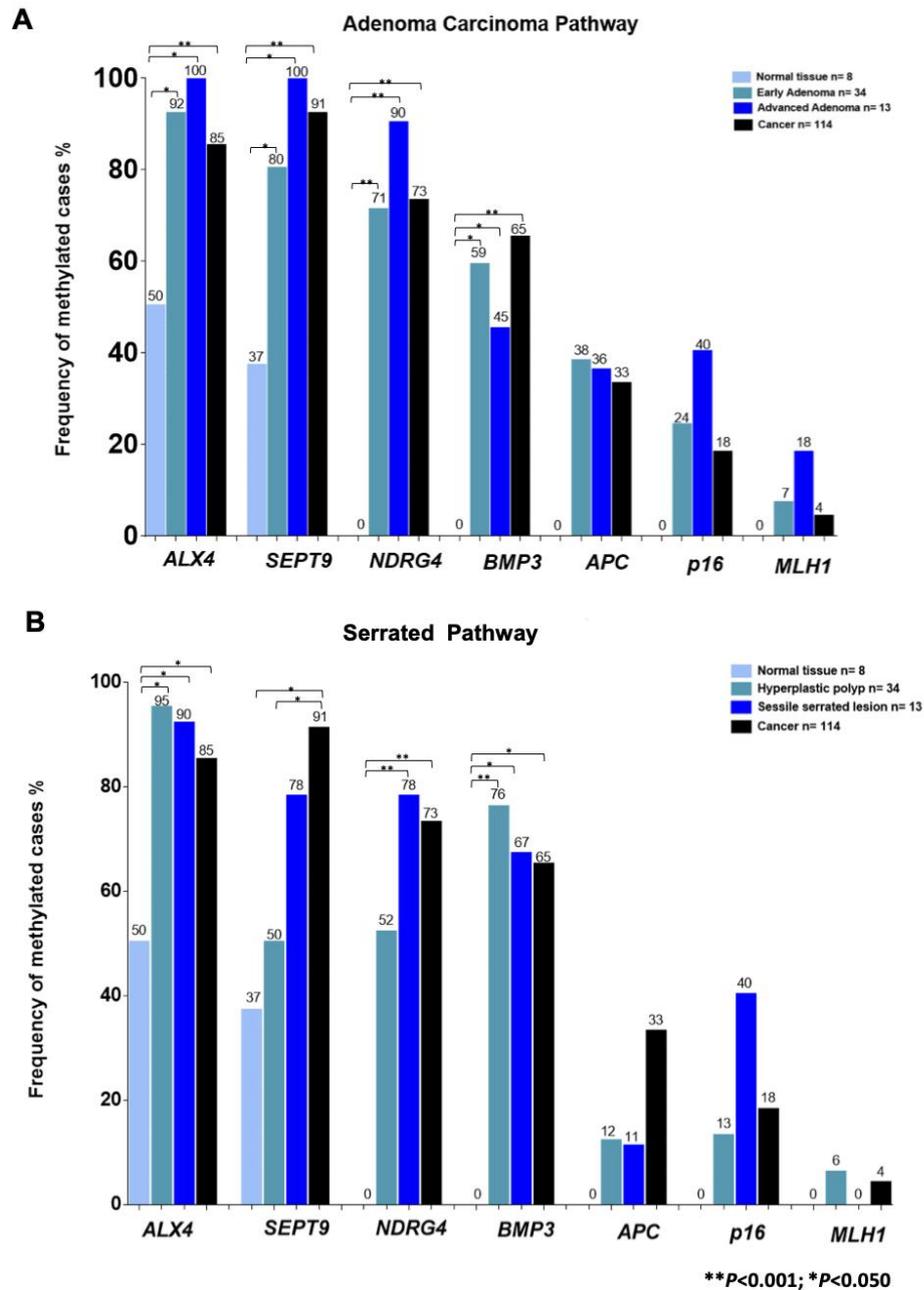


Figura 3- Comparação entre as frequências de metilação para cada gene nos diferentes achados histopatológicos do estudo. 3A) Frequência de metilação dos genes na via adenoma carcinoma. 3B) Frequência de metilação dos genes na via dos serrilhados (SOBANSKI et al., 2021).

A análise da metilação dos genes *BMP3* e *NDRG4* foi incluída no teste comercializado de DNA fecal (Cologuard®), recentemente aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para rastreamento de CCR nos EUA²⁴. O gene *NDRG4* (*N-myc Downstream-Regulated Gene 4*) é um dos quatro membros da família dos genes envolvidos nos processos de diferenciação, proliferação, desenvolvimento e estresse celular. Um estudo recente evidenciou um padrão aberrante de metilação do DNA na região promotora de *NDRG4* e sugeriu que este gene poderia desempenhar um papel importante na carcinogênese colorretal²⁵. Em outro trabalho, foi demonstrado que a taxa de detecção da metilação de *NDRG4* foi de 81,0% no tecido tumoral, 8,3% no tecido normal adjacente, 54,8% no sangue, 72,6% na urina e 76,2% nas fezes de portadores de CCR²⁶.

O gene *BMP3* (*Bone Morphogenetic Protein 3*) pertence à família do TGFB (Fator de Crescimento Transformador Beta). Há um reconhecimento crescente da função supressora tumoral de *BMP3* no CCR²⁷. Loh e colaboradores mostraram evidências da repressão da regulação do *BMP3* em 89% (50/56) de tumores primários. Além disso, a metilação foi frequentemente observada em lesões serrilhadas sésseis e adenomas serrilhados tradicionais (22/29, correspondendo a 76%), sugerindo que este gene é um importante alvo para detecção precoce de lesões com potencial neoplásico²⁷. Um estudo de Park e colaboradores avaliou que a metilação do gene *BMP3* se mostrou presente em 40,0% do CCR, 34% metilado em adenomas avançados e 15% no epitélio normal²⁸. Por estes motivos, a metilação deste gene também foi incluída no teste de DNA fecal Cologuard®.

Apesar da metilação do gene *SEPT9* ter sido detectada em amostras normais no estudo prévio do grupo de pesquisa, e em razão disso parecer menos promissor para um biomarcador de câncer, um teste comercial para a sua detecção tem sido sugerido como um teste de rastreamento molecular do CCR²⁹. O gene *SEPT9* (*Septina 9*) pertence à família das septinas, que são altamente conservadas e codificam proteínas de ligação à guanosina trifosfato (GTP). Este gene possui 18 transcritos distintos formados por *splicing* alternativo e codifica 15 polipeptídios³⁰, sendo que a hipermetilação do transcrito v2 do gene ocorre apenas em adenomas colorretais e câncer, enquanto os outros transcritos de *SEPT9* podem estar ou não-metilados em células normais e células neoplásicas³¹. Estudos utilizando ensaios sensíveis para análise de metilação do gene, demonstraram a importância do *SEPT9* como um biomarcador para o CCR^{32 33}, porém não se pode afirmar que a hipermetilação de *SEPT9* está presente em todos os tipos de células tumorais do cólon. O Epi proColon® é um teste de

rastreio minimamente invasivo que detecta a metilação aberrante do DNA na região v2 do gene *SEPT9* presente na biópsia líquida (plasma), possivelmente derivado de células apoptóticas desprendidas do tumor ²⁹. Em um estudo prospectivo realizado em uma população de rastreamento (PRESEPT - *Prospective Evaluation of Septin9*), foi avaliada presença do *SEPT9* metilado pelo teste Epi procolon® para a detecção adenoma avançado e CCR. Os resultados mostraram uma sensibilidade de 48,2% e especificidade de 91,5% para rastreamento do CCR em indivíduos assintomáticos acima de 50 anos, porém as sensibilidades de metilação na região promotora do *SEPT9* para detecção de adenoma avançado (sensibilidade de 11,2%) e CCR em estágio I (sensibilidade de 35,0%), foram relativamente baixas³⁴.

1.3 Biópsia líquida

O termo “biópsia líquida” se refere à análise em amostras de qualquer fluido corporal (sangue, saliva, urina). No câncer, este teste permite a análise de DNA derivado do tumor (ctDNA), diferentes tipos de RNAs, células tumorais circulantes (CTCs) e vesículas extracelulares como os exossomos. A utilidade clínica da biópsia líquida tem sido explorada na detecção de biomarcadores em diferentes fases clínicas do CCR, desde a detecção precoce, estadiamento, avaliação de resposta ao tratamento e mesmo a caracterização molecular da doença ^{35 36}.

As duas principais origens do cfDNA no organismo humano são por meio de mecanismos de morte celular como apoptose ou necrose, ou através da liberação ativa por mecanismos celulares, incluindo o transporte vesicular de ácidos nucleicos. Algumas situações podem ocasionar o aumento na liberação do cfDNA na circulação, incluindo: exercícios físicos, envelhecimento, reações inflamatórias e câncer³⁷. Estudos mostraram que a concentração média de cfDNA em soro de pacientes com CRC foi cinco vezes maior que em comparação com indivíduos saudáveis, enquanto que no plasma a concentração de cfDNA foi 25 vezes maior do que em controles saudáveis^{38 39}. Padrões aberrantes de metilação podem ser detectáveis no cfDNA e representam um biomarcador promissor para o diagnóstico precoce do câncer ³⁵.

Para a detecção de alterações no cfDNA, é preferível o uso de amostras de plasma ao invés de soro porque o último contém níveis mais elevados de cfDNA não tumoral, gerado a

partir da lise de leucócitos que ocorre com a coagulação do sangue durante a preparação do soro. Além disso, no soro pode ocorrer a diluição do ctDNA tumoral no nível total de cfDNA de leucócitos, afetando na detecção do ctDNA que contém alterações moleculares e epigenéticas (exemplo: metilação do DNA) em baixas frações de alelos⁴⁰. Em condições fisiológicas normais, a concentração de cfDNA no plasma também é muito baixa (<10 ng/ml) porque a maioria das células não vivas é removida de forma eficiente da circulação sanguínea pelos fagócitos⁴¹. Dessa forma, existe a necessidade do uso de plataformas sensíveis como o ddPCR, que tornam possível a análise de eventos raros, aumentando a confiabilidade de detecção de baixos níveis de concentração de cfDNA metilado.

Recentemente, foi demonstrado que a detecção de metilação de *SEPT9* no plasma pode ser usada na detecção do CCR avançado. Porém ainda não foi possível determinar se esse mesmo teste poderia ser utilizado para a detecção do adenoma avançado ou câncer precoce com bons resultados diagnósticos para sensibilidade e especificidade. Além disso, Rasmussen e colaboradores sugerem que a combinação da detecção de metilação de *SEPT9* e *BMP3* no plasma, aumenta a sensibilidade e especificidade de diagnóstico de câncer colorretal em comparação com a análise de um único gene⁴³.

Uma revisão sistemática com meta-análise sobre a detecção de metilação do gene *BMP3* (plasma e fezes) e metilação do gene *NDRG4* (fezes), como possíveis biomarcadores para a detecção do câncer colorretal está em andamento no contexto dessa dissertação. Análises preliminares indicam valores elevados de Odds Ratio (OR) para o CCR na presença da metilação do promotor do gene *NDRG4* nas fezes (OR= 13,990; IC95%= 8,702 – 22,492; p<0,001; Figura 4), do gene *BMP3* nas fezes (OR= 4,181; IC 95%= 2,305 – 4,707; p<0,001; Figura 6) e do gene *BMP3* no plasma (OR= 4,956; IC 95%= 2,971 – 8,269; p<0,001; Figura 5) em comparação com os controles sem câncer, indicando um maior risco de desenvolvimento do CCR quando existe a presença da metilação destes genes.

Além disso, também se observa valores elevados de Odds Ratio (OR) para os adenomas avançados na presença da metilação do promotor do gene *BMP3* nas fezes (OR= 2,580; IC 95%= 1,120 – 5,940; p<0,01; Figura 7) em comparação com os controles sem câncer, indicando um maior risco de desenvolvimento de adenomas quando existe a presença da metilação deste gene nas lesões (Adhara Lima et al., manuscrito em preparação).

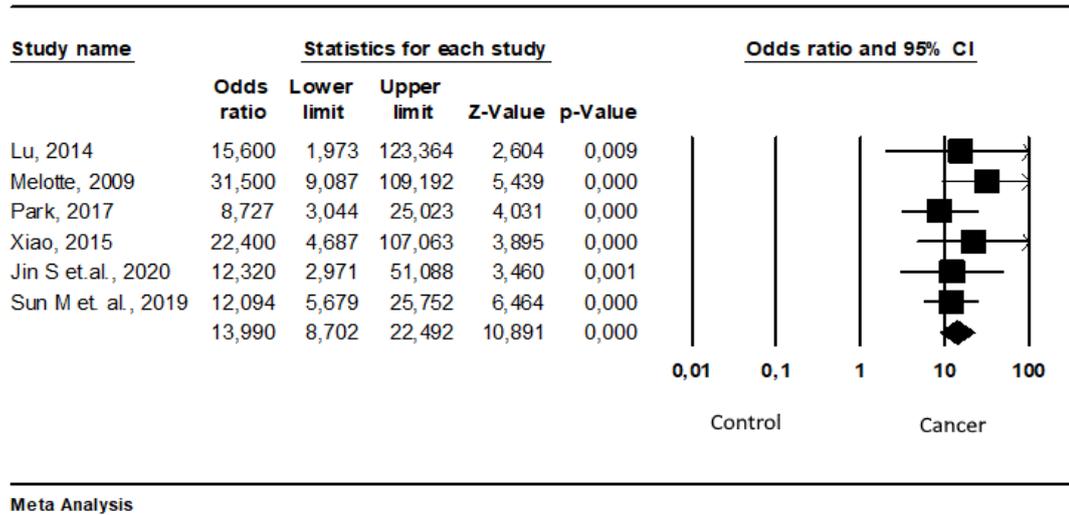


Figura 4- *Forest Plot* de efeito aleatório para associação da metilação do promotor do gene *NDRG4* em amostras de fezes e o risco de câncer colorretal (LIMA, A.B. et al. Manuscrito em fase de preparação).

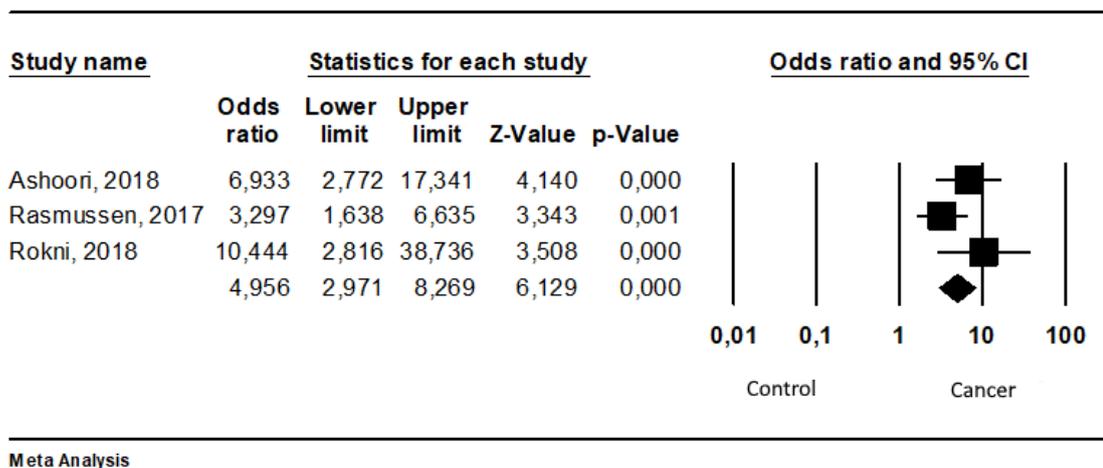
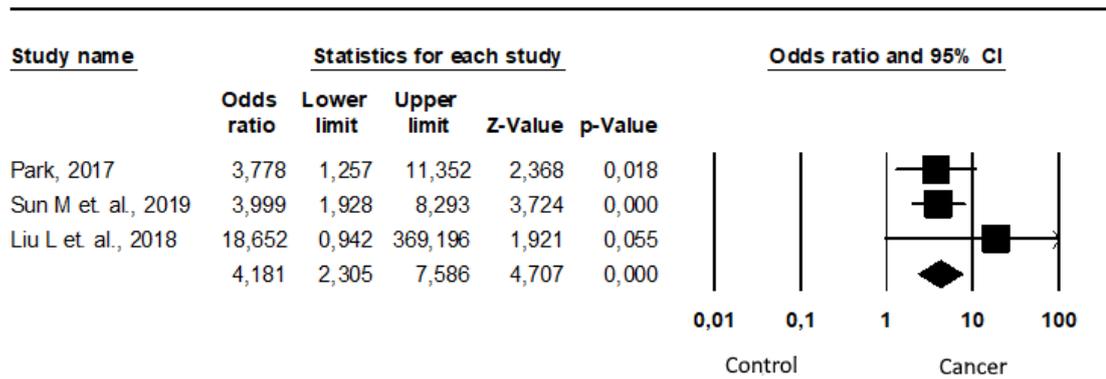
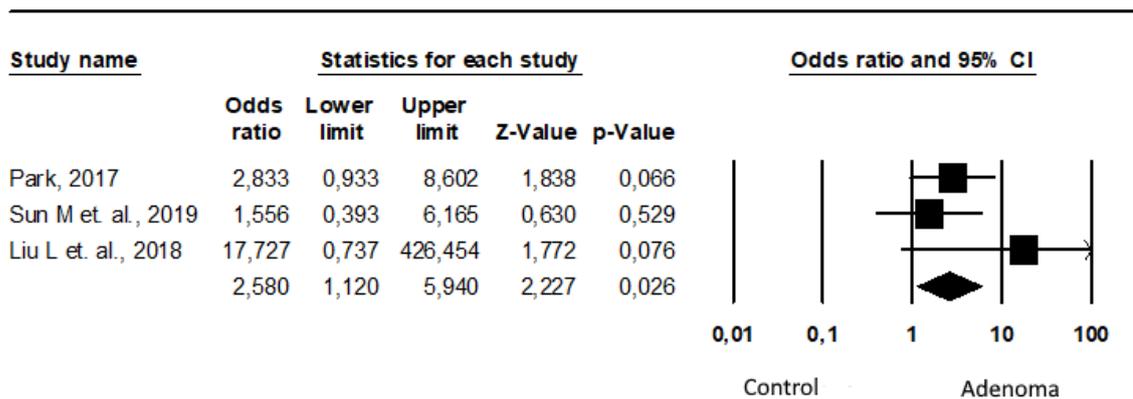


Figura 5- *Forest Plot* de efeito aleatório para associação da metilação do promotor do gene *BMP3* em amostras de plasma e o risco de câncer colorretal (LIMA, AB et al. Manuscrito em fase de preparação).



Meta Analysis

Figura 6- Forest Plot de efeito aleatório para associação da metilação do promotor do gene *BMP3* em amostras de fezes e o risco de câncer colorretal (LIMA, AB et al. Manuscrito em fase de preparação).



Meta Analysis

Figura 7- Forest Plot de efeito aleatório para associação da metilação do promotor do gene *BMP3* em amostras de fezes e o risco de adenomas (LIMA, AB et al. Manuscrito em fase de preparação).

A maioria dos trabalhos incluídos nesta revisão sistemática são estudos retrospectivos e incluem diferentes populações para os as amostras de casos e controles^{43 44}. Estudos em população de rastreamento, que apresentam risco médio para o CCR, podem melhor caracterizar as alterações moleculares no plasma como biomarcadores para a detecção precoce do câncer colorretal.

1.4 Programa de rastreamento do CCR no Hospital de Câncer de Barretos

Iniciou-se no Hospital de Amor - Hospital de Câncer de Barretos (HCB) em julho de 2015, o programa de rastreamento organizado do CCR que tem como exame primário o teste imunológico de sangue oculto nas fezes (FIT) seguido da colonoscopia nos casos de FIT positivo⁴⁵. A população alvo é constituída de indivíduos atendidos no ambulatório de prevenção do HCB, com idade entre 50 e 65 anos e sem história pessoal de CCR, de pólipos do intestino, de doença inflamatória intestinal e colonoscopia ou retossigmoidoscopia nos últimos 5 anos. Apesar dos participantes do rastreamento serem originados de diversas regiões do Brasil, a maioria da população que adere ao programa é originada do estado de São Paulo, sendo em sua maior parte das cidades da região (DRS) de Barretos.

Os resultados dos 2 primeiros anos do programa de rastreamento foram recentemente publicados⁴⁵. Entre 2015 e 2017, foram atendidos 6.737 indivíduos no Ambulatório de Prevenção ou nas Unidades Móveis da instituição, que atendem 18 municípios da região da DRS de Barretos. Os participantes tinham entre 50 e 65 anos de idade e foram convidados pessoalmente por um agente de saúde ou enfermeiro. Para avaliação da qualidade e eficácia do programa, foram avaliadas as diretrizes da União Europeia (UE) para programas de rastreamento do câncer colorretal. No geral, 92,8% dos participantes retornaram o FIT para análise, com uma taxa de exames inadequados de 1,5%. Entre os 6.253 testados, 12,5% tiveram resultado positivo. A taxa de adesão da colonoscopia foi de 84,6% com taxas de colonoscopias completas de 98,2%. Os valores preditivos positivos (do inglês, *positive predictive value* - PPVs) foram 60,0%, 16,5% e 5,6% para adenoma, adenoma avançado e câncer, respectivamente. Vale ressaltar, que os estádios dos tumores detectados pelo programa de rastreamento foram significativamente mais precoces do que aqueles relatados nos registros de câncer colorretal nacional (pelo Instituto Nacional de Câncer -INCA),

do Estado de São Paulo (pela Fundação Oncocentro de São Paulo -FOSP) e no registro do Hospital de Câncer de Barretos no mesmo período e na mesma faixa etária.

Desde 2016, no momento do convite e aceitação em participar do programa, os indivíduos assinam o termo de consentimento e para cada participante é perguntado se aceitaria fornecer fluidos corpóreos, tais como sangue e o próprio FIT, para armazenamento no biobanco da instituição para futuros estudos de testes moleculares de rastreamento.

Neste contexto, este projeto teve como motivação investigar biomarcadores no plasma dos participantes do programa de rastreamento do HCB e compará-los com os achados da colonoscopia nos casos FIT positivos, com o objetivo futuro de aumentar as taxas de detecção do adenoma, adenoma avançado e câncer.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer colorretal possui alta incidência e mortalidade na população brasileira e em razão disso, existe a necessidade do diagnóstico do câncer no estágio inicial em vista de melhorar a taxa de sobrevivência dos pacientes e detectar lesões precursoras como forma de prevenção e redução da incidência. Os programas de rastreamento têm um papel fundamental na detecção de lesões precursoras e precoce do câncer, diminuindo a incidência e mortalidade pelo CCR. Entretanto, existe a necessidade do desenvolvimento de tecnologias não invasivas que sejam significativamente sensíveis para esse objetivo. Com base nisso, o presente projeto buscou analisar a metilação do DNA de genes previamente descritos pelo grupo com perspectiva futura dessas alterações serem investigadas no rastreamento molecular do CCR.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a metilação dos genes supressores de tumor *SEPT9* e *BMP3* como biomarcadores de detecção do câncer colorretal e de suas lesões precursoras.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o padrão de metilação dos genes *SEPT9* e *BMP3* em amostras de plasma de participantes do programa de rastreamento submetidos à colonoscopia após um teste FIT positivo.
- Correlacionar as alterações epigenéticas no plasma com os achados da colonoscopia (câncer, adenoma avançado, adenoma precoce e colonoscopia sem lesões clinicamente significativas ou normal).
- Analisar a sensibilidade e especificidade das alterações epigenéticas na detecção das lesões colorretais clinicamente significativas (adenoma, adenoma avançado e CCR).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo e população

Estudo observacional transversal com análise molecular retrospectiva, utilizando amostras de plasma dos participantes do programa de rastreamento do CCR que apresentaram FIT positivo e que foram submetidos à colonoscopia diagnóstica, e da população de pacientes diagnosticados com CCR e tratados no Hospital de Câncer de Barretos.

4.2 Cálculo amostral

O tamanho da amostra ideal estimado para o estudo foi calculado considerando o intervalo de confiança de 95%, assumindo uma margem de erro de 6%. Segundo a análise prévia ⁴³, considerando a frequência de metilação para os genes *SEPT9* (24,4%) e *BMP3* (28%), estima-se um número amostral de 197 e 215 participantes, respectivamente.

O cálculo amostral foi realizado com auxílio do software R (v. 4.0.5.) utilizando a seguinte equação:

$$n = \frac{(Z^2 \times p \times (1-p))}{e^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

Z= Intervalo de confiança

p= Proporção esperada

e= Margem de erro.

4.3 Critérios de seleção da população

4.3.1 Critérios de inclusão

População de rastreamento:

Participantes incluídos no programa de rastreamento do Hospital de Câncer de Barretos entre os anos de 2016 e 2019, que obtiveram resultado do teste de sangue oculto nas fezes positivo, realizado colonoscopia diagnóstica e que aceitaram a coleta da amostra biológica. Todos os pacientes concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando o uso do material biológico para pesquisa. Após processamento do

sangue, o plasma foi armazenado no Biobanco do HCB ⁴⁶ até o momento do uso em técnicas experimentais.

População de CCR:

Com o intuito de aumentar o número de amostras de pacientes com câncer, foram incluídos pacientes diagnosticados com CCR no Hospital de Câncer de Barretos entre os anos de 2016 e 2019, submetidos a ressecção cirúrgica e que apresentaram a amostra biológica (plasma) coletada e armazenada no Biobanco do HCB ⁴⁶ até o momento do uso em técnicas experimentais.

4.3.2 Critérios de exclusão

Pacientes com história familiar de CCR, doença inflamatória intestinal, história pessoal prévia de CCR ou outro tipo de câncer, história de cirurgia prévia do cólon e reto e que tenham realizado a coleta de sangue a mais de 6 meses da colonoscopia ou da cirurgia.

4.4 Variáveis coletadas

As características demográficas, epidemiológicas, endoscópicas dos participantes do programa de rastreamento e histológicas das lesões colorretais encontradas e ressecadas foram coletados de forma retrospectiva em um banco de dados do REDCap (*Research Electronic Data Capture*)⁴⁷ desenvolvido especificamente para o programa de rastreamento.

As lesões encontradas foram ressecadas ou biopsiadas de acordo com a avaliação do endoscopista e caracterizadas endoscopicamente de acordo com a classificação de Paris ⁴⁸. O adenoma foi classificado como avançado quando: na presença de displasia de alto grau ou de pelo menos 25% de componente viloso ou aqueles de tamanho maior ou igual a 10mm, e os adenocarcinomas intramucosos (carcinoma *in situ*)¹⁶. Quanto a localização, as lesões foram categorizadas como proximal (lesões proximais do ceco, ascendente, transverso e flexuras hepática e esplênica) ou distal (cólon descendente, sigmóide e reto).

Quando mais de uma lesão foi encontrada no mesmo participante do estudo, os participantes foram estratificados de acordo com a lesão de pior prognóstico detectada na colonoscopia na seguinte ordem decrescente de gravidade: câncer colorretal, adenoma avançado, adenoma precoce, lesão séssil serrilhada, pólipos hiperplásicos ou sem lesões.

4.5 Coleta das amostras e extração de cfDNA

Para cada participante incluído neste estudo foi realizada coleta de 2 a 5ml de sangue periférico por punção intravenosa com agulhas e tubos *BDvacuntainer*[®] descartáveis. As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 1.500rpm e o plasma coletado é mantido a -80°C até o momento do uso. A fim de evitar contaminações celulares e enriquecer a quantidade de cfDNAs, foram seguidas as recomendações de Sherwood et al. e o plasma foi transferido para tubos novos de 2mL e centrifugado novamente 16.000g por 10 minutos a 4°C e então o protocolo de extração foi iniciado⁴⁹.

A extração de cfDNA foi realizada utilizando o *QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit* (Qiagen) segundo as recomendações do fabricante. O primeiro passo consiste na lise do material pela adição de 100 à 300µL de *QIAGEN Proteinase K* (dependo do volume de plasma utilizado para extração) em um tubo de 50mL, com posterior adição de 3 a 5mL de plasma e 2,4mL ou 4mL de *Buffer ACL* (contendo 1.0 µg de RNA carreador) e homogeneização no vórtex por 30 segundos. O volume de *buffer ACL* varia de acordo com o volume inicial de plasma. Esta solução é incubada a 60°C por 45 minutos e então, com o tubo em temperatura ambiente, são adicionados 5,4mL ou 9mL de *buffer ACB* e as amostras são homogeneizadas por 30 segundos. A mistura contendo a solução pós processo de lise e *buffer ACB* é incubada em gelo por 5 minutos e então transferida para um tubo conector de 20mL acoplado às colunas *QIAampMini column* posicionadas no *VacConnector* do equipamento *QIAvac 24 Plus*. Após a passagem do lisado pela coluna, o tubo de 20mL é descartado. São adicionados 600µL de *buffer ACW1* à coluna e após a passagem do líquido, seguidos de 750 µL do *buffer ACW2* e então 750µL de etanol 100%. A coluna é então removida do *QIAvac 24 Plus*, posicionada em um tubo coletor e então a coluna centrifugada a 20.000g por 3 minutos. Com a tampa aberta, as colunas são mantidas a 56°C por 10 minutos para a secagem da membrana. A coluna é então transferida para um novo tubo coletor e 30µL de água ultrapura são adicionados aos tubos e estes incubados em temperatura ambiente por 3 minutos, com posterior centrifugação a 20.000g por 1 minuto para eluição dos ácidos nucleicos, resultando em um volume final de 30µL de cfDNA extraído. Após a extração do cfDNA, as amostras foram quantificadas por ensaio fluorimétrico *dsDNA High Sensitivity* no equipamento *Qubit 2.0* (Invitrogen), armazenadas a -80°C até o momento da sua utilização.

Todas as quantificações de cfDNA foram normalizadas de acordo com volume de plasma extraído, de acordo com a seguinte fórmula⁵⁰:

$$\frac{\text{Concentração cfDNA (ng/\mu L)} \times \text{Volume eluição}}{\text{Volume de plasma na extração de cfDNA}} \quad (\text{Eq. 2})$$

4.6 Análise do tamanho de fragmentos de cfDNA

O sistema de *TapeStation* utiliza um método automatizado de eletroforese capaz de realizar o controle de qualidade de amostras por meio da quantificação ou análise do tamanho do fragmento do material estudado. O kit *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (Agilent®) foi utilizado para a análise do tamanho do fragmento do cfDNA. Para este ensaio o marcador de tamanho molecular (*Ladder*) da corrida foi preparado misturando-se 2µL do reagente *High Sensitivity d1000 Sample Buffer* (Agilent®) com 2µL de *High Sensitivity d1000 Ladder* (Agilent®). As amostras foram preparadas adicionando-se 2µL de *High Sensitivity D1000 Sample Buffer* (Agilent®), 2µL da amostra de DNA seguida da homogeneização no vórtex a 2.000 rpm por 1 minuto. Para a análise, as amostras foram carregadas no cartucho pelo equipamento *2200 TapeStation* (Agilent®) e analisadas pelo *2200 TapeStation Controller Software* (Agilent®) após a corrida.

No ensaio de avaliação da qualidade da amostra, observou-se que os valores obtidos após a corrida coincidem com o tamanho dos fragmentos de cfDNA apresentados na literatura, possuindo uma variação de 100 à 200 pares de bases (pb) ⁵¹. Foram avaliadas 22 amostras e o valor da mediana foi de 165,5 pb (145-186 pb). Os resultados representativos de três amostras estão apresentados na figura 8. A amostra 1 (Figura 8A) apresentou fragmentos com aproximadamente 145 pb, a amostra 2 apresentou fragmentos com 158 pb (Figura 8B), enquanto a amostra 3 apresentou fragmentos com 186 pb (Figura 8C).

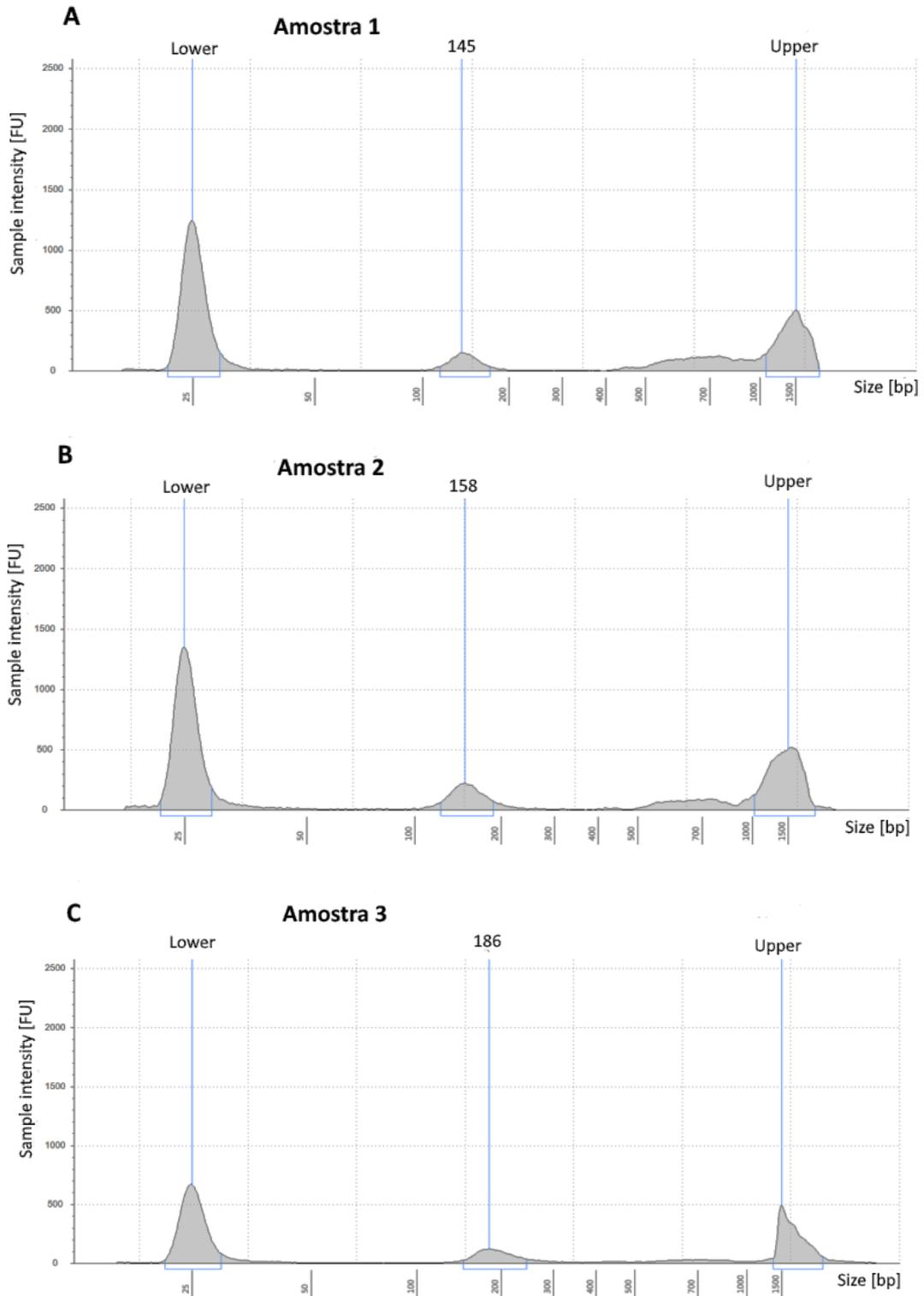


Figura 8 - Tamanhos dos fragmentos de DNA livre circulante extraídos de três amostras representativas incluídas no estudo.

4.7 Modificação do cfDNA por bissulfito de sódio

Esta metodologia permite a conversão de todas as citosinas não-metiladas do DNA em uracilas enquanto as citosinas metiladas se mantêm como citosinas, permitindo identificar o *status* de metilação de CpGs por PCR.

Os DNAs comerciais controles 100% metilado e não-metilado (*Human methylation DNA* – Zymo Research) e o DNA extraído das amostras, foram convertidos por bissulfito de sódio com o kit *EZ DNA Methylation Gold* (Zymo Research) seguindo as recomendações da fabricante.

Inicialmente, ocorre a preparação do *CT Conversion Reagent* com a adição de 900µL de água ultrapura, 50µL de *M-Dissolving Buffer* e 300µL de *M-Dilution Buffer*. Adiciona-se 130µL deste reagente de conversão a 20µL do DNA da amostra em um tubo de PCR, tubo este que é levado ao termociclador PROFLEX (Applied Biosystems) com as seguintes condições: 98°C por 10 minutos, 64°C por 2,5 horas e 4°C para a etapa final de ciclagem.

Após a PCR, adiciona-se 600µL de *M-binding Buffer* em uma coluna *ZYMO-Spin IC* posicionada em um tubo coletor. A amostra é colocada na coluna e o material é homogeneizado por inversão. Centrifuga-se o tubo na maior velocidade (>10.000 g) por 30 segundos, descartando o líquido filtrado. Em seguida, 100µL do reagente *M-Wash Buffer* é adicionado à coluna e centrifugado (>10.000 g por 30 segundos). Após, 200µL do reagente *M-Desulphonation Buffer* é adicionado à coluna e incubado à temperatura ambiente por 15 minutos, e após este tempo o tubo é centrifugado (>10.000 g por 30 segundos). Mais uma vez, 200µL do *M-Wash Buffer* é adicionado à coluna e centrifugado. Este último passo de lavagem é repetido por duas vezes. A coluna é colocada em um tubo de 1,5mL onde é adicionado 10µL de água ultrapura, deixado 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugado por 30 segundos para a eluição do DNA.

Para os ensaios de padronização, 1.000 ng de DNA controles 100% metilado e não-metilado (*Human methylation DNA* – Zymo Research) foram convertidos por bissulfito de sódio e eluídos em 40µL de água ultrapura, obtendo-se uma concentração pós-conversão de 25 ng/µL. Para análise de metilação nas amostras, um total de massa de até 40 ng de DNA foram convertidas (dependendo da quantificação da amostra) e eluídas em 20µL de água ultrapura.

4.8 Padrão de metilação dos genes *SEPT9* e *BMP3* por *droplet digital PCR*.

Após o tratamento e conversão do DNA com bissulfito de sódio, a quantidade absoluta de cópias metiladas dos genes de interesse foi determinada por PCR Digital (ddPCR) com o sistema *Droplet Digital PCR System* (ddPCR) (Bio-Rad). Na técnica de ddPCR, a contagem das moléculas de ácidos nucleicos encapsuladas em uma mistura de reagentes e óleo formam as partições de gotas, e estas são mensuradas por detecção de fluorescência fornecendo valores de quantificações absolutas.

Estudos recentes mostraram a utilização da técnica de discriminação alélica para detecção e análise da metilação de DNA. Essa técnica utiliza *primers* (que não contém os dinucleotídeos CG na sua sequência) flanqueando a região de interesse, e sondas desenhadas para identificação de regiões metiladas e não-metiladas dentro dessa região, marcadas com diferentes fluoróforos ⁵² ⁵³. Para a sua realização, foram desenhados *primers* e sondas específicas para detecção dos alelos metilados dos genes *SEPT9* e *BMP3*, e as características de cada primer foram checadas utilizando a ferramenta *OligoAnalyzer Tool* (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequências dos *primers* senso e anti-senso, tamanhos dos produtos de amplificação e sítios CpGs analisados por ddPCR.

Gene	<i>Primers</i> e sondas (5' - 3')	Produto	Sítios CpG
<i>SEPT9 v2</i>	Senso: AAATAATCCCATCCAATA Anti-senso: GTTGTTTATTAGTTATTATGT Sonda metilada: (FAM) TTAACCGCGAAATCCGAC Sonda não- metilada: (HEX) TTAACCACAAAATCCAACATAAT	60 pb	3
<i>BMP3</i>	Senso: GTAGTAAGTGGGGTTGGT Anti-senso: ATTAAACTCCAAACCACTAAAAC Sonda metilada: (FAM) TTGTATTGCGTTCGCGTTTC Sonda não- metilada: (HEX) TTGTATTTGGTTGTGTTTGGG	129 pb	3

Para a realização da técnica de ddPCR, cada reação foi preparada para um volume final de 20µL contendo 900nM de *primers* senso e anti-senso, 250nM de sonda, 2X ddPCR™ *SuperMix for Probes* (no dUTP) (Bio-Rad) e até 10 ng de DNA convertido por bissulfito. O volume final da reação foi carregado no DG32™ *Automated Droplet Generator Cartridges* (Bio-

Rad) e então, 70µL do reagente *Automated Droplet Generation Oil for Probes* (Bio-Rad) foi adicionado em cada poço do cartucho, e a junção da amostra com o óleo pelo *Automated Droplet Generator* (Bio-Rad) formaram gotas.

As gotas geradas foram transferidas para uma placa de PCR e submetidas à amplificação no termociclador *C1000 Touch™ Thermal Cycle96-Deep Well Reaction Module* (Bio-Rad). As condições de temperatura dos ensaios foram: 1) 95°C (10 minutos), 2) 39 ciclos de 94°C (30 segundos) e temperatura de anelamento específica para cada gene (1 minuto), 98°C (10 minutos) e 4°C até a retirada das amostras do equipamento.

As gotas de cada poço da placa foram lidas através do leitor de fluorescência para duas cores *QX200™ Droplet Reader* (Bio-Rad), a fim de determinar quantas gotas foram positivas para alelos metilados (FAM) e alelos não-metilados (HEX) dos genes *SEPT9* e *BMP3*. Em todos os experimentos foram incluídas amostras controle 100% metilado e não-metilado (*Human methylation DNA* – Zymo Research) e controles contendo todos os componentes da reação com exceção do DNA *template* (NTC- *Non Template Control*). O número de moléculas metiladas e não-metiladas para cada gene foram medidas em concentrações de cópias por µL de reação de PCR, sendo 20µL o volume total da reação (Figura 9).

Os dados foram analisados utilizando o software *QuantaSoft* (*QuantaSoft v1.7.4*, Bio-Rad). Para o cálculo da porcentagem de metilação (*Status* de metilação) de cada gene alvo nas amostras foi utilizado o número de cópias para 20 µL de reação, seguindo a expressão ⁵⁴:

$$\frac{\text{DNA metilado}}{\text{DNA metilado} + \text{DNA não metilado}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

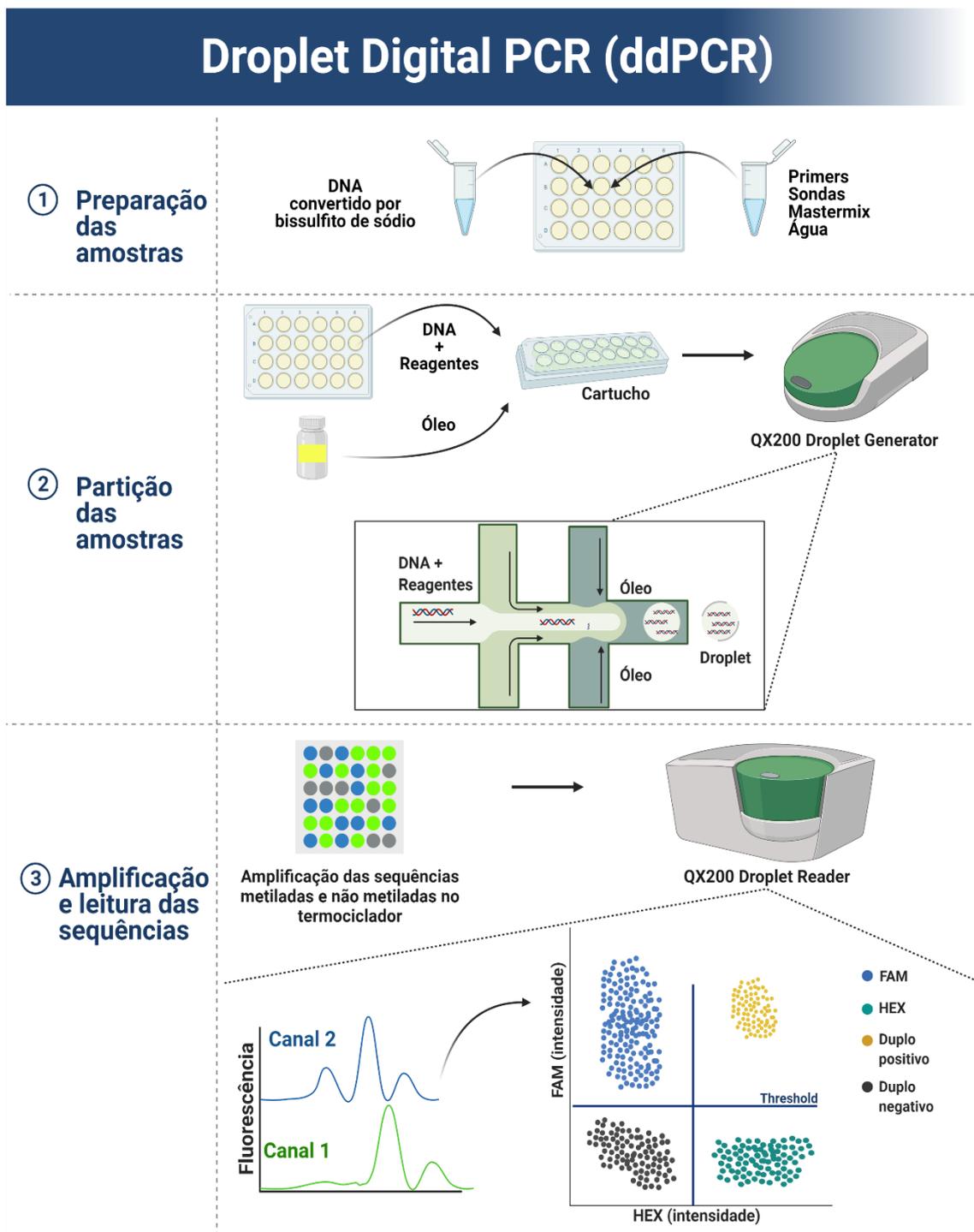


Figura 9 - Etapas para a realização da técnica de *droplet digital PCR* (ddPCR) (LIMA, AB et al. Manuscrito em fase de preparação).

4.8.1 Padronização dos ensaios de *droplet digital PCR*.

Para assegurar a eficiência da reação, vários ensaios foram realizados com a finalidade de determinar parâmetros relevantes para posterior aplicação da técnica nas amostras do estudo. Os ensaios realizados foram: a definição da temperatura ótima de anelamento dos *primers* e sondas com a sequência alvo através do ensaio de gradiente de temperatura, ensaio de confirmação das temperaturas escolhidas em amostras com *status* de metilação conhecido e a detecção dos Limites de Branco (LoB) e Limite de Detecção (LoD) para cada gene (Figura 10).

Fases	Gradiente de Temperatura		Ensaio de sensibilidade	
Gradiente de temperatura	Temperatura de anelamento (ddPCR)	Eficiência da curva de amplificação (qMSP)		
Ensaio de confirmação	Ensaio em DNA de tecido com status de metilação conhecido (ddPCR)			
Parâmetros analíticos			Limite de branco (LoB)	Limite de detecção (LoD)

Figura 10 - Ensaio de padronização realizados para a técnica de *droplet digital PCR* (ddPCR).

O processo de otimização dos ensaios de detecção de metilação dos genes *SEPT9* e *BMP3* por ddPCR foi executado com a utilização de DNA comercial 100% metilado e não-metilado. Em cada poço foi adicionado a mesma proporção de DNA metilado (0,5µL) e não-metilado (0,5µL), resultando em um volume de 1µL de DNA 50% metilado (10 ng).

4.8.1.1 Ensaio do gradiente de temperatura

Inicialmente, realizou-se o gradiente de temperatura por ddPCR para determinação da temperatura de anelamento dos *primers* e sondas na sequência-alvo. Para o teste das temperaturas de anelamento dos *primers* e sondas, foram escolhidos valores de acordo com o cálculo da média entre as temperaturas de *melting* dos *primers* senso e anti-senso através da análise pela ferramenta *OligoAnalyzer Tool* (IDT DNA) ⁵⁵. Os valores selecionados foram aplicados nos ensaios de gradiente de temperatura que avaliaram a temperatura ótima dos *primers* para os genes *SEPT9* e *BMP3*. As temperaturas testadas para o gene *SEPT9* foram: 46°C, 47°C, 48.6°C e 51°C (Figura 11). Para o gene *BMP3* as temperaturas testadas foram: 48.8°C, 50°C, 51.3°C, 53.8°C, 56.7°C, 59.1°C (Figura 12).

Os parâmetros utilizados para a escolha da melhor temperatura de anelamento dos genes *SEPT9* e *BMP3* estão apresentados nas Figuras 11 e 12, respectivamente. Os parâmetros utilizados foram: **(a)** o número de gotas totais e positivas geradas na reação (número de gotas totais: coluna verde escuro; positivas para metilação: coluna azul; positiva para não-metilação: coluna verde claro); **(b)** a amplitude da fluorescência detectada para as sondas metilada e não-metilada (eventos positivos para metilação: gotas em azul; não-metilação: gotas em verde; negativos: gotas em cinza); **(c)** a concentração de cópias metiladas e não-metiladas por μL de reação.

Os experimentos considerados válidos para a análise de todas as corridas do ddPCR foram aqueles que apresentaram eventos totais (coluna verde escura) acima de 10.000 gotas para todos os genes (Figuras 11a, 12a).

SEPT9

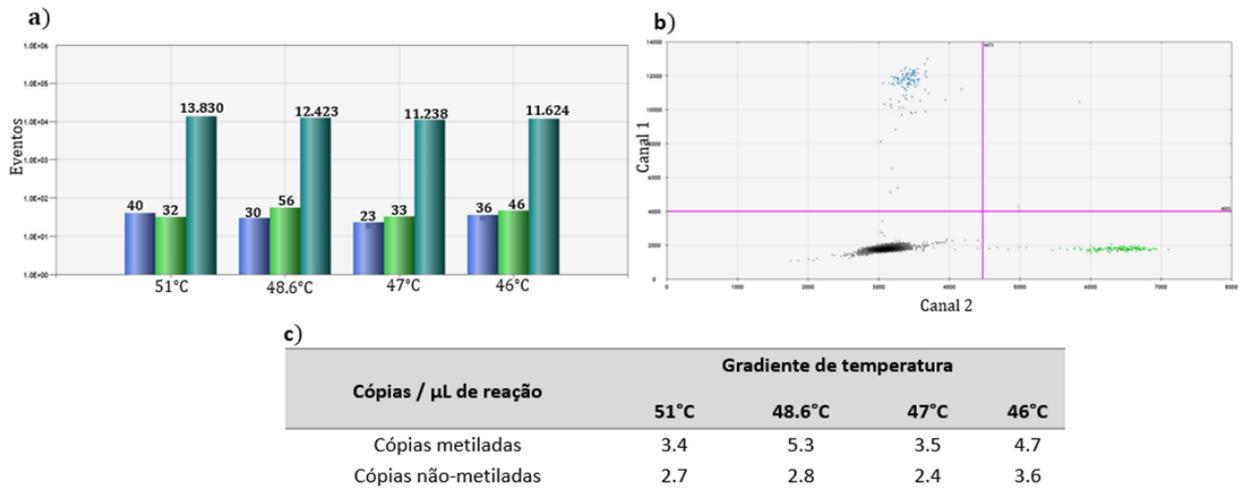


Figura 11 - Gradiente de temperatura para o gene *SEPT9*. a) Número de eventos. b) Amplitude de fluorescência para a temperatura de 47°C. c) Concentração de cópias por μL de reação.

BMP3

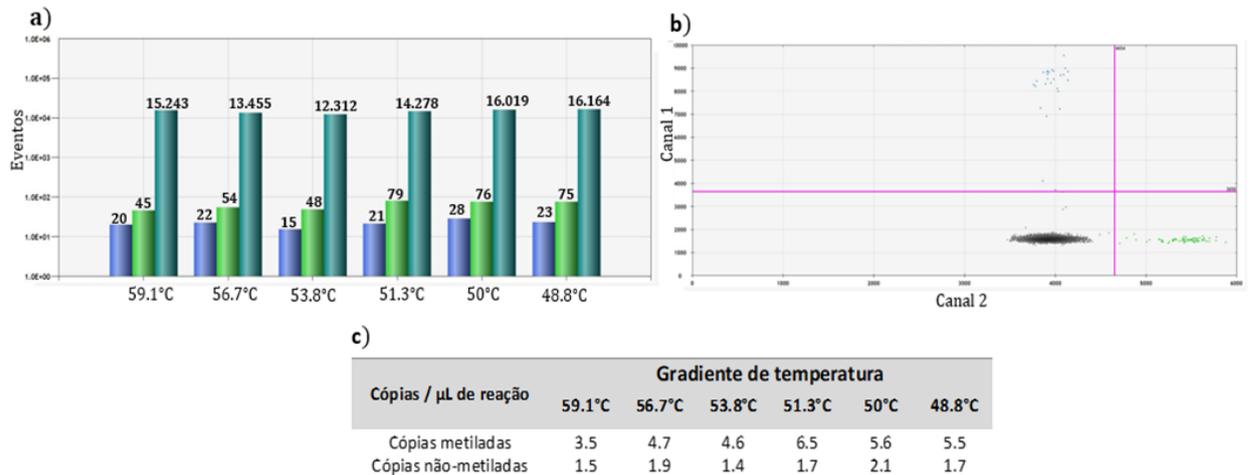


Figura 12 - Gradiente de temperatura para o gene *BMP3*. a) Número de eventos. b) Amplitude de fluorescência para a temperatura de 50°C. c) Concentração de cópias por μL de reação.

Dentre os resultados obtidos, foram consideradas como as melhores temperaturas de anelamento aquelas que apresentaram proporções similares de gotas positivas para as sondas metiladas e não-metiladas (Figuras 11a, 12a); que apresentaram separação mais evidente entre as populações de gotas negativas, gotas positivas para metilação e gotas positivas para a não-metilação (Figuras 11b, 12b) e valores próximos para a concentração de cópias metiladas e não-metiladas por microlitro de reação (Figuras 11c, 12c);

Levando em consideração os parâmetros acima, as temperaturas selecionadas para cada gene foram:

- *SEPT9*: 47°C
- *BMP3*: 50°C

Após a escolha das temperaturas ideais de anelamento para cada gene, realizou-se a análise da curva de amplificação dos *primers* e sondas para os genes *SEPT9* e *BMP3* por PCR em Tempo Real Quantitativo Metilação Específica (qMSP).

Amostras de DNA de uma linhagem celular de adenocarcinoma colorretal (HCT15) já utilizada para testes no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do HCB, foram selecionadas como controle metilado e amostras de DNA de sangue foram utilizadas como controle não-metilado da reação. A linhagem HCT15 apresenta as seguintes características: *status* de MSI presente, mutação em *KRAS* no códon G13D e mutação nos genes *PIK3CA* e *TP53*. A escolha da linhagem celular HCT15 foi baseada em um projeto anterior do grupo de pesquisa, no qual estas células foram consideradas metiladas para os genes do estudo, utilizando a técnica de pirosequenciamento⁵⁶.

Para a construção das curvas, foram realizadas diluições com fator de 10x da amostra controle metilada (linhagem HCT15) e não-metilada (DNA de sangue). As amostras M100% e U100% se referem ao DNA 100% metilado e DNA 100% não-metilado, respectivamente. As amostras M10% e U10% se referem ao DNA 10% metilado (diluído em 90% de DNA não-metilado) e DNA 10% não-metilado (diluído em 90% de DNA metilado), respectivamente. Neste experimento foram testadas para cada gene, as sondas metiladas e não-metiladas (isoladas e em conjunto) para cada DNA e seus diferentes fatores de diluição (Tabela 2).

Tabela 2- Valores experimentais para análise dos primers e sondas por qMSP.

Amostra	Volume de DNA por poço	Concentração final por poço
M100%	5 µL DNA M	10 ng
M10%	4,5 µL DNA U + 0,5 µL DNA M	
U100%	5 µL DNA U	
U10%	4,5 µL DNA M + 0,5 µL DNA U	

M: DNA metilado da linhagem celular HCT15. **U:** DNA não-metilado de sangue. **M100%:** DNA 100% metilado; **M10%:** DNA 10% metilado; **U100%:** DNA 100% não-metilado; **U10%:** DNA 10% não-metilado.

Após o preparo dos pontos de diluição, as reações para o ensaio de qMSP foram processadas utilizando os seguintes reagentes: 250nM de *primers* (ThermoFisher Scientific), 900nM de sondas (ThermoFisher Scientific), 10µl de MasterMix (Promega) e 5µL de DNA conforme descrito na Tabela 2. Em todos os experimentos foram incluídos um controle negativo de contaminação da reação (NTC; *No Template Control*) e as reações foram realizadas em duplicatas.

A reação de qMSP compreendeu em uma etapa inicial de incubação por 2 minutos à 94°C para a ativação da enzima *Taq* polimerase, seguidos de 45 ciclos de: 15 segundos à 95°C e 1 minuto à 47°C (para o gene *SEPT9*) ou 1 minuto à 50°C (Para o gene *BMP3*). Os resultados obtidos para o gene *SEPT9* estão apresentados nas figuras 13, 14 e 15 e para o gene *BMP3* estão apresentados nas figuras 16, 17 e 18. Analisando individualmente a curva de amplificação das sondas metiladas para os dois genes (Figuras 14 e 17) e não-metiladas (Figuras 15 e 18), e a curva de amplificação das sondas juntas em uma reação (Figuras 13 e 16), observou-se que tanto individualmente quanto em conjunto, o comportamento de amplificação das curvas apresentou o valor de Ct semelhante. Além disso, a presença das duas sondas em uma mesma reação não influenciou na ação uma da outra quanto à amplificação das sequências e emissão da fluorescência.

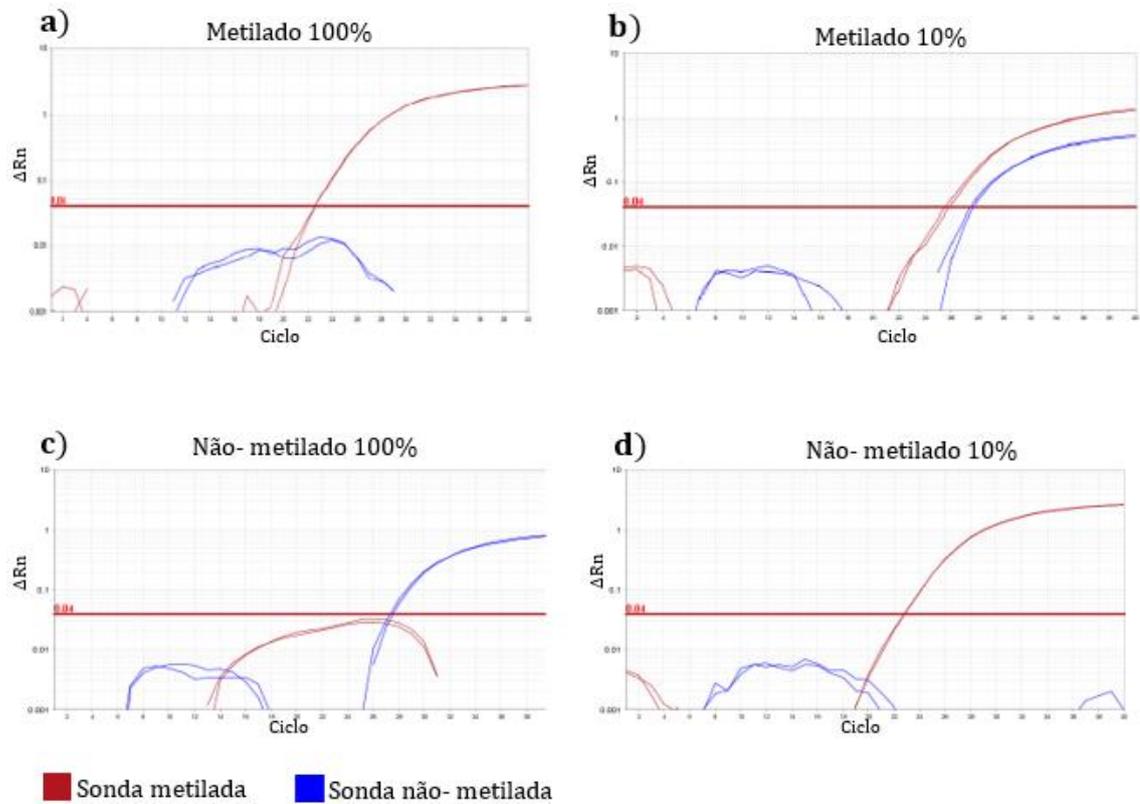
SEPT9**Sonda metilada e sonda não- metilada**

Figura 13 - Curva de amplificação dos primers e sondas metilada e não-metilada para o gene *SEPT9*. a) Duas sondas em DNA 100% metilado. b) Duas sondas em DNA 10% metilado. c) Duas sondas em DNA 100% não- metilado. d) Duas sondas em DNA 10% não- metilado.

SEPT9

Sonda metilada

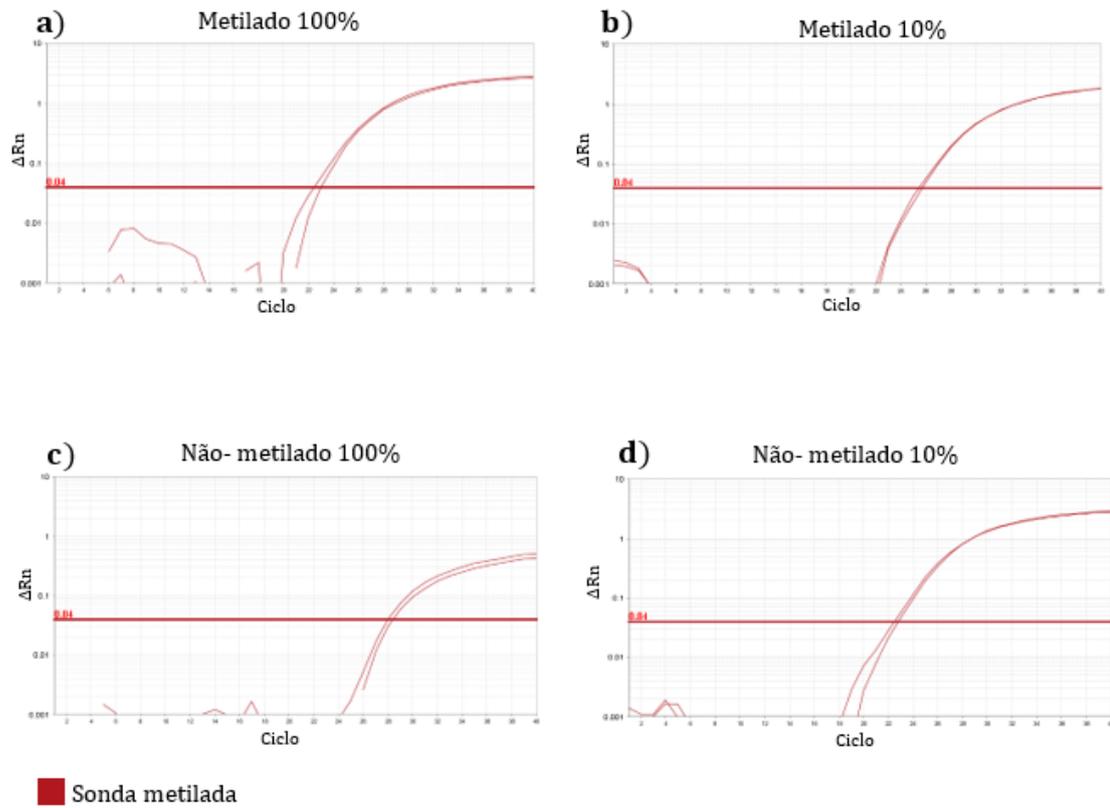


Figura 14 - Curva de amplificação dos primers e sonda metilada para o gene *SEPT9*. a) Sonda metilada em DNA 100% metilado. b) Sonda metilada em DNA 10% metilado. c) Sonda metilada em DNA 100% não-metilado. d) Sonda metilada em DNA 10% não-metilado.

SEPT9

Sonda não- metilada

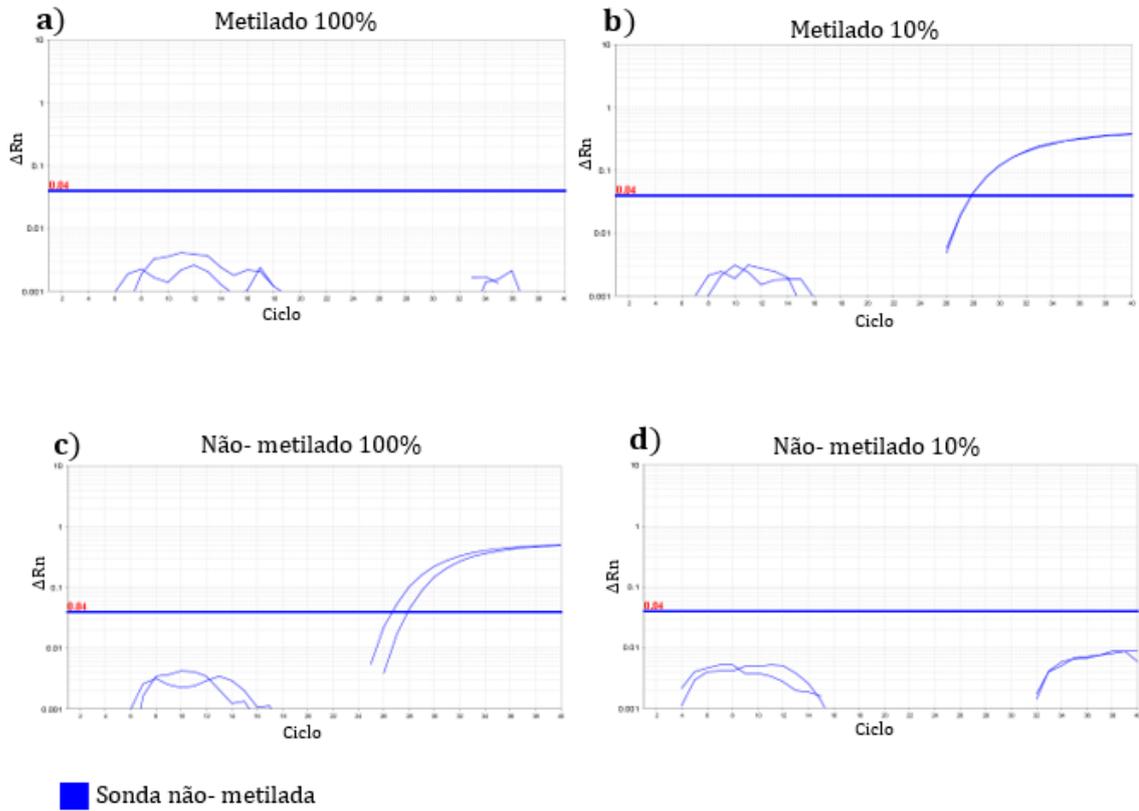


Figura 15 - Curva de amplificação dos primers e sonda não-metilada para o gene *SEPT9*. a) Sonda não-metilada em DNA 100% metilado. b) Sonda não-metilada em DNA 10% metilado. c) Sonda não-metilada em DNA 100% não- metilado. d) Sonda não-metilada em DNA 10% não- metilado.

BMP3

Sonda metilada e sonda não-metilada

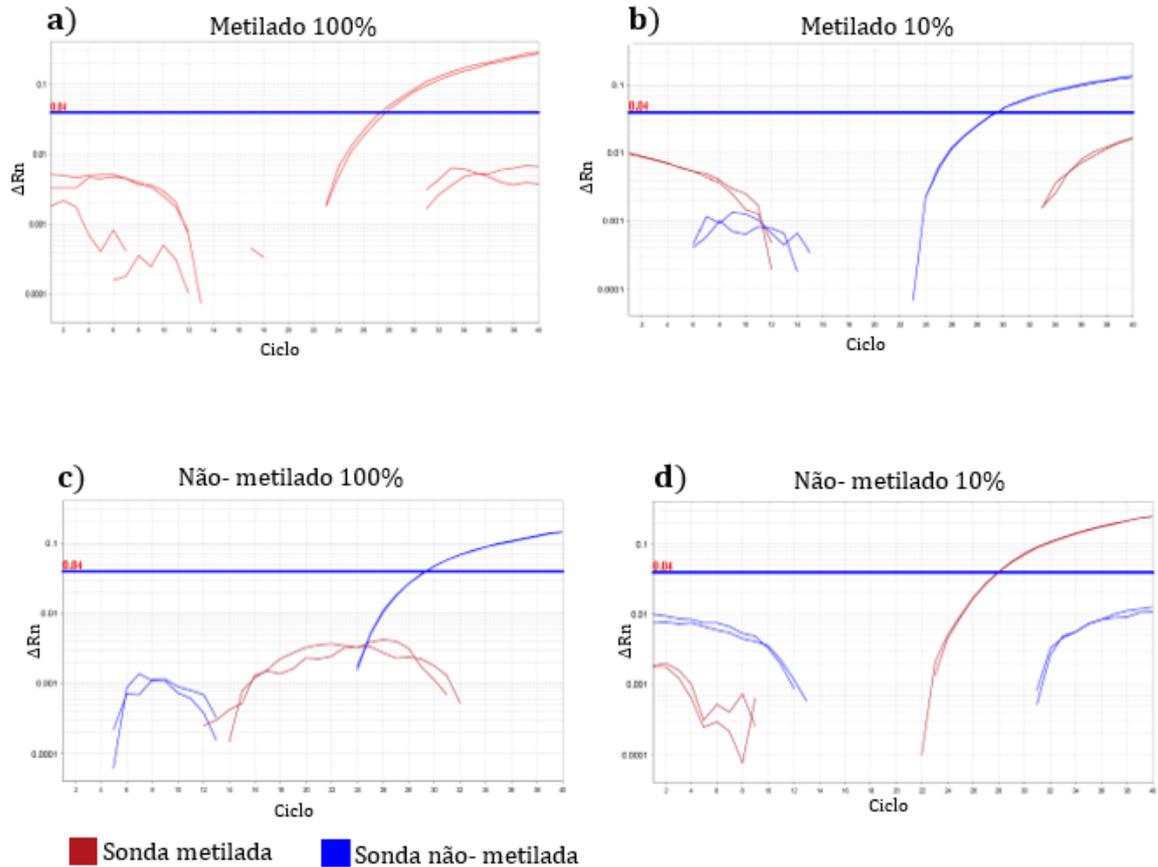


Figura 16 - Curva de amplificação dos primers e sondas metilada e não-metilada para o gene *BMP3*. a) Duas sondas em DNA 100% metilado. b) Duas sondas em DNA 10% metilado. c) Duas sondas em DNA 100% não- metilado. d) Duas sondas em DNA 10% não- metilado.

BMP3

Sonda metilada

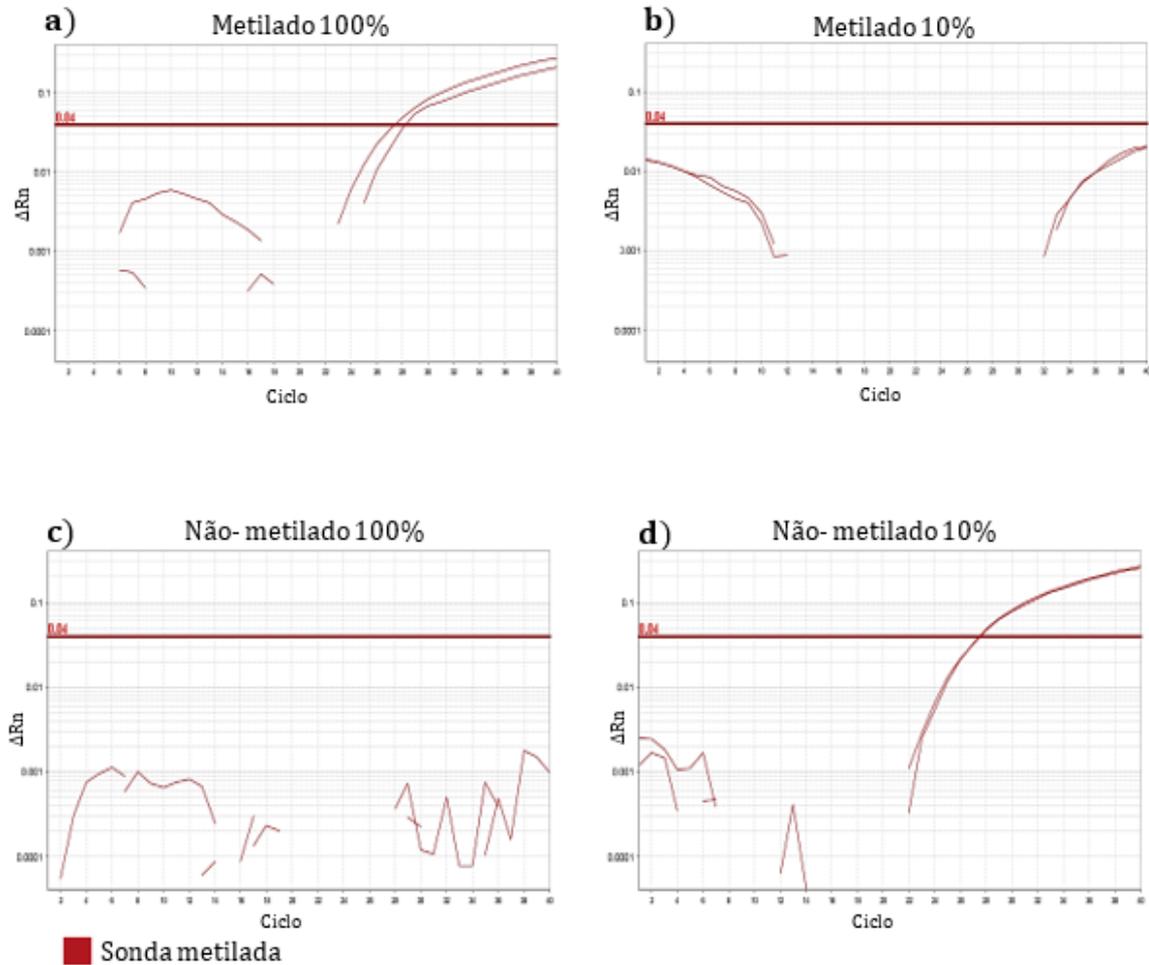


Figura 17 - Análise da curva de amplificação dos primers e sonda metilada para o gene *BMP3*. a) Sonda metilada em DNA 100% metilado. b) Sonda metilada em DNA 10% metilado. c) Sonda metilada em DNA 100% não- metilado. d) Sonda metilada em DNA 10% não- metilado.

BMP3

Sonda não-metilada

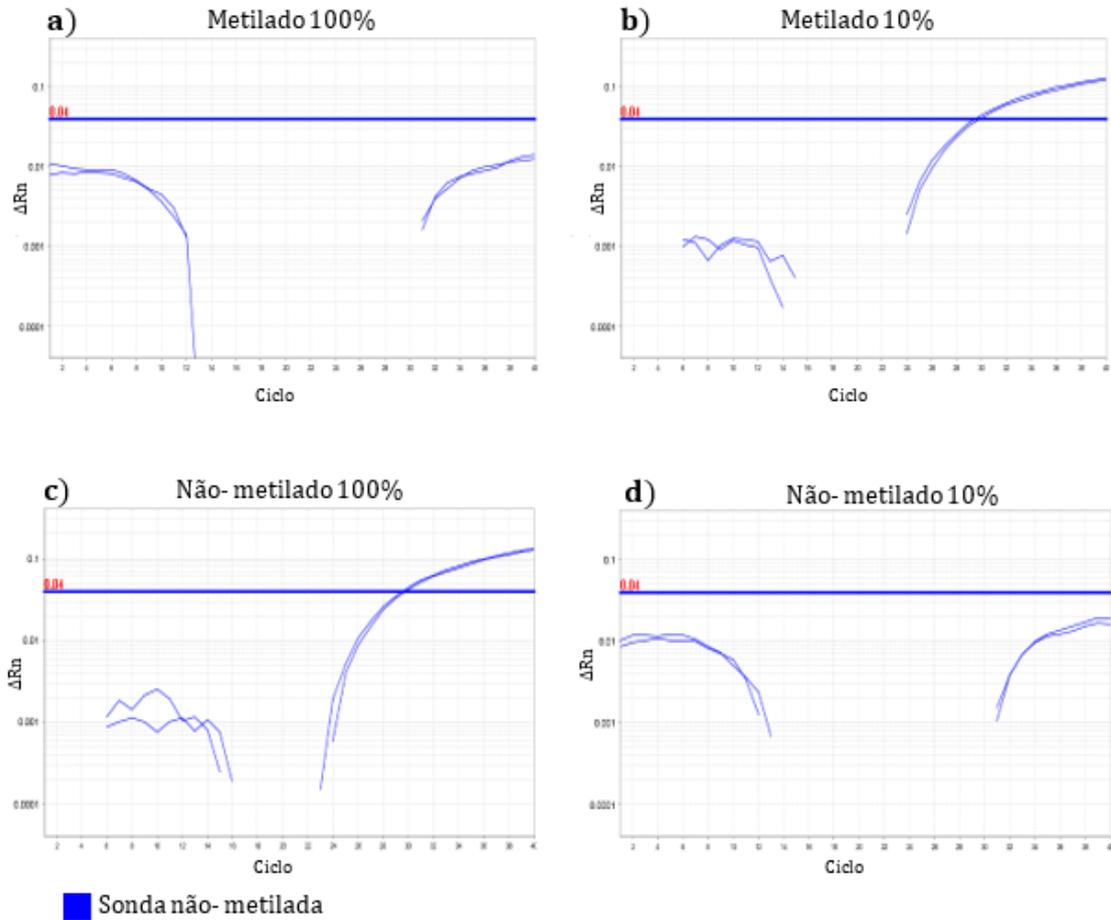


Figura 18 - Análise da curva de amplificação dos primers e sonda não-metilada para o gene *BMP3*. a) Sonda não-metilada em DNA 100% metilado. b) Sonda não-metilada em DNA 10% metilado. c) Sonda não-metilada em DNA 100% não-metilado. d) Sonda não-metilada em DNA 10% não-metilado.

4.8.1.2 Ensaio de validação

Para o gene *SEPT9* e *BMP3*, foram realizados os ensaios de validação a fim de analisar a temperatura selecionada e avaliar o número de cópias metiladas obtidas utilizando amostras de DNA de tecido com *status* de metilação conhecido. Este ensaio foi baseado em amostras de DNA de tecido de um projeto anterior realizado pelo grupo de pesquisa de câncer colorretal, onde os perfis de metilação foram avaliados utilizando a técnica de pirosequenciamento²³. Para ambos os genes, o experimento foi considerado válido para a análise quando apresentou o número de eventos totais (coluna verde escura) acima de 10.000 gotas (Figura 19a e Figura 20a).

Para o gene *SEPT9* foram utilizadas amostras com frequência média de metilação pelo pirosequenciamento de 70%-80% (CR51 e CR61), 50%-30% (CR02 e CR23), e 10%-8% (CR01 e CR31). Após realizar a técnica de ddPCR, observa-se o maior valor na concentração de cópias metiladas por μL nas amostras CR51 e CR61 enquanto a maior concentração de cópias não-metiladas por μL se encontra nas amostras CR01 e CR31. O cálculo do status de metilação nas amostras mostrou maiores porcentagens de metilação nas amostras CR51 (84%) e CR61 (87%), seguido das amostras CR02 (40%), CR23 (66%), CR01 (13%) e CR31 (5%). Estes resultados são concordantes com as análises do perfil de metilação destes genes, nas mesmas amostras, pelo pirosequenciamento (Figura 19b).

Para o gene *BMP3* foram utilizadas amostras com frequência média de metilação pelo pirosequenciamento de 68%-60% (CR87 e CR69), 30%-40% (CR62 e CR90), e 5%-4% (CR53-CR88). Após realizar a técnica de ddPCR, observa-se o maior valor na concentração de cópias metiladas por μL nas amostras CR87 e CR69 enquanto a maior concentração de cópias não-metiladas por μL se encontra nas amostras CR62, CR90, CR53, e CR88, amostras essas com menores porcentagens de metilação. O cálculo do status de metilação nas amostras mostrou maiores porcentagens de metilação nas amostras CR87 (62%) e CR69 (60%), seguido das amostras CR90 (30%), CR62 (8%), CR53 (33%) e CR88 (0%). Novamente os resultados obtidos são concordantes com o perfil de metilação obtido das mesmas amostras por pirosequenciamento (Figura 20b).

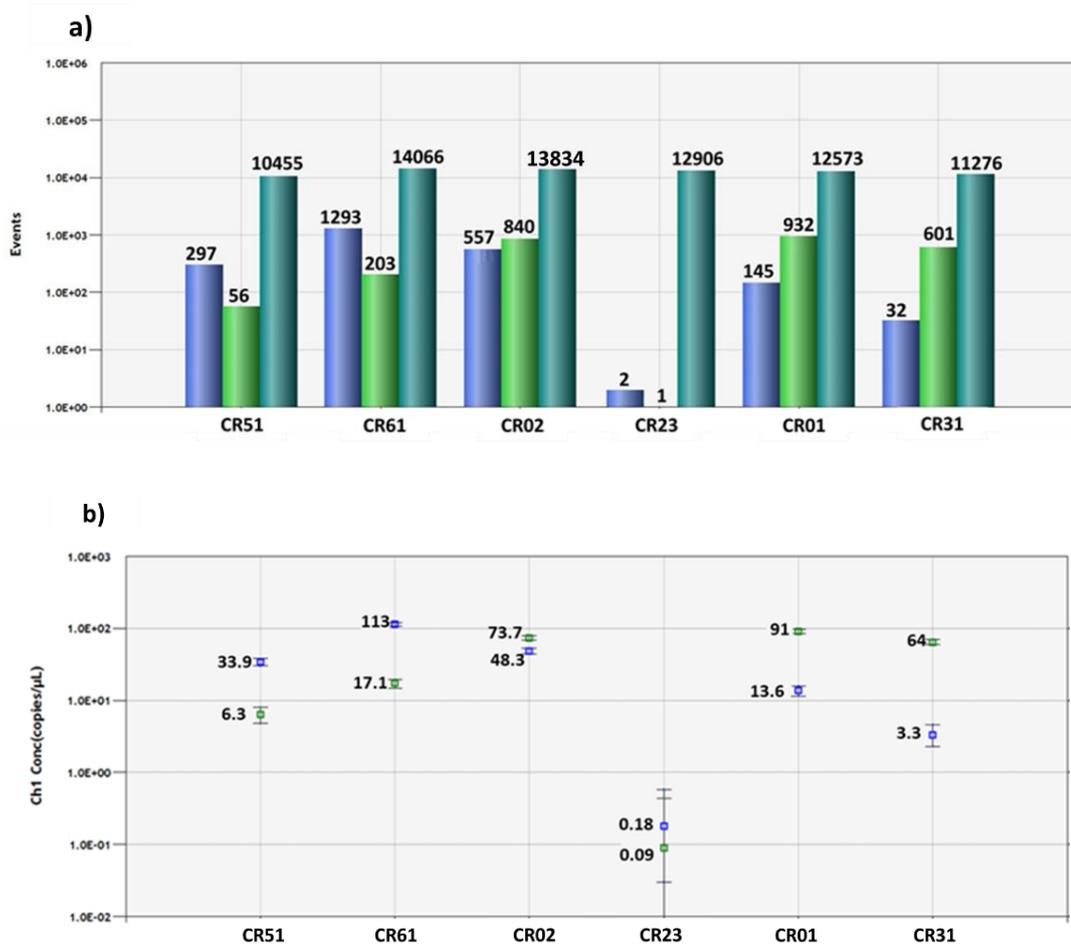
SEPT9

Figura 19 - Ensaio de confirmação em amostras de DNA de tecido para o gene *SEPT9*. a) Número de eventos totais (verde escuro), metilados (azul) e não-metilados (verde claro). b) Concentração de cópias metiladas e não-metiladas por μL de reação. Percentagens de metilação: 70%- CR51, 80%- CR61, 50%- CR02, 30%- CR23, 10%- CR01 e 8%- CR31.

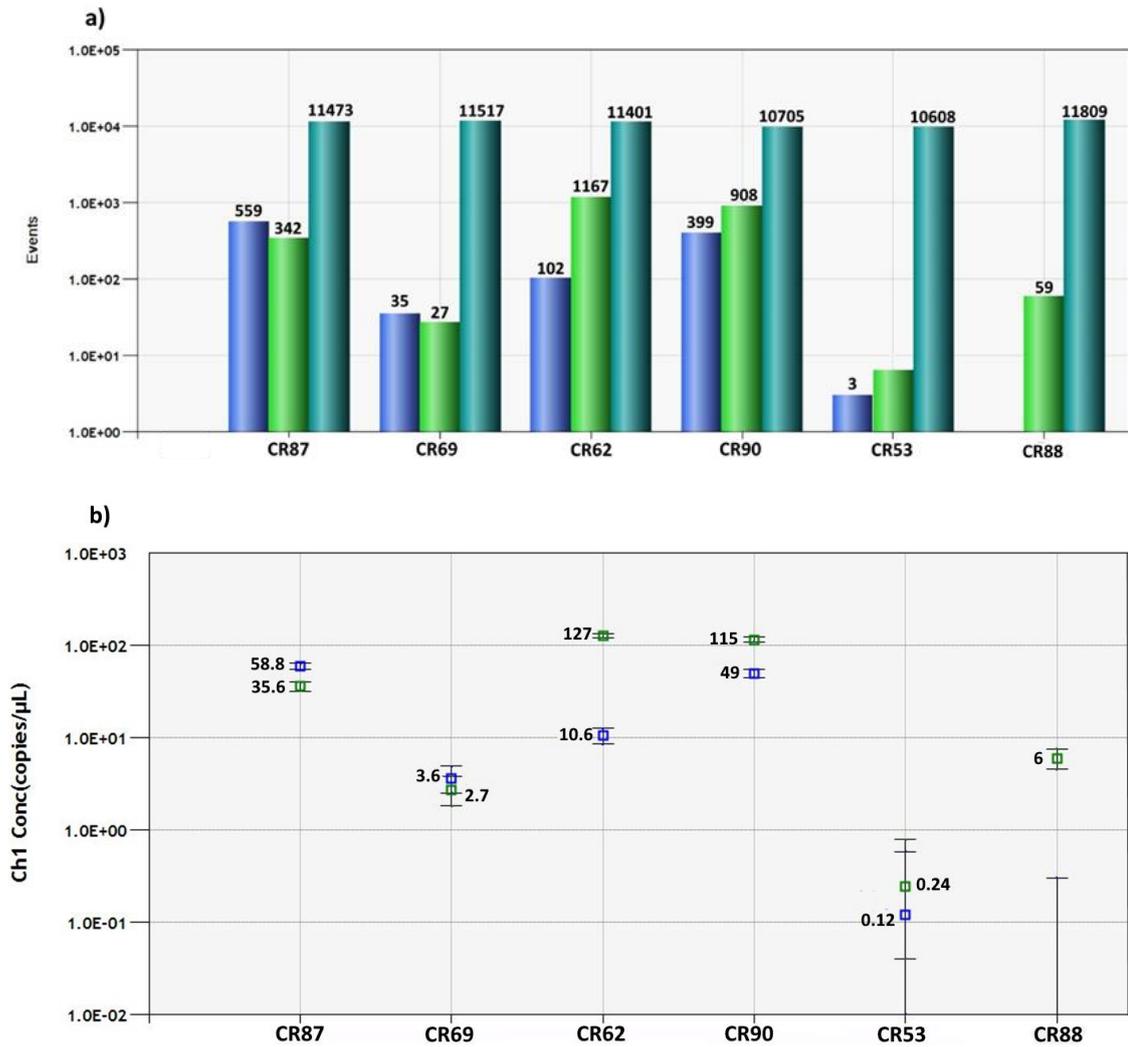
BMP3

Figura 20 - Ensaio de confirmação em amostras de DNA de tecido para o gene *BMP3*. a) Número de eventos totais (verde escuro), metilados (azul) e não-metilados (verde claro). b) Concentração de cópias metiladas e não-metiladas por μ L de reação. Percentagens de metilação: 68%- CR87, 60%- CR69, 30%- CR62, 40%- CR90, 5%- CR53 e 4%- CR88.

4.8.1.3 Parâmetros analíticos para validação dos ensaios de ddPCR

A técnica de *droplet digital PCR* (ddPCR) fornece uma quantificação absoluta de moléculas alvo de DNA em uma grande variedade de amostras e possui alta sensibilidade e especificidade para aplicações diversas, incluindo o rastreamento molecular de vários tipos de tumores como o câncer colorretal ⁵⁷.

Neste trabalho, utilizou-se a técnica de discriminação alélica para detecção e análise da metilação de DNA utilizando *primers* que não contém os dinucleotídeos CG e que flanqueiam a região de interesse que possui sítios de metilação conhecidos. Já as sondas foram desenhadas para identificação de regiões metiladas e não-metiladas dentro dessa região entre os primers senso e anti-senso, marcadas com diferentes fluoróforos que possibilitam a emissão de fluorescências diferentes para a detecção das sequências metiladas e não-metiladas.

Para analisar a sensibilidade de um ensaio para detecção de metilação, é importante definir um limiar (“*threshold*”) que determine o resultado positivo sobre o *status* de metilação das amostras com um nível de confiança elevado. Para o ddPCR, o nível de base da contagem de moléculas falso-positivas determina qual concentração de verdadeiros positivos para moléculas metiladas e não-metiladas poderão ser detectados com confiança estatística.

Nesse contexto, o limite de branco (LoB) e o limite de detecção (LoD) são métricas que descrevem a sensibilidade de um procedimento laboratorial de mensuração de moléculas. O LoB é a maior concentração de um analito que se espera encontrar quando são testadas amostras “brancas” (que não contém o analito). Já o LoD se refere a menor concentração de analito que pode ser detectada com confiabilidade ⁵⁸.

Para os ensaios de sensibilidade foram utilizados DNA controle comercial 100% metilado e não-metilado (*Human methylation DNA – Zymo Research*) e o LoB para as sondas metiladas e não-metiladas foi realizado utilizando 20 replicatas em cada experimento.

O valor de LoB para a reação de detecção de alelos metilados foi calculado através da frequência de gotas positivas (para sequências metiladas) detectadas em amostras de DNA controle não-metiladas (Figura 21a e Figura 21c), e o LoB para detecção de alelos não-metilados foi calculado pela frequência de gotas positivas (para sequências não-metiladas) detectadas em amostras de DNA controle 100% metiladas (Figura 21b e Figura 21d). O cálculo foi realizado através da seguinte expressão ⁵⁸:

$$LoB = média_{branco} + 1.645 \times (DP_{média}) \quad (Eq. 4)$$

Onde, DP= desvio padrão.

Em relação ao LoD, o ensaio foi realizado através da diluição seriada do DNA comercial 100% metilado em água ultrapura, a fim de identificar a menor concentração de DNA 100% metilado que consegue ser detectada com confiabilidade (Figura 21a e Figura 21c). A mesma diluição seriada foi realizada com o DNA não-metilado a fim de identificar a menor concentração de DNA não-metilado que consegue ser detectada (Figura 21b e Figura 21d). Os pontos de diluição utilizados no ensaio consistiram em 4 pontos de referência, considerando o fator de diluição de 10 vezes sob o valor de massa total do DNA (metilado ou não-metilado) em nanograma (10 ng; 1 ng; 0,1 ng; 0,01 ng)⁵⁹. Todos os experimentos utilizaram duplicatas e os pontos apresentados nos gráficos da Figura 21 representam a média dos valores de cópias/20ul das duplicatas de cada experimento. O cálculo para obtenção do valor de LoD foi realizado através da expressão dada pela Eq. 5:

$$LoD = LoB + 1.645 \times (DP_{amostra\ de\ menor\ concentração}) \quad (Eq.5)$$

Onde, DP= desvio padrão.

Seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)⁶⁰ para determinação da capacidade de detecção de Limite de Branco(LoB) e Limite de Detecção (LoD) em procedimentos clínicos e laboratoriais, realizou-se o cálculo destes dois parâmetros para cada sonda utilizada na análise da metilação dos genes *SEPT9* e *BMP3*.

o LoB foi determinado para cada ensaio como um número finito de eventos de gotículas falso-positivas detectados por reação. Para o gene *SEPT9*, o LoB para a sonda metilada foi de 0,93 cópias e para a sonda não-metilada foi de 1,71 cópias. Para o gene *BMP3*, o LoB para a sonda metilada foi de 0,94 cópias e para a sonda não-metilada foi de 30,04 cópias. A partir desses valores obtidos, o cálculo para o LoD foi realizado.

O LoD foi definido como a menor concentração de número de cópias por reação que pode ser distinguida do LoB com o intervalo de confiança de 95%. Para esta análise foi considerado o ponto de diluição (entre as duplicatas) que apresentaram valores acima do LoB,

para aumentar a confiabilidade do teste e evitar a inclusão de falsos-positivos na análise (Figura 21 – linha pontilhada). Para o gene *SEPT9*, o valor de LoD para a sonda metilada foi de 2,09 cópias e para a sonda não-metilada foi de 4,04 cópias. Para o gene *BMP3*, o LoD para a sonda metilada foi de 2,68 e para sonda não-metilada foi de 32,60 cópias. A partir dos valores calculados para o LoD dos dois genes, as amostras do estudo foram analisadas.

Como critério de qualidade, foram excluídas amostras que: **(a)** não apresentaram amplificação de fluorescência para sequências metiladas e não-metiladas no ddPCR, **(b)** valor do número de cópias abaixo do valor de LoD obtidos para cada sonda e **(c)** total de eventos abaixo de 10.000 gotas. Para ambos os genes, uma amostra do grupo sem lesão significativa foi desconsiderada por apresentar um valor total de eventos abaixo de 10.000 gotas para o ddPCR, comprometendo as análises de número de cópias e *status* de metilação para esta amostra.

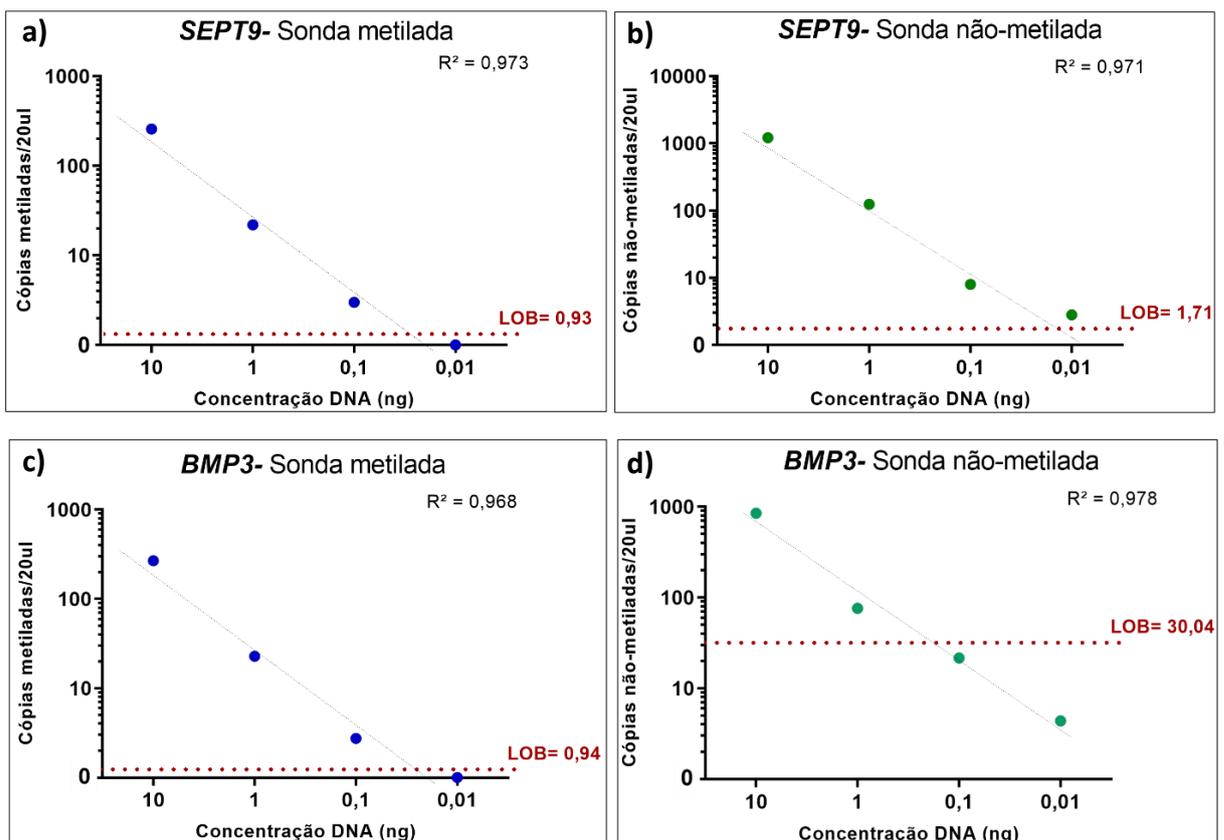


Figura 21 - Diluição seriada para o cálculo do Limite de detecção. a) Sonda metilada e b) Sonda não-metilada para o gene *SEPT9*. c) Sonda metilada e d) Sonda não-metilada para o gene *BMP3*. Eixo y em escala log₁₀.

4.9 Cálculo do número de cópias de DNA por ml de plasma

O número de cópias de DNA por 20µL de reação da amostra foi calculado pelo software *QuantaSoft* (QuantaSoft v1.7.4, Bio-Rad) baseado na fórmula apresentada no *droplet digital PCR Applications Guide* ⁶¹:

$$\frac{\text{Cópias}}{\text{droplet}} = -\ln(1 - p) \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde, p= fração de *droplets* positivas da reação.

Um cálculo externo foi realizado para a conversão do número de cópias do alvo por 20µL de reação em copias por ml de plasma (Eq. 7):

$$\frac{\text{Cópias}}{\text{ml}} = \left(\frac{(C \times V_r) \times V_e}{V_a \times V_p} \right) \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde:

C= Cópias do alvo/20 µL de reação

V_r= Volume da reação de ddPCR

V_e= Volume de eluição do cfDNA

V_a= Volume de cfDNA adicionado na reação

V_p= Volume de plasmas usado na extração de cfDNA

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações clínicas, endoscópicas, histológicas e moleculares deste estudo estão registradas na plataforma REDCap, e foram transferidas para o software SPSS para realização das análises estatísticas (IBM SPSS, versão 23).

As amostras foram descritas em função da média, desvio padrão, mínimo, máximo, mediana e quartis para as variáveis quantitativas e tabelas de frequência para as variáveis qualitativas. As análises de associação entre as variáveis clínicas, endoscópicas, e moleculares foram feitas pelo teste de Qui-quadrado (ou Exato de Fisher). O teste de normalidade para verificar a distribuição das amostras foi realizado. As análises de associação entre as variáveis clínicas e moleculares foram feitas por meio de testes não-paramétricos (Teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) e a distribuição das amostras foi apresentada pelo gráfico box-plot.

Foi realizada a regressão logística binária para a escolha de potenciais preditores de acordo com a variável de desfecho, a um nível de significância de 0,05. A análise da Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi realizada para estabelecer os valores ótimos de *cutoff*. Indicadores de desempenho (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e seu intervalo de confiança (I.C. 95%) foram calculados separadamente para cada desfecho do estudo. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 0,05. As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS (versão 23) para Windows.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos sob o parecer 3.285.683, e a emenda sob o parecer 4.443.073 para utilização das amostras de câncer colorretal do Biobanco HCB. O estudo obedeceu aos critérios éticos em conformidade com a resolução CNS 466/12.

7 RESULTADOS

7.1 Descrição da população incluída

Entre novembro de 2016 e fevereiro de 2019, 236 participantes do programa de rastreamento do câncer colorretal do HCB realizaram colonoscopia após teste FIT positivo e coletaram sangue, material este que foi armazenado no biobanco da Instituição após assinatura do TCLE.

Dos 236, foram excluídos 4 pacientes (2 por histórico familiar de câncer colorretal e 2 por presença de outra neoplasia no momento da coleta do sangue). Sendo assim, 232 pacientes do programa de rastreamento preencheram os critérios de elegibilidade do estudo e foram incluídos no projeto (Figura 22). Amostras de plasma de 30 pacientes com câncer colorretal tratados no HCB foram incluídas para análises, totalizando 262 amostras de plasma utilizadas para a extração e quantificação de cfDNA (Figura 22).

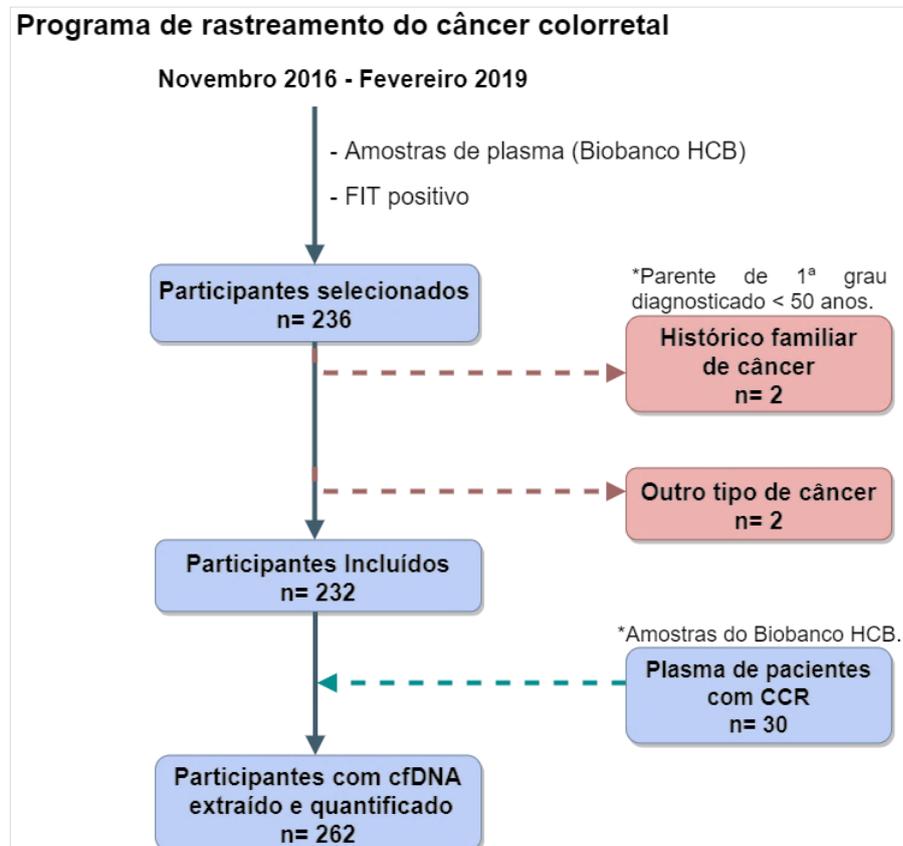


Figura 22 - Fluxograma de seleção e inclusão dos participantes do estudo.

Dentre os 262 participantes incluídos e analisados, 165 (63,0%) eram mulheres e 97 (37,0%) homens, com uma média de idade de 58,6 (\pm 7,2) anos. Conforme observado na tabela 3, de acordo com a pior lesão detectada na colonoscopia, a população foi estratificada em 38 (14,5%) participantes que apresentavam câncer colorretal, 46 participantes (17,6%) que apresentavam adenoma avançado, 119 (45,4%) participantes que exibiram adenoma precoce, 3 (1,1%) participantes cuja pior lesão foi lesão séssil serrilhada (LSS), 13 (5,0%) em que foi detectado pólipo hiperplásico (PH) como pior lesão e 43 (16,4%) cuja colonoscopia não exibiu qualquer lesão clinicamente significativa (mucosa normal ou com presença de colite crônica no exame anátomo-patológico). A média de idade variou entre 56,4 e 58,1 anos entre os grupos e predominou o gênero feminino, com exceção do grupo câncer cuja proporção de homens foi de 57,9% (22 participantes).

Na maioria dos participantes do estudo, foram detectadas na colonoscopia entre 1 e 3 lesões. Em relação a pior lesão, quanto a localização das lesões, no grupo de serrilhados: 2/3 (66,7%) participantes do grupo com LSS, apresentaram a lesão localizada no cólon proximal e 9/13 (69,2%) dos participantes com PH, o pólipo foi detectado no cólon esquerdo ou reto (localização distal). No grupo de adenomas precoces, 58/119 (48,8%) participantes apresentavam adenomas precoces localizados no cólon proximal, 22/119 (18,5%) apresentavam no cólon esquerdo ou reto (localização distal), enquanto 39/119 (32,7%) dos pacientes apresentavam adenomas em ambas as localizações. No grupo dos adenomas avançados, 25/46 (54,3%) participantes apresentavam adenomas avançados apenas no cólon esquerdo ou reto (localização distal) e 6/46 (13,1%) apresentavam em ambas as localizações. Para o grupo câncer, em 28 (73,7%) pacientes o câncer estava localizado no cólon esquerdo ou reto (localização distal) (Tabela 3).

Quanto ao tamanho das lesões, no grupo de serrilhados: 2 (66,7%) LSS possuíam tamanho menor que 10mm e para o grupo PH, todas as lesões foram menores que 10 mm. Para o grupo de adenomas, 35 (76,0%) casos de adenomas avançados foram maiores ou iguais a 10mm (Tabela 3).

Quanto ao grau de displasia, para o grupo de adenomas avançados, 30 (65,2%) lesões apresentaram displasia de baixo grau e 16 (34,8%) lesões apresentaram displasia de alto grau (Tabela 3).

Quanto ao estadiamento geral do câncer, 9 (23,7%) lesões foram diagnosticadas com estadiamento I, 9 (23,7%) com o estadiamento II, 14 (36,8%) com o estadiamento III e 6 (15,8%) lesões diagnosticadas com o estadiamento IV (Tabela 3).

Tabela 3- Dados demográficos, endoscópicos, anátomo-patológicos e de estadiamento dos participantes do estudo.

	Sem lesão ^a (n=43)	Serrilhados (n=16)		Adenomas (n=165)		Câncer (n=38)
		LSS (n=3)	PH (n=13)	Adenoma precoce (n=119)	Adenoma avançado (n=46)	
Idade						
Média (DP)	57,1 (4,4)	56,6 (5,0)	57,6 (4,8)	57,5 (4,4)	58,1 (5,0)	63,8 (13,0)
Gênero						
Feminino	32 (74,4%)	2 (66,7%)	6 (46,2%)	79 (66,4%)	30 (65,2%)	16 (42,1%)
Masculino	11 (25,6%)	1 (33,3%)	7 (53,8%)	40 (33,6%)	16 (34,8%)	22 (57,9%)
Nº lesões^b						
0	43 (100%)	-	-	-	-	-
1-3	-	1(33,3%)	13 (100%)	85 (71,4%)	18 (39,1%)	31 (81,6%)
4-6	-	2 (66,7%)	-	25 (21,0)	15 (32,6%)	3 (7,8%)
7-9	-	-	-	8 (6,7%)	9 (19,6%)	2 (5,3%)
≥10	-	-	-	1 (0,9%)	4 (8,7%)	2 (5,3%)
Localização						
Proximal	-	2 (66,7%)	1 (7,7%)	58 (48,8%)	15 (32,6%)	10 (26,3%)
Distal	-	0	9 (69,2%)	22 (18,5%)	25 (54,3%)	28 (73,7%)
Ambos	-	1 (33,3%)	3 (23,1%)	39 (32,7%)	6 (13,1%)	0
Tamanho						
<10mm	-	2 (66,7%)	13 (100%)	119 (100%)	11 (24,0%)	-
≥10mm	-	1 (33,3%)	-	-	35 (76,0%)	-
Displasia						
Baixo grau	-	-	-	119 (100%)	30 (65,2%)	-
Alto grau	-	-	-	-	16 (34,8%)	-
Estadiamento						
I	-	-	-	-	-	9 (23,7%)
II	-	-	-	-	-	9 (23,7%)
III	-	-	-	-	-	14 (36,8%)
IV	-	-	-	-	-	6 (15,8%)

Nota: ^a= Amostras sem lesão significativa na colonoscopia ou com presença de colite. ^b= Número de lesões significativas detectadas na colonoscopia. DP: Desvio Padrão; PH: Pólipo Hiperplásico; LSS: Lesão Sésil Serrilhada.

7.2 Descrição da concentração de cfDNA nas amostras dos participantes.

O volume de plasma utilizado para a extração de cfDNA variou de 2 a 5 mL. A mediana da concentração de cfDNA obtida das amostras dos 262 participantes, quantificada pelo método fluorimétrico Qubit (ng/ul) foi de 1,0 ng/ul (0,1 – 37,8). Quando normalizado pelo volume de plasma utilizado, a mediana foi de 8,51 ng/mL (0,8 – 2268,0 ng/mL). Conforme observado na tabela 4, valores de concentração de cfDNA quantificado (em ng/ul) entre os grupos variou de 1,0 a 1,7 ng/ul e o valor normalizado (em ng/ml) variou entre 7,1 a 10,4 ng/ml. O grupo câncer apresentou os maiores valores de mediana da quantificação e valores normalizados de cfDNA, correspondendo a 1,7 ng/ul e 10,4 ng/mL, respectivamente.

Tabela 4- Valores da concentração de cfDNA nas amostras classificadas de acordo com o a pior lesão dos participantes incluídos no estudo.

	Sem lesão ^a (n=43)	Serrilhados (n=16)		Adenomas (n=165)		Câncer (n=38)
		LSS (n=3)	PH (n=13)	Adenoma precoce (n=119)	Adenoma avançado (n=46)	
Concentração de cfDNA*						
Quantificação (ng/ul)	1,0 (0,1-3,5)	1,6 (1,1-1,8)	1,1 (0,1-4,8)	1,1 (0,1-32,0)	1,0 (0,1-7,5)	1,7 (0,1-37,8)
Normalização (ng/ml)	8,1 (1,1- 22,2)	8,0 (6,6- 15,8)	7,1 (0,8- 29,1)	8,4 (1,1- 192,0)	8,2 (1,5- 50,2)	10,4 (0,9- 2268,0)

Nota: ^a= Amostras sem lesão significativa na colonoscopia ou com presença de colite. *=Valores apresentados correspondem a mediana e o intervalo de mínimo e máximo. PH: Pólipo Hiperplásico; LSS: Lesão Sésil Serrilhada.

Em seguida, foi feita a correlação entre a concentração de DNA em ng/ml de plasma e a lesão de pior prognóstico de cada participante. Para esta análise, os participantes foram agrupados de acordo com o significado biológico e clínico de cada lesão: 1°) Sem lesões significativas ou normal ou pólipo hiperplásico, 2°) Adenoma precoce ou lesão sésil serrilhada, sem displasia, 3°) Adenoma avançado ou câncer colorretal.

O 1° grupo analisado (sem lesões significativas + PH) apresentou o valor de mediana para a concentração de cfDNA por ml de plasma de 6,8 ng/ml (1,1 – 29,1), o 2° grupo (adenoma precoce + LSS) apresentou uma concentração de 8,4 ng/ml (0,8 – 192,0) e o 3° grupo (adenoma avançado + câncer) apresentou uma concentração de 9,0 ng/ml (0,9 –

2268,0). Por meio do teste de Kruskal-Wallis, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,047$) entre as concentrações de cfDNA dos três grupos analisados (Figura 23).

Quando comparado entre os grupos, por meio do teste de Mann-Whitney, os participantes com adenoma avançado + câncer, assim como o grupo com adenoma precoce + LSS, apresentaram concentrações de cfDNA significativamente maiores do que o grupo sem lesões + PH ($p=0,049$ e $p=0,020$; respectivamente). Não houve diferença estatisticamente significativa da concentração de cfDNA entre os grupos com adenoma precoce + LSS e o grupo com adenoma avançado + câncer ($p=0,882$) (Figura 23).

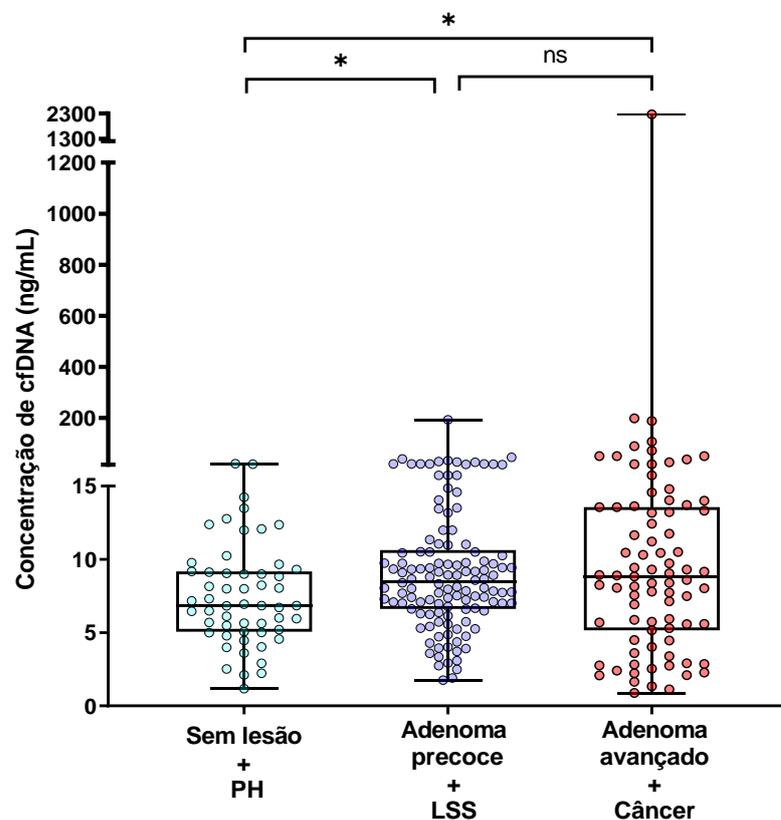


Figura 23 – Relação entre a concentração de cfDNA (ng/ml) e a pior lesão detectada ($p=0,047$). * $p<0,05$. PH: Pólipio hiperplásico; LSS: Lesão séssil serrilhada; cfDNA: cell-free DNA; ns: Não significativo.

Em seguida, foi realizada a associação entre a concentração de DNA em ng/ml de plasma e os grupos estratificados de acordo com o estadiamento do câncer (I, II, III, IV). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,251$) (Figura 24).

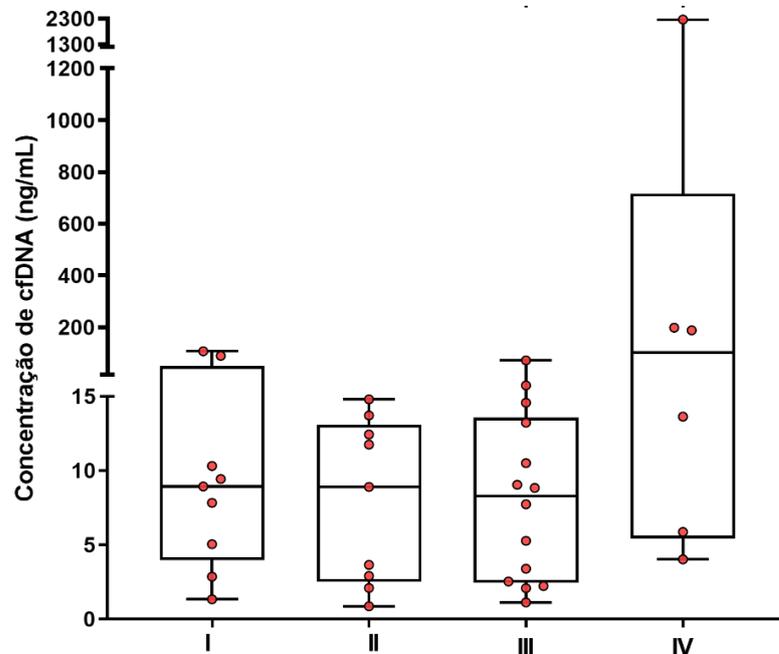


Figura 24 - Relação entre a concentração de cfDNA (ng/ml) e os estadiamentos do câncer ($p=0,251$). cfDNA: cell-free DNA.

7.3 Análise da metilação para o gene *SEPT9* por *droplet digital PCR*

Durante a realização da técnica de ddPCR, 11 amostras (2 amostras com a pior lesão sendo câncer, 2 adenomas avançados, 6 adenomas precoces e 1 pólipo hiperplásico) não apresentaram amplificação das sequências alvo. Um total de 247 amostras foram analisadas quanto ao número de cópias metiladas por ml de plasma (Eq. 2, especificado nos métodos, item 4.5) e ao *status* de metilação (Eq. 3, especificado nos métodos, item 4.8) para o gene *SEPT9*. Para as análises, as 247 amostras foram agrupadas da seguinte forma de acordo com o grupo de pior lesão: 1°) Sem lesões significativas + pólipo hiperplásico, 2°) Adenoma precoce, 3°) Adenoma avançado e 4ª) câncer colorretal. Devido ao número reduzido de amostras e pela dificuldade em agrupá-las nas demais categorias em razão das diferenças biológicas e moleculares, as lesões sésseis serrilhadas foram excluídas dessa análise.

Conforme observado na tabela 5, os valores de mediana para a concentração normalizada de cfDNA em ng/ml de plasma variaram de 8,1 a 9,0 ng/ml, sendo o grupo câncer

com o maior valor de concentração de cfDNA. Além disso, o grupo câncer também apresentou os maiores valores para número de cópias metiladas e não-metiladas por ml de plasma extraído (16,5 e 567,0; respectivamente) e maior valor de porcentagem para o *status* de metilação (2,2%) para o gene *SEPT9*.

Tabela 5- Dados das análises de ddPCR para o número de cópias/ml de plasma e status de metilação do gene *SEPT9*.

Pior lesão	<i>SEPT9</i> n (%)	cfDNA ng/ml (Min-Max)	Cópias/ml de plasma (Min-Max)		% Status de metilação (Min-Max)
			Metiladas	Não-metiladas	
Sem lesão + PH	54 (21,9%)	8,1 (0,8- 29)	3,8 (0 - 43)	427 (34 - 1.777)	0,7% (0-3,3)
Ad. precoce	113 (45,7%)	8,3 (1,1- 192)	3,5 (0 - 170)	412 (2 – 12.556)	1,0% (0-12,5)
Ad. avançado	44 (17,8%)	8,4 (1,5- 50)	4,1 (0 - 64)	562 (37 - 2.353)	0,9% (0-4,0)
Câncer	36 (14,6%)	9,0 (0,9- 2.268)	16,5 (0 – 23.232)	567 (15 – 107.490)	2,2% (0-83,0)
I	9 (25,0%)	8,9 (1,3- 106)	4,7 (0- 79)	444 (208-5.236)	0,7% (0-4,8)
II	8 (22,2%)	10,3 (0,9- 14)	5,1 (0- 271)	391 (121-1.191)	1,8% (0-53,8)
III	13 (36,1%)	8,9 (1,1- 71)	16,0 (0- 255)	451 (69- 1.434)	1,7% (0-30,3)
IV	6 (16,7%)	100 (4,0- 2.268)	393 (136- 23.232)	523 (108-107.049)	66,7% (20-83,0)

Os valores apresentados na tabela são referentes a mediana. Ad.: Adenoma .PH: Pólipo hiperplásico; cfDNA: cell-free DNA.

Em seguida, foi feita a correlação entre a o número de cópias metiladas/ml de plasma e a lesão de pior prognóstico para os quatro grupos, sendo observada uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,024$) entre os grupos analisados. O grupo de participantes com câncer apresentou número de cópias metiladas/ml para o gene *SEPT9* significativamente maior do que o grupo sem lesões + PH ($p= 0,006$), adenoma precoce ($p=0,003$) e adenoma avançado ($p=0,022$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo sem lesão + PH e o grupo com adenoma precoce ($p=0,914$) ou com o grupo de adenoma avançado ($p=0,819$) (Figura 25).

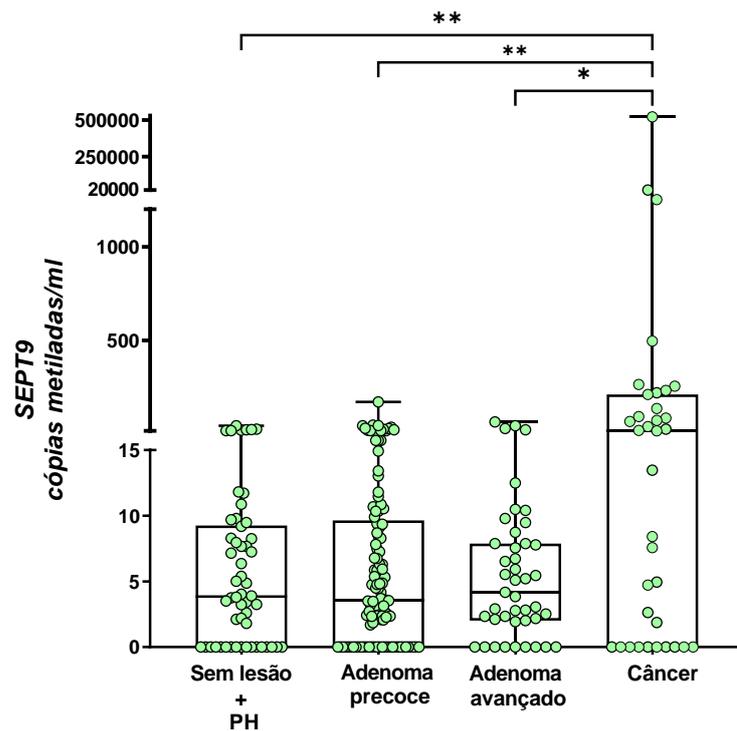


Figura 25 - Relação entre o número de cópias metiladas do gene *SEPT9* e a pior lesão detectada ($p=0,024$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$. PH: Pólipo hiperplásico.

Observou-se também uma diferença significativa ($p= 0,012$) quando comparado o número de cópias metiladas entre os grupos estratificados de acordo com o estadiamento do câncer (I, II, III e IV). Na comparação par-a-par, as amostras com estadiamento mais avançado (IV) apresentaram número de cópias metiladas/ml significativamente maior do que o grupo de estadiamento I ($p= 0,002$), II ($p=0,007$) e III ($p=0,006$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o estadiamento I e II ($p=0,960$) ou I e III ($p=0,373$) (Figura 26).

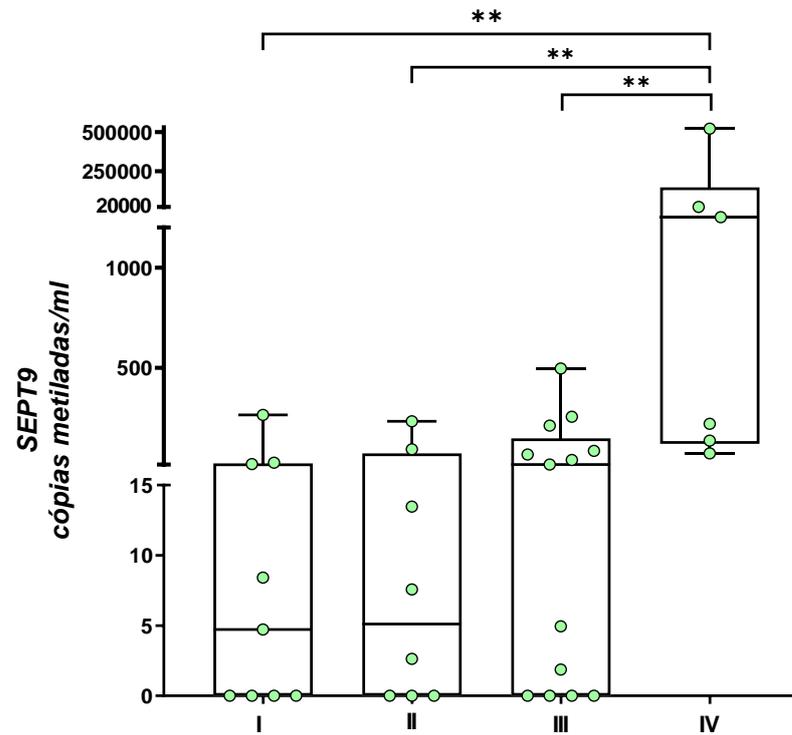


Figura 26 - Relação entre o número de cópias metiladas do gene *SEPT9* e os estadiamentos do câncer ($p=0,012$). ** $p<0,01$.

Quanto ao *status* de metilação, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,047$) entre o *status* de metilação dos quatro grupos analisados. O grupo câncer apresentou o *status* de metilação significativamente maior do que o grupo sem lesões + PH ($p=0,009$), adenoma precoce ($p=0,017$) e adenoma avançado ($p=0,046$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo sem lesão + PH e o grupo do adenoma precoce ($p=0,349$) ou o grupo do adenoma avançado ($p=0,455$) (Figura 27).

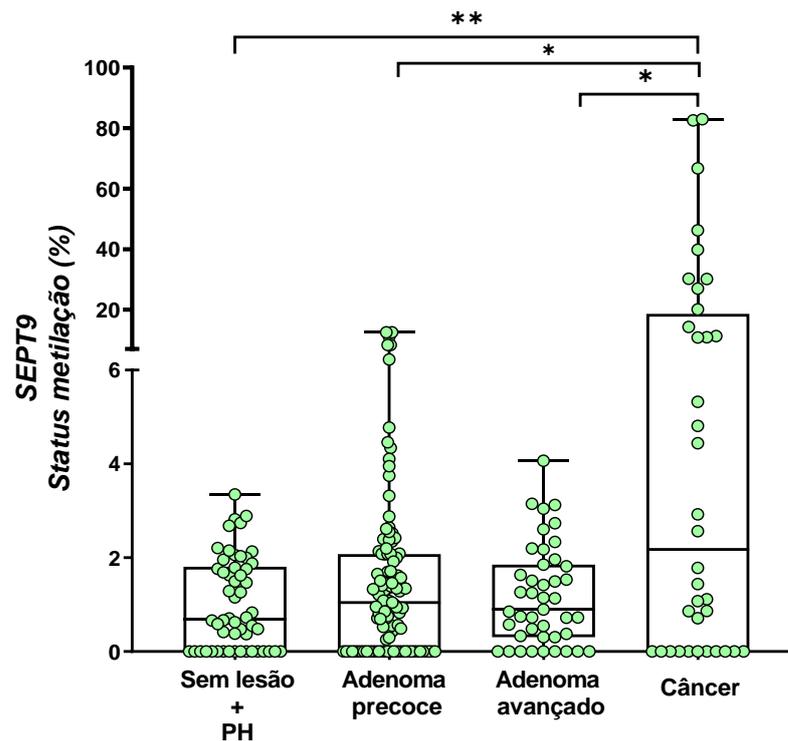


Figura 27 - Relação entre o status de metilação do gene *SEPT9* e a pior lesão detectada ($p=0,047$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$. PH: Pólipo hiperplásico.

Houve também uma diferença significativa ($p=0,001$) quando comparado o *status* de metilação dos grupos divididos de acordo com o estadiamento do câncer (I, II, III e IV). Na comparação par-a-par, as amostras com estadiamento mais avançado (IV) apresentaram o *status* de metilação significativamente maior do que o grupo de estadiamento I ($p=0,0004$), II ($p=0,004$) e III ($p=0,0003$). Não houve diferença significativa entre o estadiamento I e II ($p=0,352$) ou I e III ($p=0,129$) (Figura 28).

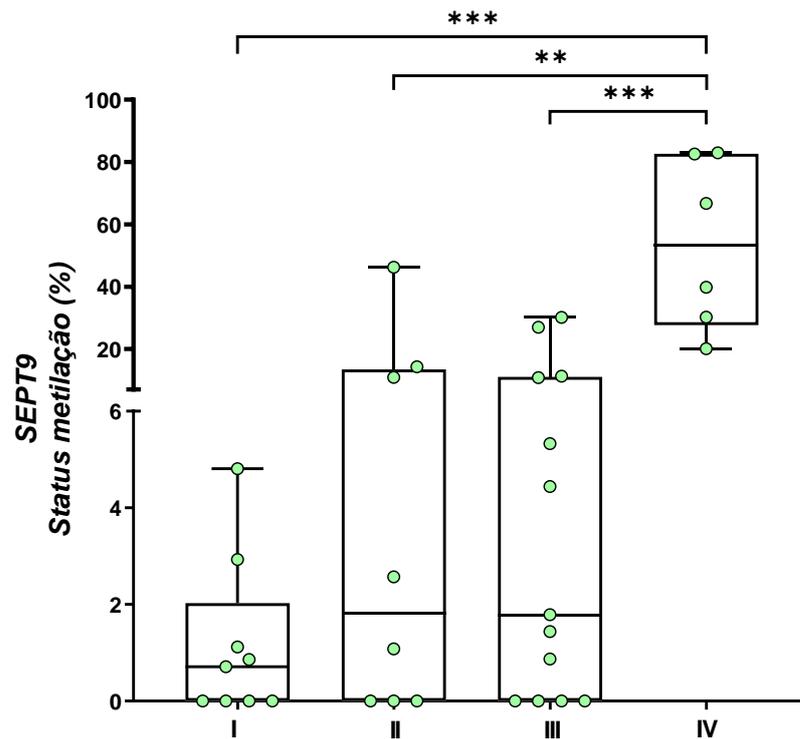


Figura 28 - Relação entre o status de metilação do gene *SEPT9* e os estadiamentos do câncer ($p=0,001$). ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

7.4 Análise da metilação para o gene *BMP3* por droplet digital PCR

Após a realização da técnica de ddPCR, 14 amostras (3 amostras com a pior lesão sendo câncer, 1 adenoma avançado, 9 adenomas precoces e 1 pólipó hiperplásico) não apresentaram amplificação das sequências alvos no ddPCR para o gene *BMP3*. Um total de 244 amostras foram analisadas quanto ao número de cópias metiladas por ml de plasma (Eq. 2, especificado nos métodos, item 4.5) e ao *status* de metilação (Eq. 3, especificado nos métodos, item 4.8). Para as análises, as 244 amostras foram também agrupadas em: 1º) Sem lesões significativas + pólipó hiperplásico, 2º) Adenoma precoce, 3º) Adenoma avançado e 4ª) Câncer colorretal. Pelo número reduzido de amostras e pela dificuldade em agrupá-las nas demais categorias em razão das diferenças biológicas e moleculares, as lesões serrilhadas sésseis foram excluídas desta análise.

Conforme observado na tabela 6, os valores de mediana para a concentração normalizada de cfDNA em ng/mL nos quatro grupos de pior lesão variaram entre 8,1 e 9 ng/ml, sendo o câncer o grupo com o maior valor de concentração (9,0 ng/ml). Não houve nenhuma diferença entre o número de cópias metiladas dos grupos. Já o número de cópias não-metiladas do gene apresentou os maiores valores para adenoma precoce e câncer (300,0 e

239,0; respectivamente). Quanto ao *status* de metilação, também não houve diferenças entre os grupos, porém o grupo câncer apresentou o maior valor máximo de porcentagem de metilação detectada em uma amostra, correspondendo a 84%.

Tabela 6- Dados das análises de ddPCR para o número de cópias/ml de plasma e status de metilação do gene *BMP3*.

Pior lesão	<i>BMP3</i> n (%)	cfDNA ng/ml (Min-Max)	Cópias/ml de plasma (Min-Max)		% Status de metilação (Min-Max)
			Metiladas	Não-metiladas	
Sem lesão + PH	54 (22,1%)	8,1 (0,8- 29)	0 (0 - 20)	210 (48 - 1.666)	0% (0-11)
Ad. precoce	110 (45,1%)	8,3 (1,1- 192)	0 (0 - 42)	300 (47 – 4.992)	0% (0-40)
Ad. avançado	45 (18,4%)	8,3 (1,5- 50)	0 (0 - 10)	234 (36 – 1.131)	0% (0-10)
Câncer	35 (14,4%)	9,0 (0,9- 2.268)	0 (0 – 725)	239 (51 – 183.708)	0% (0-84)
I	9 (25,7%)	8,9 (1,3- 106)	3,3 (0- 57)	444 (208-5.236)	3,6% (0-61)
II	8 (23,0%)	10,3 (0,9- 14)	0 (0- 14)	391 (121-1.191)	0% (0-63)
III	12 (34,2%)	8,9 (2,2- 71)	0 (0- 81)	417 (69- 1.434)	0% (0-43)
IV	6 (17,1%)	100 (4,0- 2.268)	20 (0- 725)	523 (108-107.049)	5,8% (0-84)

Os valores apresentados na tabela são referentes a mediana. Ad.: Adenoma .PH: Pólipo hiperplásico; cfDNA: cell-free DNA.

Foi realizada a correlação entre a o número de cópias metiladas/ml de plasma e a lesão de pior prognóstico para os quatro grupos e não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,395$) (Figura 29).

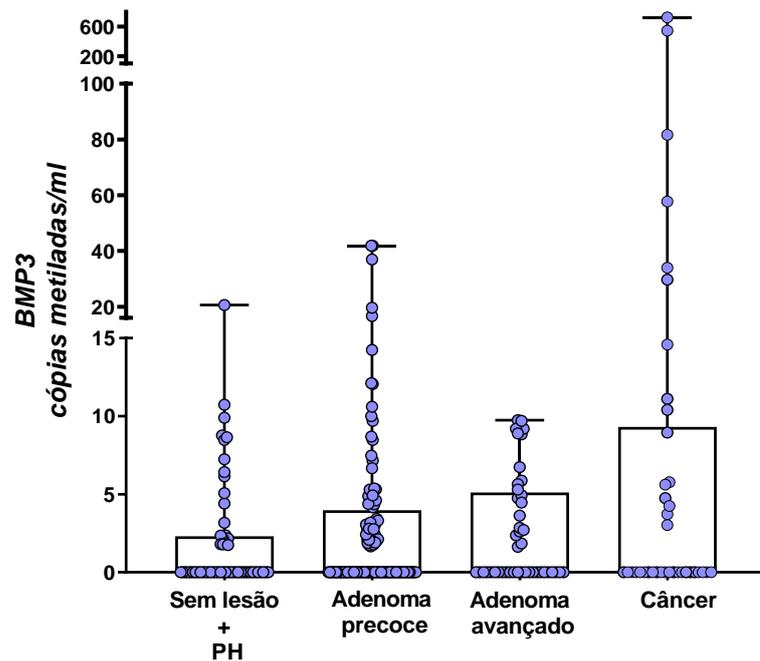


Figura 29 - Relação entre o número de cópias metiladas do gene *BMP3* e os quatro grupos de pior lesão ($p=0,395$). PH: Pólipo hiperplásico.

Quando comparado o número de cópias metiladas dos grupos divididos de acordo com o estadiamento do câncer (I, II, III e IV), observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,036$). Na comparação par-a-par, as amostras com estadiamento mais avançado (IV) apresentaram número de cópias metiladas/ml significativamente maior do que o grupo de estadiamento II ($p=0,046$) e III ($p=0,005$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o estadiamento I e IV ($p=0,135$), I e II ($p=0,312$) ou I e III ($p=0,187$) (Figura 30).

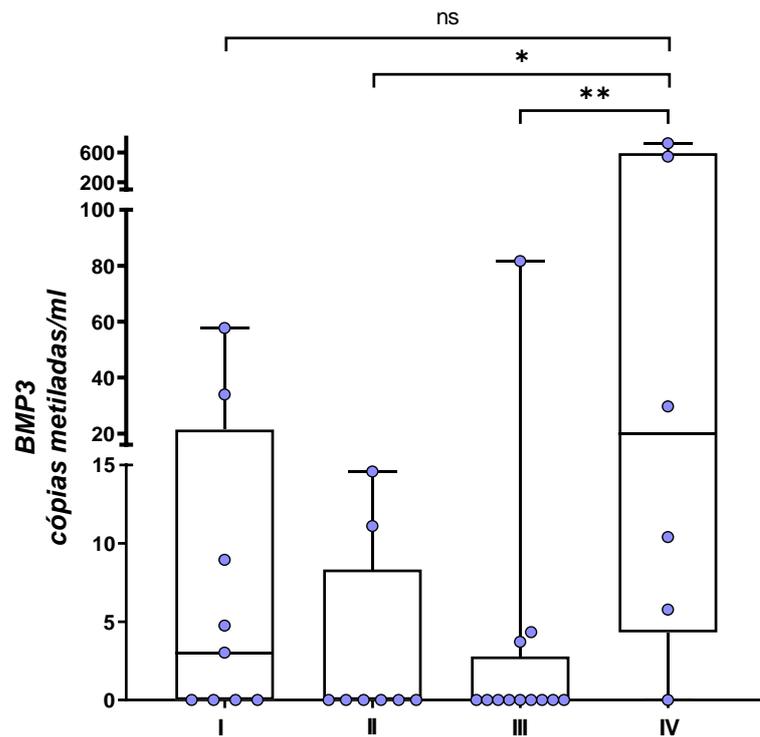


Figura 30 - Relação entre o número de cópias metiladas do gene *BMP3* e os estadiamentos do câncer ($p=0,036$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$. ns: Não significativo.

Quanto ao *status* de metilação, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,128$) entre o *status* de metilação e os quatro grupos de pior lesão (Figura 31). Quanto ao *status* de metilação dos grupos divididos de acordo com o estadiamento do câncer (I, II, III e IV), também não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,151$) (Figura 32).

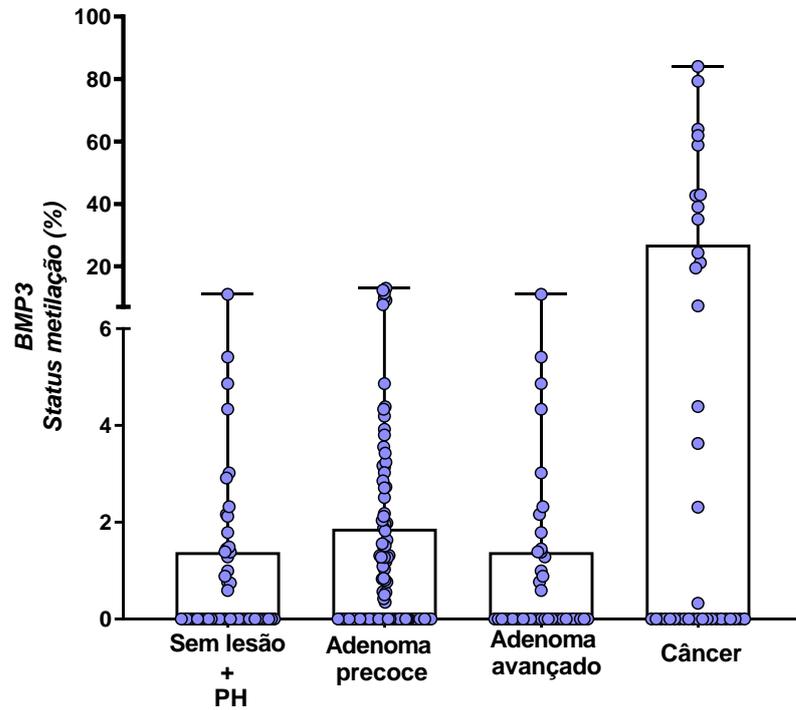


Figura 31 - Relação entre o status de metilação do gene *BMP3* e os quatro grupos de pior lesão ($p=0,128$). PH: Pólipo hiperplásico.

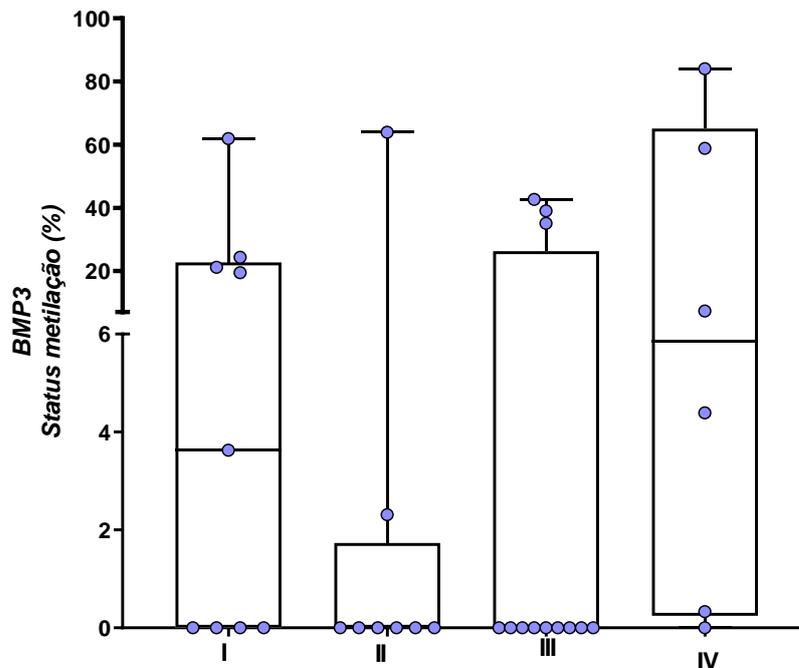


Figura 32 - Relação entre o status de metilação do gene *BMP3* e os estadiamentos do câncer ($p=0,151$).

7.5 Performance dos genes *SEPT9* e *BMP3* para detecção da metilação do cfDNA nos pacientes com CCR ou CCR + AA

A curva ROC foi construída para os modelos a fim de avaliar a sensibilidade e especificidade da metilação dos genes, além de determinar o ponto de corte ideal (*cutoff*) para discriminar os pacientes entre o grupo sem lesão e o grupo com lesões colorretais clinicamente significativas (adenoma precoce, adenoma avançado e CCR). Para a gerar a curva, os casos sem lesões significativas diagnosticadas na colonoscopia foram considerados como referências negativas (desfecho negativo) e os casos de adenomas e câncer colorretal foram considerados como referências positivas (desfecho positivo). As informações do *status* de metilação obtidos para os genes *SEPT9* e *BMP3* pela técnica de ddPCR foram utilizadas para a construção dos modelos.

Os pontos de corte ideais para classificações binárias são estabelecidos por meio de testes que selecionam o *cutoff* para a discriminação entre os grupos testados, e por isso estes valores são fundamentais para testes de diagnóstico quantitativo. No entanto, não existe um método único para determiná-los. Vários métodos foram propostos e dois deles são os mais comumente utilizados para testes diagnósticos: o Youden's *index*, que maximiza a linha vertical entre a curva ROC e a linha diagonal (Eq.8), e o Euclidian's *index*, que seleciona o ponto da curva com distância mínima do canto superior esquerdo do gráfico ROC (Eq.9)^{62 63}. As equações utilizadas para o cálculo de cada método estão representadas as seguir:

$$Y.index = sensitivity + specificity - 1 \quad (Eq.8)$$

$$E.index = (1 - sensitivity)^2 + (1 - specificity)^2 \quad (Eq.9)$$

As duas metodologias de cálculo foram utilizadas para a discriminação entre o grupo sem lesão e o grupo câncer, a fim de comparar qual dos métodos apresentava melhores valores para os indicadores de sensibilidade e especificidade. Os dados a seguir são relacionados aos indicadores de desempenho diagnóstico.

Para o gene *SEPT9*, a análise do *status* de metilação gerou uma AUC de 0,681. Pelo método de Youden's *index*, o *cutoff* foi de 2,90% de metilação com sensibilidade de 47% e

especificidade de 100%. Pelo método de Euclidian's *index*, o *cutoff* foi de 2,50% de metilação com sensibilidade de 50% e especificidade de 90% (Figura 33A e 33B, tabela 7).

Para o gene *BMP3*, a análise do *status* de metilação gerou uma AUC de 0,576. Pelo método de Youden's *index*, o *cutoff* foi de 3,60% de metilação com sensibilidade de 37% e especificidade de 95%. Pelo método de Euclidian's *index*, o *cutoff* foi de 2,30% com sensibilidade de 40% e especificidade de 90% (Figura 33A e 33B, tabela 7).

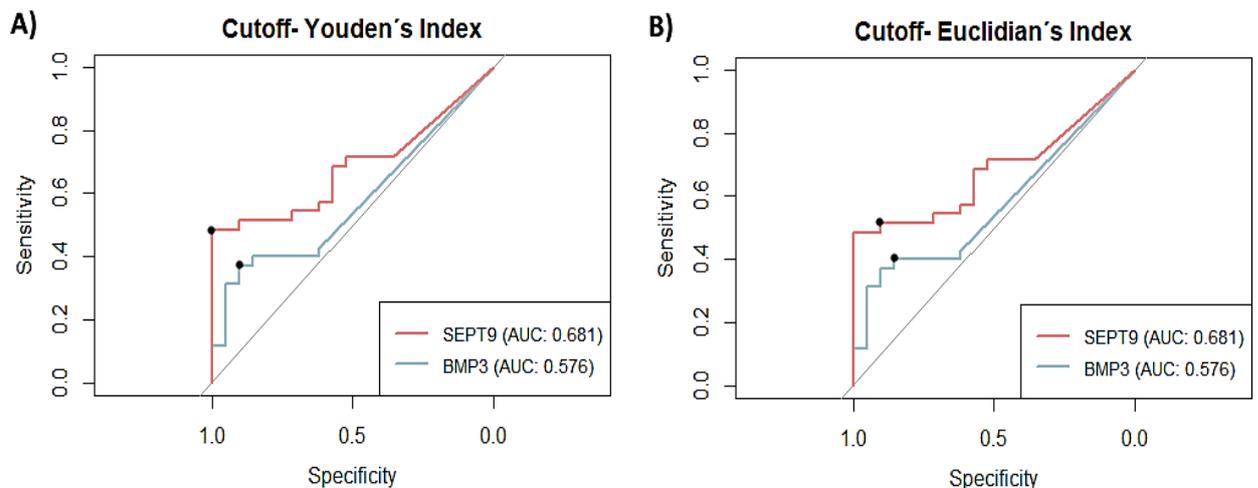


Figura 33 - Curvas ROC utilizando os dois métodos de cálculo para análise da metilação dos genes *SEPT9* e *BMP3* no grupo sem lesões significativas vs grupo câncer.

De acordo com os resultados obtidos para sensibilidade e especificidade nas duas metodologias, o método de Euclidian's *index* foi escolhido para as análises posteriores. Em seguida, os participantes foram divididos em mais dois grupos para o cálculo dos *cutoffs*: grupo de participantes com adenomas precoce e avançado, e o grupo adenoma avançado e câncer (Tabela 7).

Tabela 7- Valores de *cutoff* para o status de metilação dos genes *SEPT9* e *BMP3* de acordo com os grupos de pior lesão.

<i>Cutoff</i>	Adenoma Precoce + Adenoma Avançado		Adenoma Avançado + Câncer		Câncer	
	<i>SEPT9</i> 0,73%	<i>BMP3</i> 0,17%	<i>SEPT9</i> 0,84%	<i>BMP3</i> 0,16%	<i>SEPT9</i> 2,50%	<i>BMP3</i> 2,30%
AUC	0,558	0,540	0,645	0,557	0,681	0,576
Sensibilidade	60% (48-70)	45% (34-56)	64% (56-71)	45% (38-54)	50% (33-66)	40% (24-57)
Especificidade	55% (39-69)	62% (46-76)	57% (41-71)	62% (46-76)	90% (76-96)	90% (76-96)
VPP	71% (58-81)	69% (55-80)	85% (76-90)	82% (72-89)	81% (59-94)	77% (52-92)
VPN	42% (29-55)	37% (26-49)	30% (20-41)	23% (16-32)	68% (54-79)	64% (51-76)

AUC: Área abaixo da curva; VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo. Valores em parênteses correspondem ao intervalo de confiança de 95%.

Conforme apresentado na tabela 7, para o grupo de adenoma precoce + adenoma avançado comparado com o grupo sem lesões, o *cutoff* do gene *SEPT9* foi de 0,73% com AUC de 0,558, sensibilidade de 60% e especificidade de 55%. O *cutoff* para o gene *BMP3* foi de 0,17% com AUC de 0,540, sensibilidade de 45% e especificidade de 62%. Para o grupo de adenoma avançado + câncer comparado com o grupo sem lesões, o *cutoff* do gene *SEPT9* foi de 0,84% com AUC de 0,645, sensibilidade de 64% e especificidade de 57%. O *cutoff* para o gene *BMP3* foi de 0,16% com AUC de 0,557, sensibilidade de 45% e especificidade de 62% (Tabela 7, figura 34).

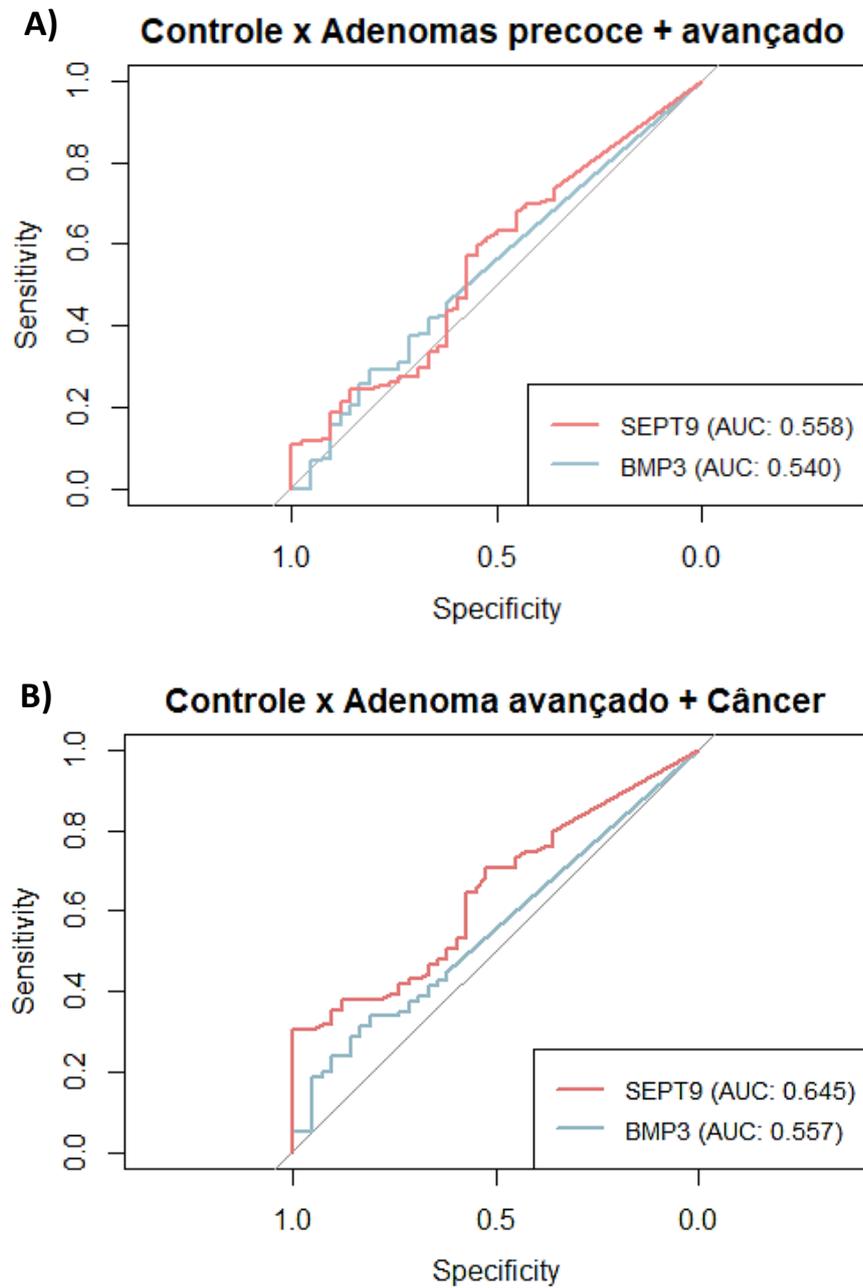


Figura 34- Curvas ROC para análise da metilação dos genes *SEPT9* e *BMP3*: A) Grupo sem lesões significativas vs grupo adenoma precoce + adenoma avançado. B) Grupo sem lesões significativas vs grupo adenoma avançado + câncer.

A partir dos resultados obtidos acima, as frequências de metilação dos genes *SEPT9* e *BMP3* nas amostras foram calculadas a partir dos *cutoffs* que discriminavam câncer vs sem lesões e adenoma avançado (AA) + câncer vs sem lesões para ambos os genes, e associadas com as características demográficas, clínico-patológicos e endoscópicas dos participantes. Em razão do baixo desempenho do modelo construído para adenoma precoce + adenoma avançado para ambos os genes, estes não foram utilizados nesta análise.

Conforme apresentado na tabela 8 para o gene *SEPT9*, considerando o *cutoff* de 0,84%, a frequência de casos positivos foi de 40,5% (17/42) para o grupo sem lesão significativa, 41,7% (5/12) para pólipos hiperplásicos, 57,5% (65/113) para adenoma precoce, 52,3% (23/44) para adenoma avançado e 63,9% (23/36) para câncer, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 8).

Não houve diferença estatisticamente significativa para a associação entre as variáveis de gênero, pior lesão, localização, tamanho, displasia ou estadiamento na comparação com o *cutoff* de 0,84%. Apesar de não ter sido estatisticamente significativo, utilizando o *cutoff* de 0,84%, 100% dos casos de estadiamento IV foram positivos para a metilação de *SEPT9*.

Quando analisado o *cutoff* de 2,50% do grupo câncer, houve diferença estatisticamente significativa na comparação das frequências dos grupos de pior lesão com os valores positivos e negativos considerando o ponto de corte. De acordo com a pior lesão detectada na colonoscopia, a frequência de casos positivos foi de 9,5% (4/42) para o grupo sem lesão significativa, 0% (0/12) para pólipos hiperplásicos, 15,9% (18/113) para adenoma precoce, 16,0% (7/44) para adenoma avançado e 52,7% (19/36) para câncer ($p < 0,001$).

Quanto ao estadiamento do câncer, a frequência de casos positivos foi de 22,2% (2/9) para o estadiamento I, 50,0% (4/4) para estadiamento II, 53,8% (7/13) para o estadiamento III e 100,0% (6/6) para o estadiamento IV ($p = 0,028$).

Não houve diferença estatisticamente significativa para a associação entre as variáveis de gênero, localização, tamanho ou grau de displasia para ambos os *cutoffs*.

Tabela 8- A associação entre a frequência de positividade de metilação do gene *SEPT9* com características clínico-patológicas dos participantes, considerando os valores de *cutoff* de 0,84% e 2,5% do status de metilação.

SEPT9 – Cutoffs							
	0,84 %			p	2,50%		p
	<0,84 Negativo n (%)	>0,84 Positivo n (%)			< 2,50 Negativo n (%)	>2,50 Positivo n (%)	
Gênero (n=247)							
Feminino	157	72 (45,9)	85 (54,1)	0,963	132 (84,1)	25 (15,9)	0,101
Masculino	90	41 (45,6)	49 (54,4)		68 (74,4)	22 (24,4)	
Lesão^a (n= 247)							
Sem lesão ^a	42	25 (59,5)	17 (40,5)		38 (90,5)	4 (9,5)	
Adenomas							
Precoce	113	48 (42,5)	65 (57,5)	0,064	95 (84,1)	18 (15,9)	<0,001
Avançado	44	21 (47,7)	23 (52,3)		37 (84,0)	7 (16,0)	
Pólipo Serrilhado							
PH	12	7 (58,3)	5 (41,7)		12 (100,0)	0 (0,0)	
Cancer	36	13 (36,1)	23 (63,9)		17 (47,3)	19 (52,7)	
Localização^b (n=205)							
Proximal	80	33 (41,3)	47 (58,8)	0,251	67 (83,8)	13 (16,3)	0,182
Distal	79	35 (44,3)	44 (55,7)		60 (75,9)	19 (24,1)	
Ambos	46	21 (45,7)	25 (54,3)		35 (76,1)	11 (23,9)	
Tamanho^c (n=169)							
<10mm	135	59 (43,7)	76 (56,3)	0,510	114 (84,4)	21 (15,6)	0,578
≥10mm	34	17 (50,0)	17 (50,0)		30 (88,2)	4 (11,8)	
Displasia^d (n=156)							
Baixo grau	140	61 (43,6)	79 (56,4)	0,624	119 (85,0)	21 (15,0)	0,291
Alto grau	16	8 (50,0)	8 (50,0)		12 (75,0)	4(25,0)	
Estadiamento do câncer (n=36)							
I	9	6 (66,7)	3 (33,3)	0,066	7 (77,8)	2 (22,2)	0,028
II	8	3 (37,5)	6 (75,0)		4 (50,0)	4(50,0)	
III	13	5 (38,5)	8 (61,5)		6 (46,2)	7 (53,8)	
IV	6	0 (0,0)	6 (100,0)		0 (0,0)	6 (100,0)	

Nota: ^a= Amostras sem lesão significativa na colonoscopia ou com presença de colite. ^b=Localização para grupo de PH, adenomas e Câncer. ^c= Tamanho para grupo de PH e adenomas. ^d=Displasia para grupo de adenomas. Teste de qui-quadrado foi usado para calcular o valor de *p*.

Conforme apresentado na tabela 9 para o gene *BMP3*, não houve diferença estatisticamente significativa para a associação entre as variáveis de gênero, pior lesão, localização, tamanho, displasia ou estadiamento na comparação com o *cutoff* de 0,16%. A frequência de casos positivos foi de 38,1% (16/42) para o grupo sem lesão, 33,3% (4/12) para pólipos hiperplásicos, 45,5% (50/110) para adenoma precoce, 46,7% (21/45) para adenoma avançado e 42,9% (15/35) para o grupo câncer, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 9).

Quanto ao estadiamento do câncer, apesar de não ter sido estatisticamente significativo, utilizando o *cutoff* de 0,16%, 83,3% (5/6) dos casos de estadiamento IV foram positivos para a metilação de *BMP3*. Não houve diferença estatisticamente significativa para a associação entre as variáveis de gênero, pior lesão, localização, tamanho, displasia ou estadiamento na comparação com o *cutoff* de 0,16%.

Considerando o *cutoff* de 2,3% de metilação do gene *BMP3*, a frequência de casos positivos foi de 11,9% (5/42) para o grupo sem lesão, 8,3% (1/12) para pólipos hiperplásicos, 18,2% (20/110) para adenoma precoce, 13,3% (6/45) para adenoma avançado e 37,1% (13/35) para o grupo câncer ($p=0,047$).

Não houve diferença estatisticamente significativa para a associação entre as variáveis de gênero, localização, tamanho, displasia ou estadiamento.

Tabela 9- A associação entre a frequência de positividade de metilação do gene *BMP3* com características clínico-patológicas dos participantes, considerando os valores de *cutoff* de 0,16% e 2,3% do status de metilação.

BMP3 – Cutoffs							
	0,16%			P	2,30%		p
	<0,16 Negativo n (%)	>0,16 Positivo n (%)			<2,30 Negativo n (%)	>2,30 Positivo n (%)	
Gênero (n=244)							
Feminino	156	88 (56,4)	68 (43,6)	0,951	134 (85,9)	22 (14,1)	0,330
Masculino	88	50 (56,8)	38 (43,2)		66 (75,0)	22 (25,0)	
Lesão^a (n= 244)							
Sem lesão ^a	42	26 (61,9)	16 (38,1)		37 (88,1)	5 (11,9)	
Adenomas							
Precoce	110	60 (54,5)	50 (45,5)	0,850	90 (81,8)	20 (18,2)	0,047
Avançado	45	24 (53,3)	21 (46,7)		39 (86,7)	6 (13,3)	
Serrilhado							
PH	12	8 (66,7)	4 (33,3)		11 (91,7)	1 (8,3)	
Cancer	35	20 (57,1)	15 (42,9)		22 (62,9)	13 (37,1)	
Localização^b (n=202)							
Proximal	78	42 (53,8)	16 (38,1)	0,500	65 (83,3)	13 (16,7)	0,586
Distal	79	48 (60,8)	31 (39,2)		62 (78,5)	17 (21,5)	
Ambos	45	22 (48,9)	23 (51,1)		36 (80,0)	9 (20,0)	
Tamanho^c (n=167)							
<10mm	133	75 (56,4)	58 (43,6)	0,504	112 (84,1)	21 (15,9)	0,860
≥10mm	34	17 (50,0)	17 (50,0)		29 (82,9)	5 (14,7)	
Displasia^d (n=154)							
Baixo grau	139	73 (52,5)	66 (47,5)		113 (82,0)	25 (18,0)	0,132
Alto grau	15	10 (66,7)	5 (33,3)		15 (100,0)	0 (0,0)	
Estadiamento do câncer (n=35)							
I	9	4 (44,4)	5 (55,6)	0,065	4 (44,4)	5 (55,6)	0,112
II	8	6 (75,0)	2 (25,0)		7 (87,5)	1 (12,5)	
III	12	9 (75,0)	3 (25,0)		9 (75,0)	3 (25,0)	
IV	6	1 (16,7%)	5 (83,3)		2 (33,3)	4 (66,7)	

Nota: ^a= Amostras sem lesão significativa na colonoscopia ou com presença de colite. ^b=Localização para grupo de PH, adenomas e Câncer. ^c= Tamanho para grupo de PH e adenomas. ^d=Displasia para grupo de adenomas. Teste de qui-quadrado foi usado para calcular o valor de *p*.

7.6 Distribuição das amostras quanto ao status de metilação e o grupo de pior lesão

Conforme os resultados obtidos para os genes *SEPT9* (Figura 26) e *BMP3* (Figura 30), gerou-se um *heatmap* com as 247 amostras distribuídas quanto ao grupo de pior lesão detectada e quanto ao status de metilação (Figura 35).

Para o gene *SEPT9*, no grupo sem lesão significativa + pólipos hiperplásicos as maiores porcentagens de metilação encontradas foram na faixa de 2-5%, sendo que em 26,0% (14/54) das amostras as porcentagens estavam abaixo de 2% e em 55,5% (30/54) das amostras os valores foram de 0%. No grupo adenoma precoce as maiores porcentagens de metilação encontradas foram na faixa de 10-20%, sendo que em 27,4% (31/113) das amostras as porcentagens estavam abaixo de 2% e em 41,6% (47/113) das amostras os valores foram 0%. No grupo adenoma avançado as maiores porcentagens de metilação encontradas foram na faixa de 2-5%, sendo que em 34,0% (15/44) das amostras as porcentagens estavam abaixo de 2% e em 36,4% (16/44) das amostras os valores foram de 0%.

No grupo câncer, as maiores porcentagens de metilação estavam acima de 80% e 52,7% (19/36) das amostras estavam acima da faixa de 2-5%. Quando dividido de acordo com o estadiamento, a porcentagem de amostras que estavam acima da faixa de 2-5% foram: 33,3% (3/9) no estadiamento I, 37,5% (3/8) no estadiamento II, 54,0% (7/13) no estadiamento III e 100,0% (6/6) das amostras no estadiamento IV. Sendo assim, o valor do *status* de metilação das amostras aumenta conforme o estadiamento do CCR é classificado como mais avançado.

Para o gene *BMP3*, no grupo sem lesão significativa + pólipos hiperplásicos as maiores porcentagens de metilação encontradas foram na faixa de 10-20%, sendo que em 14,8% (8/54) das amostras as porcentagens estavam abaixo de 2% e em 72,2% (39/54) das amostras os valores foram de 0%. No grupo adenoma precoce as maiores porcentagens de metilação encontradas foram na faixa de 10-20%, sendo que em 16,0% (18/113) das amostras as porcentagens estavam abaixo de 2% e em 61,0% (69/113) das amostras os valores foram de 0%. No grupo adenoma avançado as maiores porcentagens de metilação encontradas foram na faixa de 10-20%, sendo que em 13,6% (6/44) das amostras as porcentagens estavam abaixo de 2% e em 63,6% (28/44) das amostras os valores foram de 0%.

No grupo câncer, as maiores porcentagens de metilação estavam acima de 80% e 36,1% (13/36) das amostras estavam acima da faixa de 2-5%. Quando dividido de acordo com o estadiamento, a porcentagem de amostras acima da faixa de 2-5% foram: 44,4% (4/9) das

amostras no estadiamento I, 25,0% (2/8) das amostras no estadiamento II, 23,0% (3/13) das amostras do estadiamento III, 66,6% (4/6) das amostras no estadiamento IV. Sendo assim, o valor do *status* de metilação das amostras não aumenta conforme o estadiamento do CCR é classificado como mais avançado.

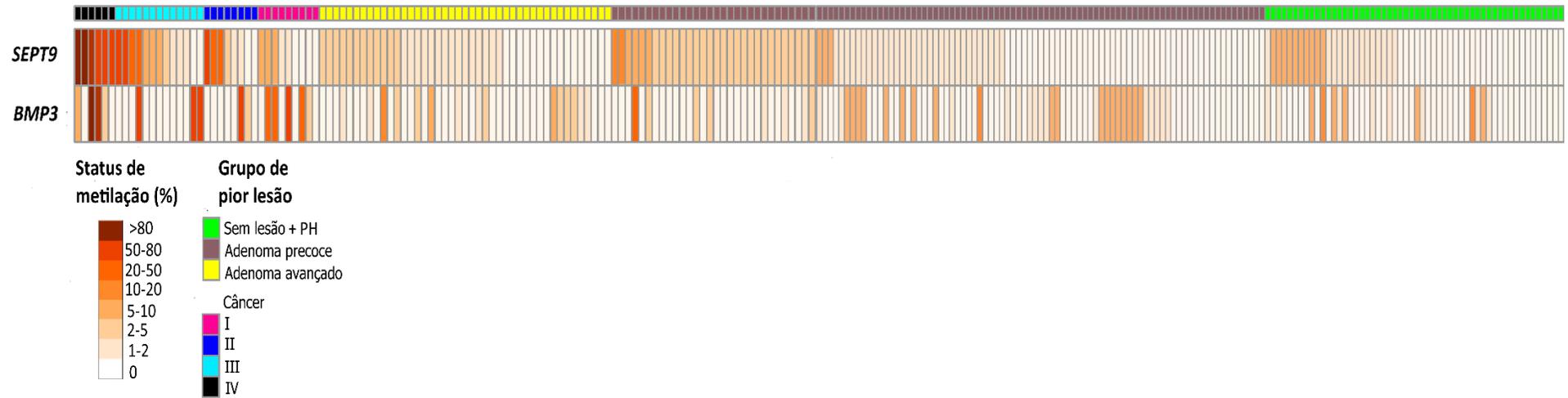


Figura 35- Status de metilação para os genes *SEPT9* e *BMP3* no total de amostras analisadas por ddPCR.

7.7 Modelo de combinação dos genes *SEPT9* e *BMP3*

A regressão logística é uma ferramenta estatística utilizada para realizar análises preditivas a fim de que se obtenha uma estimativa da probabilidade de determinado evento ocorrer, levando em consideração a combinação dos marcadores de predição ⁶².

De acordo com os resultados obtidos dos valores de *cutoff* para o status de metilação dos genes *SEPT9* e *BMP3*, foi realizado o teste de regressão logística para o *cutoff* do status de metilação de cada gene a fim de discriminar o grupo sem lesão e o grupo câncer. A partir dos coeficientes do modelo de regressão logística obtidos, gerou-se a curva ROC para a construção de um modelo utilizando a combinação dos genes *SEPT9* + *BMP3* como marcadores de predição (Tabela 10).

Baseado nos resultados da curva de combinação dos genes, gerou-se também um modelo para a combinação dos genes incluindo a variável de idade acima de 60 anos (idade média obtida entre o grupo sem lesão significativa e o grupo câncer).

Tabela 10- Análise de regressão logística utilizando os *cutoffs* do status de metilação para os genes *SEPT9* e *BMP3*.

Cutoff- Status de metilação	B	p-valor	Odds ratio	95% I.C. para Odds Ratio	
<i>BMP3</i>				Inferior	Superior
≥ 2,30%	1,504	0,007	4,497	1,158	14,689
<i>SEPT9</i>					
≥ 2,50%	2,326	<0,001	10,233	2,600	27,747

Na curva gerada para o modelo de combinação dos genes *SEPT9* + *BMP3*, o melhor valor de probabilidade predita observado para os dois marcadores de predição foi de 43% (0,43), apresentando um AUC de 0,774, sensibilidade de 63,0% e especificidade de 95,0% (Figura 36). Sendo assim, os valores de sensibilidade e a especificidade são em relação a estimativa da probabilidade que foi gerada a partir do status de metilação nos dois genes, levando em consideração os *cutoffs* obtidos anteriormente.

Em relação a curva gerada para o modelo de combinação do *SEPT9* + *BMP3* + idade acima de 60 anos, o melhor valor de probabilidade predita observado para os dois marcadores de predição foi de 34% (0,34), apresentando um AUC de 0,845, sensibilidade de 80,0% e especificidade de 81,0% (Figura 36).

Quando comparado com os genes analisados individualmente, e apenas com a combinação dos genes sem nenhuma outra variável de análise, o modelo de combinação do *SEPT9* + *BMP3* + idade acima de 60 anos apresentou o maior valor de área abaixo da curva (0,845) e resultados mais satisfatórios para os indicadores de sensibilidade (80,0%) e especificidade (81,0%) do teste (Figura 36). A partir disso, foi construído o gráfico para análise das distribuições de probabilidade predita para este modelo (Figura 37).

O gráfico para a distribuição de probabilidade predita para o modelo de combinação *SEPT9* + *BMP3* + idade acima de 60 anos mostrou uma diferença estatisticamente significativa da probabilidade de risco comparando o grupo sem lesão com o grupo câncer ($p=0,001$) (Figura 37).

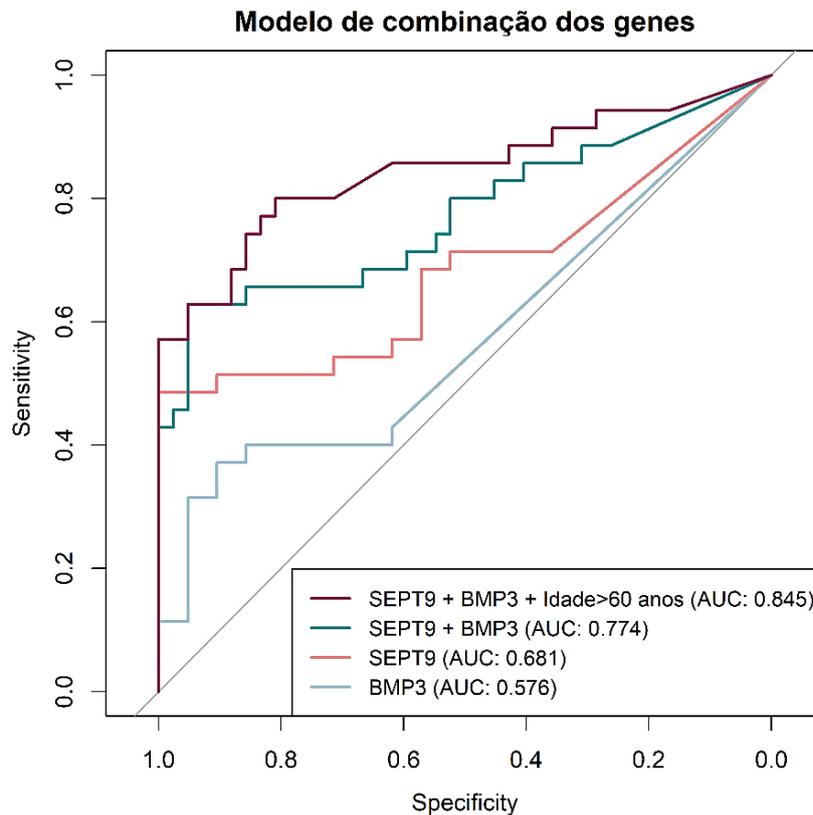


Figura 36 – Curvas ROC do *status* de metilação para análise individual dos genes e para os modelos de combinação.

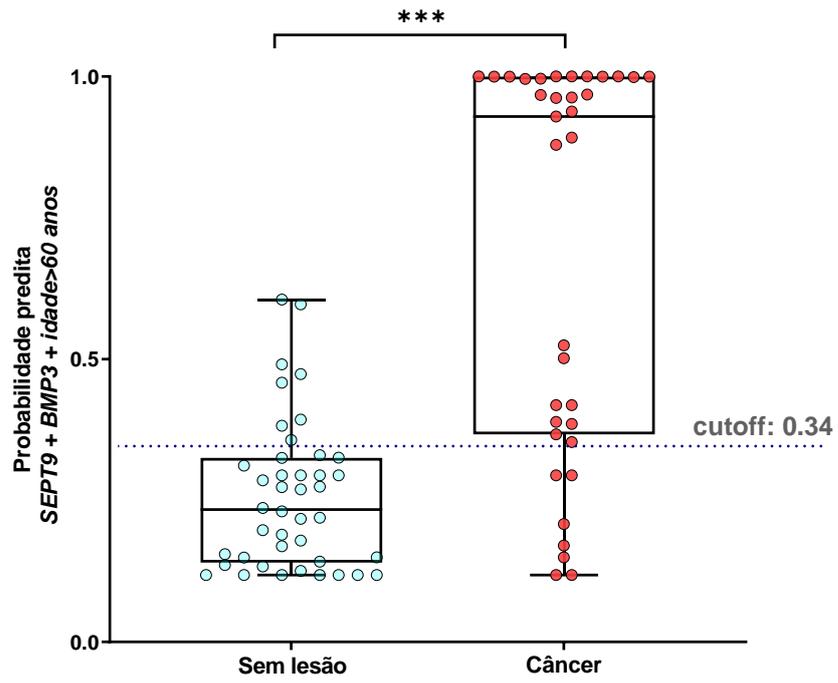


Figura 37 – Comparação entre as distribuições de probabilidade predita do modelo de combinação dos genes e idade média entre o grupo sem lesão e o grupo câncer ($p=0,001$); *** $p<0,001$.

8 DISCUSSÃO

O desenvolvimento do câncer colorretal (CCR) resulta de múltiplos fatores incluindo o acúmulo de alterações epigenéticas, como a alteração dos padrões de metilação do DNA, que pode ocorrer desde os estágios iniciais de desenvolvimento e progressão do câncer⁹. Essas alterações podem ser caracterizadas pela hipometilação global do genoma ou hipermetilação em ilhas CpG de regiões promotoras de genes, esta última podendo ocasionar o silenciamento da expressão de importantes genes supressores tumorais⁶⁴.

O longo período de progressão das lesões precursoras (adenoma) para o CCR, cerca de 7 a 10 anos, torna possível a detecção precoce e remoção das lesões no cólon e reto^{5 8}. Dessa forma, o rastreamento do CCR pode reduzir a mortalidade e a incidência desta doença por meio da remoção das lesões precursoras que originam o câncer ou a detecção ainda em uma fase curativa⁶⁵, através de diferentes testes, sendo mais utilizado entre vários países a pesquisa de sangue oculto nas fezes. O uso de estratégias de detecção menos invasivas como a utilização de fluídos corporais (também denominados de “biópsia líquida”) tem sido investigado por diversos autores, na última década, como uma meio para aumentar a acurácia dos testes atualmente utilizados^{40 35}. Como a detecção precoce é um objetivo crítico no rastreamento do câncer, a investigação da metilação de regiões promotoras de genes no DNA tumoral circulante (ctDNA), que é componente originário de células tumorais e presente no DNA livre circulante (cfDNA), representam uma classe de biomarcadores moleculares de diagnóstico que podem auxiliar e complementar os testes atualmente utilizados no rastreamento do CCR^{35 37}.

Baseado em estudo prévio do nosso grupo, em amostras de tecido proveniente de câncer colorretal e de lesões precursoras (adenoma, lesão séssil serrilhada), comparadas com o tecido normal e lesões sem aparente potencial de malignidade²³, o presente estudo analisou a metilação na região promotora dos genes supressores tumorais *SEPT9* e *BMP3*, em amostras de biópsia líquida (plasma), e avaliou a acurácia destes genes na detecção de pacientes portadores destas lesões colorretais. Para isso, foi avaliada a presença da metilação no cfDNA em amostras de plasma de pacientes do programa de rastreamento do CCR que apresentaram teste de sangue oculto nas fezes (FIT) positivo e submetidos a colonoscopia diagnóstica, além de uma população de pacientes com CCR diagnosticados no Hospital de Câncer de Barretos-Hospital de Amor. Além disso, avaliou-se a frequência na qual as alterações epigenéticas

estavam presentes em amostras dos participantes estratificados de acordo com a pior lesão diagnosticada na colonoscopia (sem lesão significativa, adenoma precoce, adenoma avançado e câncer) e os *cutoffs* de detecção das lesões.

Estudos prévios reportaram diferença significativa entre a concentração de cfDNA em ng/ml de plasma em pacientes com câncer colorretal quando comparados com indivíduos saudáveis, após realizarem a quantificação por métodos fluorimétricos como Qubit e Quantifluor^{38 66}. Junca e colaboradores observaram maior valor de mediana para o nível de cfDNA no grupo de pacientes com câncer colorretal (13,53 ng/ml) e também, uma diferença significativa na comparação da concentração do cfDNA do grupo câncer com os grupos sem lesão (9,0 ng/ml), adenoma precoce (8,6 ng/ml) e adenoma avançado (10,3 ng/ml)⁶⁶. Estes resultados são concordantes com os achados do presente estudo, visto que dentre os grupos estratificados de acordo com a pior lesão detectada na colonoscopia, o grupo câncer também apresentou o maior valor de mediana para o nível de cfDNA em ng/ml de plasma, correspondendo a 10,4 ng/ml e o grupo sem lesão apresentou o valor de 8,1 ng/ml de plasma. Na comparação entre grupos, houve diferença significativa na concentração de cfDNA do grupo câncer + adenoma avançado (9,0 ng/ml) com o grupo sem lesão significativa + pólipos hiperplásico (6,8 ng/ml), indicando que os maiores níveis de cfDNA em ng/ml foram detectáveis em participantes com lesões mais avançadas em comparação com o grupo sem lesão significativa, ou com presença de pólipos hiperplásicos do cólon esquerdo ou do reto.

Estudos recentes utilizam a técnica de *droplet digital* PCR (ddPCR) para a detecção de eventos raros, como a análise e quantificação de alelos metilados para detecção de carcinoma hepatocelular⁶⁷, câncer de pâncreas⁶⁸ e também câncer colorretal⁵². Um estudo de Suehiro e colaboradores analisou por meio da técnica de ddPCR, a metilação do gene *SEPT9* no cfDNA presente em amostra de plasma de participantes de rastreamento do CCR, e obteve os valores de mediana do número de cópias metiladas para os grupos estudados semelhantes ao do presente estudo: 2,0 cópias para o grupo controle, 2,0 cópias para adenoma precoce, 3,6 cópias para adenoma avançado e 2,1 cópias para o grupo câncer (estadiamento I, II e III)⁶⁹. No presente estudo, os resultados obtidos para a mediana do número de cópias metiladas do gene *SEPT9* por ml de plasma foram similares ao estudo citado anteriormente (3,8 cópias para o grupo sem lesão, 3,5 cópias para o grupo de adenoma precoce e 4,1 para o grupo de adenoma avançado), com exceção do grupo câncer que apresentou um valor aproximadamente oito vezes maior, correspondendo a 16,5 cópias metiladas. Esses

resultados indicam o aumento do valor do número de cópias metiladas conforme a presença de lesões mais avançadas como adenomas avançado e câncer. Um estudo de junca e colaboradores, além dos níveis de ctDNA, eles avaliaram a performance diagnóstica da mutação de *KRAS* e *BRAF* no ctDNA, para a detecção de CCR ou AA dos mesmos pacientes, pela técnica de ddPCR (PCR digital). A sensibilidade foi de 45% e 75% para o CCR nos pacientes com qualquer CCR (mutado ou selvagem) e para os pacientes com CCR com mutação de *KRAS* ou *BRAF*, respectivamente para AA foi de 2,6% e 4,3%, respectivamente e para o AA + CCR foi de 16,9% e 28,6%, respectivamente.

Na literatura vários estudos que utilizam a ddPCR para detecção do CCR e suas lesões precursoras, realizam análises da frequência de metilação genes supressores tumorais de interesse em amostras de tecido⁵², plasma e soro de pacientes^{70 71 72} aplicando como *cutoff* o valor de que melhor separa as populações negativas e positivas nos resultados dos gráficos de fluorescência do ddPCR. Bach e colaboradores analisaram por *Quantitative Methylation Specific PCR* (qMSP) a metilação do gene *SEPT9* no cfDNA em amostras de urina utilizando o valor de Ct como *cutoff*⁷³. Já em Suehiro e colaboradores, o *cutoff* para o cálculo da frequência da metilação nos grupos de pior lesão foi estabelecido através da quantificação absoluta do número cópias metiladas do gene *SEPT9*, obtido através da técnica de ddPCR⁶⁹. Até o presente momento não foram encontrados estudos que aplicam a técnica de ddPCR com discriminação alélica para detecção de metilação no cfDNA em amostras de plasma, e que utilizem o *cutoff* que discrimina os grupos estudados a partir do cálculo do *status* de metilação das amostras.

No presente estudo, a frequência de metilação para cada gene foi calculada a partir de *cutoffs* baseados nos resultados do *status* de metilação das amostras. Para o gene *SEPT9*, as amostras foram estratificadas de acordo com a pior lesão detectada na colonoscopia e dois *cutoffs* foram estabelecidos de acordo com as lesões analisadas: para o grupo adenoma avançado + câncer (*cutoff* de 0,84%) e para o grupo somente câncer (*cutoff* de 2,50%) quando comparada às amostras normais. Utilizando o *cutoff* de 0,84%, a frequência de metilação foi de 66,6% (24/36) no câncer e 40,5% (17/42) no grupo sem lesão significativa. Utilizando o *cutoff* de 2,50%, a frequência de metilação foi de 52,7% (19/36) no câncer e 9,5% (4/42) no grupo sem lesão significativa, indicando que o *cutoff* de 2,50% apresenta melhor discriminação entre as frequências de metilação do grupo câncer com o grupo sem lesão. Os nossos resultados obtidos com o *cutoff* de 2,50% são comparáveis aos achados de Potter e colaboradores onde após a coleta prospectiva de amostra de plasma em participantes de

rastreamento do CCR, detectaram a metilação de *SEPT9* em 68% (IC 95%= 53%-80%) no grupo câncer e de 22% (IC 95%= 18%-26%) no grupo controle ⁷⁴, indicando maior número de participantes com metilação no grupo CCR quando comparados com as amostras de plasma de participantes sem lesão. Além disso, outros estudos mostraram uma variação na frequência de metilação do gene *SEPT9* de 72,2% (65/90) a 95,6% (88/92) no grupo câncer e no grupo sem lesão significativa a variação de 11,0% (17/155) a 15,2% (14/92)^{33 75}.

Para os adenomas, a frequência de metilação do gene *SEPT9* utilizando o *cutoff* de 0,84% para o *status* de metilação no grupo de adenoma precoce foi de 57,5% (65/113) e no grupo de adenoma avançado foi de 52,3% (23/44). Utilizando o *cutoff* de 2,50%, a frequência de metilação do gene *SEPT9* para o *status* no grupo de adenoma precoce foi de 15,9% (18/113) e no grupo de adenoma avançado foi de 16,0% (7/44). Estes achados indicam que nenhum dos *cutoffs* calculados conseguem discriminar as frequências de metilação presentes nos adenomas precoces e avançado, visto que as porcentagens obtidas apresentam valores muito próximos. Os nossos resultados de frequência de metilação em adenomas utilizando o *cutoff* de 2,50% são comparáveis aos achados de Potter e colaboradores, no qual foi observada a frequência de 20% (87/435), variando de 16-24% no grupo adenoma precoce e frequência de metilação de 21,6% (134/621), variando de 18-24% no grupo adenoma avançado⁷⁴. Um estudo de Wu e colaboradores analisaram a metilação do *SEPT9* em plasma de participantes do programa de rastreamento e detectaram a frequência de metilação de 10,0% (21/214) no grupo de participantes que apresentaram adenomas (precoce ou avançado) como pior lesão detectada na colonoscopia⁷⁶.

No presente estudo, também avaliamos a frequência de metilação para o gene *BMP3*, que foi calculada a partir de *cutoffs* baseados nos resultados do *status* de metilação das amostras. As amostras foram estratificadas de acordo com a pior lesão detectada na colonoscopia e dois *cutoffs* foram estabelecidos: para o grupo adenoma avançado + câncer (*cutoff* de 0,16%) e para o grupo somente câncer (*cutoff* de 2,30%). Utilizando o *cutoff* de 0,16%, a frequência de metilação foi de 42,8% (15/35) no câncer e 38,0% (16/42) no grupo sem lesão significativa. Utilizando o *cutoff* de 2,30%, a frequência de metilação foi de 37,1% (13/35) no câncer e 11,9% (5/42) no grupo sem lesão significativa, indicando que o *cutoff* de 2,30% apresenta melhor discriminação entre as frequências de metilação do grupo câncer com o grupo sem lesão, no entanto o gene *BMP3* apresenta uma capacidade discriminatória inferior comparada com os resultados do gene *SEPT9*. Os resultados para o *cutoff* de 2,30%

são comparáveis aos achados de Rasmussen e colaboradores onde através da análise do cfDNA em amostras de plasma, foi possível detectar a frequência de metilação de 28,5% (55/193), variando de 22-35% nas amostras do grupo câncer e de 11,0% (11/102), variando de 5-18% nas amostras do grupo sem lesão⁴³. Além disso, outros estudos apresentam uma variação na frequência de metilação do gene *BMP3* de 40,0% (18/45) a 75,0% (44/59) no grupo câncer e no grupo sem lesão significativa a variação de 6,0% (3/50) a 30,2% (11/37)^{77 78}.

Para os adenomas, a frequência de metilação do gene *BMP3* utilizando o *cutoff* de 0,16% para o status no grupo de adenoma precoce foi de 45,5% (50/110) e no grupo de adenoma avançado foi de 46,7% (21/45). Utilizando o *cutoff* de 2,30%, a frequência de metilação do gene *BMP3* para o status no grupo de adenoma precoce foi de 18,2% (20/110) e no grupo de adenoma avançado foi de 13,3% (6/45). Estes achados indicam que nenhum dos *cutoffs* calculados conseguem discriminar as frequências de metilação presentes nos adenomas precoces e avançado, visto que as porcentagens obtidas apresentam valores muito próximos. Não foram encontrados estudos que analisassem a metilação do gene *BMP3* em plasma de indivíduos que apresentavam como pior lesão detectada na colonoscopia os adenomas precoces ou adenomas avançados, ou que também aplicassem a técnica de ddPCR para detecção do status de metilação. A maioria dos estudos analisados até o presente momento, avaliam a metilação deste gene nos grupos de adenomas precoces e avançados a partir da detecção em amostras de fezes^{79 24 44 80} e em biópsias do tecido da lesão^{79 81 82}.

Nos EUA, o teste Epi proColon[®] foi aprovado para uso clínico no rastreamento do CCR, e consiste em um teste diagnóstico para detecção da metilação do gene *SEPT9* a partir de amostras do sangue periférico utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR). Entretanto sua acurácia para detectar estágios iniciais do CCR são subótimos para o rastreamento⁸³. Um estudo prospectivo chamado PRESEPT (*Prospective Evaluation of Septin9*), utilizou uma coorte de 1.544 participantes para avaliar a performance clínica da metilação do *SEPT9* em uma população de rastreamento de CCR. Os resultados apresentaram a sensibilidade de 35,0%, 63,0%, 46,0% e 77,4% para os estádios de I a IV respectivamente, e a especificidade de 91,5%. Além disso a detecção para adenomas avançados apresentou um menor valor para sensibilidade (11,2%)³⁴. Posteriormente a este estudo, um ensaio clínico de Xie e colaboradores para detecção da metilação do gene *SEPT9* também por qPCR, relatou a sensibilidade de 61,8% e especificidade de 86,4% para a detecção do CCR⁸⁴.

No presente estudo, o ensaio para detecção da metilação no gene *SEPT9* apresentou para o grupo adenoma precoce + adenoma avançado a sensibilidade de 60,0% e especificidade de 55,0% e para o grupo adenoma avançado + câncer a sensibilidade foi de 64,0% e especificidade de 57,0%. Para o grupo câncer a sensibilidade foi de 50,0% e especificidade de 90,0%. Um trabalho recente utilizando também ddPCR em amostras de plasma para detecção da metilação do gene *SEPT9* no cfDNA de participantes do rastreamento do CCR, detectou a sensibilidade de 40,0% para adenoma precoce + adenoma avançado e 55,6% para CCR, já a especificidade foi de 80%⁶⁹. Em suma, os nossos achados juntamente com a literatura, sugerem que somente a análise da metilação do gene *SEPT9* pode ser limitante na detecção do CCR e principalmente das lesões precursoras.

A análise da metilação do gene *BMP3* é um exemplo de alteração que atualmente é empregada em testes comerciais para a detecção precoce do CCR e de suas lesões precursoras. O teste Colonguard® foi aprovado nos EUA para o rastreamento do CCR. Este teste é realizado em amostras de fezes e inclui ensaios moleculares para detecção da mutação do gene *KRAS* e biomarcadores de metilação associados à neoplasia colorretal (genes *NDRG4* e *BMP3*), além do ensaio imunológico para detecção da hemoglobina humana⁸⁵. O teste Colonguard® apresenta uma sensibilidade de 92,3% e especificidade de 90,0% para o CCR e sensibilidade de 42,4% para adenomas avançados⁸⁶.

No presente trabalho, a análise isolada da metilação do gene *BMP3* apresentou para o grupo adenoma precoce + adenoma avançado a sensibilidade de 45,0% e especificidade de 62,0%, para o grupo adenoma avançado + câncer a sensibilidade de 45,0% e especificidade de 62,0%. Para o grupo câncer a sensibilidade foi de 40,0% e especificidade de 90,0%. Um estudo que avaliou a metilação de vários genes incluindo o *BMP3* em amostras de plasma de pacientes com CCR através da técnica de qMSP, detectou para este gene a sensibilidade de 28,5% e especificidade de 79,0% para discriminação do modelo de CCR e pacientes sem lesão⁴³. Em um outro estudo caso-controle utilizando a técnica de qMSP em amostras de plasma, Ashoori e colaboradores detectaram a sensibilidade de 76,0% e especificidade de 66% do gene *BMP3* para detecção de CCR⁷⁷. Até o presente momento, não foram encontrados estudos que analisassem a metilação do gene *BMP3* em plasma de indivíduos com pior lesão detectada na colonoscopia sendo adenomas precoces ou adenomas avançados, ou que também utilizassem a técnica de ddPCR para detecção dos níveis de metilação e construção do modelo de curva ROC.

Tem sido reportado que a combinação de biomarcadores metilados em amostras de soro e plasma podem alcançar uma maior sensibilidade e especificidade, e assim melhorar a detecção de lesões precursoras e rastreamento do CCR^{87 88}. Dentre os genes investigados para o CCR, vários trabalhos avaliam o desempenho diagnóstico do gene *SEPT9* junto com outros genes candidatos^{43 89 90}, porém até o momento não foram encontrados estudos que analisassem a metilação do *SEPT9* em associação com outros genes utilizando a técnica de ddPCR. Um estudo recente de Jensen e colaboradores, avaliou o perfil de metilação de mais de 5.000 tumores e identificaram por ddPCR três genes marcadores (*C9orf50*, *KCNQ5* e *CLIP4*) de metilação do DNA específicos para CCR. A combinação dos três genes apresentou uma sensibilidade de 85% e especificidade de 95% para detecção de CCR⁷¹.

Um estudo de Rasmussen e colaboradores analisou a metilação do DNA em amostras de plasma utilizando um painel de cinco genes marcadores (*RARB*, *SEPT9*, *ALX4*, *BMP3* e *NPTX2*), incluindo *SEPT9* e *BMP3*, na detecção de CCR utilizando a técnica de qMSP. Os resultados obtidos mostraram uma sensibilidade de 87,2% para detecção do CCR e especificidade de 73,5%⁴³. No presente estudo, foi construído o modelo de combinação dos dois genes utilizando a curva ROC e a sensibilidade obtida foi de 63,0% para combinação dos genes *SEPT9* e *BMP3* na detecção do câncer e a especificidade de 95,0%. Observa-se que no presente trabalho utilizando a detecção da metilação de apenas dois genes por ddPCR, obteve-se um valor de especificidade do teste maior quando comparado com os nossos resultados utilizando apenas 1 gene e também com os achados obtidos para um painel de cinco genes por qMSP⁴³. Quando comparado com trabalhos que utilizam a mesma técnica para detecção de metilação (ddPCR), os achados do presente estudo são concordantes aos resultados de Cho e colaboradores que obtiveram uma sensibilidade para todos os estádios do câncer de 57,3% com uma especificidade de 95,0% em um painel de cinco genes marcadores (*FAM123A*, *GLI3*, *PPP1R16B*, *SLIT3* e *TMEM90B*), utilizando a técnica de *MethyLight droplet digital PCR* (MethyLight ddPCR) no cfDNA presente em amostras de plasma⁷².

O envelhecimento e o aumento da idade estão associados a uma variedade de doenças, incluindo o câncer. A maioria dos CCRs esporádicos ocorre em indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos, e com idade média de 60-66 anos no diagnóstico^{7 34}. Vários mecanismos celulares e moleculares mediados pela idade foram propostos para induzir uma tendência no tecido normal do cólon a se transformarem em lesões precursoras e CCR,

incluindo o acúmulo de mutações e alterações epigenéticas como a metilação⁹. Como a idade é um fator associado ao CCR, esta variável pode ser considerada preditora para o risco de desenvolvimento do CCR⁹¹.

No presente trabalho, foi gerada a curva ROC a fim de construir o modelo de predição da combinação dos genes *SEPT9* + *BMP3* + idade acima de 60 anos (obtida da média entre os grupos normal e câncer do nosso estudo). A sensibilidade da combinação dos genes *SEPT9* e *BMP3* + idade acima de 60 anos foi de 80,0% e especificidade 81,0%, resultados superiores aos obtidos para os genes analisados individualmente, e quando comparados com a combinação dos genes sem nenhuma outra variável de análise. Estes resultados são concordantes aos achados de um estudo que utilizou o painel de sete genes incluindo a idade como marcador de predição do modelo de combinação, onde a sensibilidade obtida foi de 90,7% e especificidade de 72,5% para detecção do CCR incluindo os estadiamentos de I-IV⁴³. Os modelos de predição podem ser uma maneira alternativa para atingir a meta de rastreamento para detecção precoce de CCR, onde a probabilidade predita ou a pontuação de risco pode ser construída a partir de dados obtidos na primeira triagem para desenvolver o modelo de predição de risco individual do participante. Este modelo de predição pode então ser aplicado nos rastreios subsequentes.

Uma das limitações do estudo se refere ao número de amostras do grupo câncer quando comparado com o número de amostras do grupo de adenoma precoce, adenoma avançado e sem lesão significativa. Devido ao número reduzido de amostras principalmente nos casos de câncer com estadiamentos menos avançados (I e II), não foi possível realizar a análise da curva ROC, e indicadores de sensibilidade e especificidade para o grupo câncer estratificado de acordo com o estadiamento. Além disso, outra limitação do estudo foi em relação ao número de genes analisados quanto a metilação das regiões promotoras no DNA presente nas amostras de plasma dos participantes. Sendo assim, há a necessidade de investigação da metilação de um painel gênico contendo um maior número de genes supressores tumorais, e assim a identificação de biomarcadores que melhorem a acurácia na detecção do câncer, mas principalmente, das lesões precursoras.

De forma geral, houve pouca variação entre os resultados das frequências de metilação demonstrados por estudos prévios e o presente estudo. Além disso, os maiores valores de cópias metiladas/ml de plasma extraído e valores do *status* de metilação para os *SEPT9* e *BMP3* foram detectados nos pacientes com CCR quando comparado com os grupos

sem lesões significativas ou com lesões precursoras, indicando que a metilação das regiões promotoras dos genes *SEPT9* e *BMP3*, isoladamente, não se apresenta como biomarcador ideal para uso no rastreamento do CCR, neste momento. Por outro lado, os modelos de predição da combinação dos genes *SEPT9* e *BMP3*, e a combinação dos genes mais a idade média de 60 anos, demonstrou melhor performance para detecção do CCR quando comparado com o resultado das curvas para os genes individuais, indicando que a combinação obteve uma maior acurácia no teste.

9 CONCLUSÃO

Pelo presente estudo, conclui-se que:

1. A concentração de cfDNA foi significativamente maior no grupo com adenoma avançado + câncer em comparação com o grupo sem lesão.

2. A status de metilação do gene *SEPT9* foi significativamente maior no grupo CCR quando comparado aos outros grupos. Além disso, o status de metilação do *SEPT9* também foi maior no CCR metastático quando comparado os demais estadiamentos. Quanto a metilação do gene *BMP3*, não houve diferença do status de metilação entre grupos de pior lesão ou entre os grupos de estadiamento do câncer.

3. Em relação a performance de cada gene, para o gene *SEPT9*, utilizando o *cutoff* de 0,84% (AUC=0,645) do status de *metilação*, que discrimina o grupo CCR + AA vs sem lesão, o número de casos positivos de CCR foi de 63,9%, AP de 57,5% e AA de 52,3%, com uma sensibilidade de 64% e especificidade de 57%. Considerando o *cutoff* de 2,50% (AUC=0,681), que discrimina o grupo CCR vs sem lesão, o número de casos positivos de CCR foi de 52,7%, AP de 15,9%, e 16,0% de AA, com uma sensibilidade de 50% e especificidade de 90%. No grupo CCR as maiores frequências de casos positivos foram o do estadiamento IV, 100% em ambos os *cutoffs*.

4. Para o gene *BMP3*, o *cutoff* de 0,16% (AUC=0,557) do status de *metilação*, que discrimina o grupo CCR + AA vs sem lesão, o número de casos positivos de CCR foi de 42,9%, AP de 45,5%, e AA de 46,7%, com uma sensibilidade de 45% e especificidade de 62%. Para o *cutoff* de 2,30% (AUC=0,576), que discrimina o grupo CCR vs sem lesão, a sensibilidade foi de 40% e especificidade de 90% e a frequência com número de casos positivos de 18,2% para o AP, 13,3% de AA e 37,1% para o grupo CCR.

5. O modelo de combinação do *SEPT9* + *BMP3*+ idade acima de 60 anos, mostrou melhor performance para detecção do CCR (AUC= 0,845) com a sensibilidade de 80% e especificidade de 81%.

Concluindo, nossos resultados sugerem que esses biomarcadores isolados não são ideais para serem utilizados no rastreamento do CCR.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. vol. 71, no. 3. pp. 209–249. May 2021. doi: 10.3322/caac.21660.
2. (INCA), I. N. de C. J. A. G. da S. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. 2020. <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>.
3. Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., and Wallace, M. B. Colorectal cancer. **The Lancet**. vol. 394, no. 10207. pp. 1467–1480. Oct. 2019. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
4. Arnold, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**. vol. 66, no. 4. pp. 683–691. Apr. 2017. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
5. Fearon, E. R. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. vol. 6, no. 1. pp. 479–507. Feb. 2011. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130235.
6. Centelles, J. J. General Aspects of Colorectal Cancer. **ISRN Oncology**. vol. 2012. pp. 1–19. 2012. doi: 10.5402/2012/139268.
7. Siegel, R. L. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. vol. 70, no. 3. pp. 145–164. May 2020. doi: 10.3322/caac.21601.
8. Kuipers, E. J. *et al.* Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**. vol. 1, no. 1. p. 15065. Dec. 2015. doi: 10.1038/nrdp.2015.65.
9. Fearon, E. R. and Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**. vol. 61, no. 5. pp. 759–767. Jun. 1990. doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-l.
10. Siegel, R. L. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**.

- vol. 67, no. 3. pp. 177–193. May 2017. doi: 10.3322/caac.21395.
11. Xie, Y.-H., Chen, Y.-X., and Fang, J.-Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. vol. 5, no. 1. p. 22. Dec. 2020. doi: 10.1038/s41392-020-0116-z.
 12. Siegel, Rebecca L.; Miller, Kimberly; Jemal, A. . **American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022**. Atlanta, 2020.
 13. Lambert, R. *et al.* Pragmatic classification of superficial neoplastic colorectal lesions. **Gastrointestinal Endoscopy**. vol. 70, no. 6. pp. 1182–1199. Dec. 2009. doi: 10.1016/j.gie.2009.09.015.
 14. Pawa, N., Arulampalam, T., and Norton, J. D. Screening for colorectal cancer: established and emerging modalities. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. vol. 8, no. 12. pp. 711–722. Dec. 2011. doi: 10.1038/nrgastro.2011.205.
 15. Nagtegaal, I. D. *et al.* The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. **Histopathology**. vol. 76, no. 2. pp. 182–188. Jan. 2020. doi: 10.1111/his.13975.
 16. Organization, W. H. and Board, W. H. O. C. of T. E. **WHO Classification of Tumours, 5^a.**, vol. 1. 2019.
 17. Yamane, L., Scapulatempo-Neto, C., Reis, R. M., and Guimaraes, D. P. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. **World J Gastroenterol**. vol. 20, no. 10. pp. 2634–2640. 2014. doi: 10.3748/wjg.v20.i10.2634.
 18. Tariq, K. and Ghias, K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. **Cancer biology & medicine**. vol. 13, no. 1. pp. 120–35. Mar. 2016. doi: 10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103.
 19. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & development**. vol. 16, no. 1. pp. 6–21. Jan. 2002. doi: 10.1101/gad.947102.

20. Costello, J. F. *et al.* Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. **Nature Genetics**. vol. 24, no. 2. pp. 132–138. Feb. 2000. doi: 10.1038/72785.
21. An, B. *et al.* Characteristic methylation profile in CpG island methylator phenotype-negative distal colorectal cancers. **International Journal of Cancer**. vol. 127, no. 9. pp. 2095–2105. Nov. 2010. doi: 10.1002/ijc.25225.
22. Weisenberger, D. J. *et al.* CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. **Nature genetics**. vol. 38, no. 7. pp. 787–93. Jul. 2006. doi: 10.1038/ng1834.
23. Sobanski, T. *et al.* Methylation profile of colon cancer genes in colorectal precursor lesions and tumor tissue: perspectives for screening. **Scandinavian journal of gastroenterology**. vol. 56, no. 8. pp. 920–928. Aug. 2021. doi: 10.1080/00365521.2021.1922744.
24. Imperiale, T. F. *et al.* Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. **New England Journal of Medicine**. vol. 370, no. 14. pp. 1287–1297. Apr. 2014. doi: 10.1056/NEJMoa1311194.
25. Melotte, V. *et al.* N-Myc downstream-regulated gene 4 (NDRG4): a candidate tumor suppressor gene and potential biomarker for colorectal cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. vol. 101, no. 13. pp. 916–27. Jul. 2009. doi: 10.1093/jnci/djp131.
26. Xiao, W. *et al.* Quantitative detection of methylated NDRG4 gene as a candidate biomarker for diagnosis of colorectal cancer. **Oncology letters**. vol. 9, no. 3. pp. 1383–1387. Mar. 2015. doi: 10.3892/ol.2014.2815.
27. Loh, K. *et al.* Bone morphogenic protein 3 inactivation is an early and frequent event in colorectal cancer development. **Genes, chromosomes & cancer**. vol. 47, no. 6. pp. 449–

60. Jun. 2008. doi: 10.1002/gcc.20552.
28. Park, S.-K. *et al.* Is methylation analysis of SFRP2 , TFPI2 , NDRG4 , and BMP3 promoters suitable for colorectal cancer screening in the Korean population? **Intestinal Research**. vol. 15, no. 4. p. 495. 2017. doi: 10.5217/ir.2017.15.4.495.
29. Wang, Y., Chen, P.-M., and Liu, R.-B. Advance in plasma SEPT9 gene methylation assay for colorectal cancer early detection. **World journal of gastrointestinal oncology**. vol. 10, no. 1. pp. 15–22. Jan. 2018. doi: 10.4251/wjgo.v10.i1.15.
30. McDade, S. S., Hall, P. A., and Russell, S. E. H. Translational control of SEPT9 isoforms is perturbed in disease. **Human Molecular Genetics**. vol. 16, no. 7. pp. 742–752. Apr. 2007. doi: 10.1093/hmg/ddm003.
31. Wasserkort, R. *et al.* Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. **BMC Cancer**. vol. 13. p. 398. 2013. doi: 10.1186/1471-2407-13-398.
32. Lofton-Day, C. *et al.* DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. **Clinical chemistry**. vol. 54, no. 2. pp. 414–23. Feb. 2008. doi: 10.1373/clinchem.2007.095992.
33. deVos, T. *et al.* Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. **Clinical chemistry**. vol. 55, no. 7. pp. 1337–46. Jul. 2009. doi: 10.1373/clinchem.2008.115808.
34. Church, T. R. *et al.* Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. **Gut**. vol. 63, no. 2. pp. 317–325. Feb. 2014. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304149.
35. Normanno, N., Cervantes, A., Ciardiello, F., De Luca, A., and Pinto, C. The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future

- scenarios. **Cancer treatment reviews**. vol. 70. pp. 1–8. Nov. 2018. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.07.007.
36. Lewis, J. M., Heineck, D. P., and Heller, M. J. Detecting cancer biomarkers in blood: challenges for new molecular diagnostic and point-of-care tests using cell-free nucleic acids. **Expert review of molecular diagnostics**. vol. 15, no. 9. pp. 1187–200. 2015. doi: 10.1586/14737159.2015.1069709.
37. Aucamp, J., Bronkhorst, A. J., Badenhorst, C. P. S., and Pretorius, P. J. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. **Biological Reviews**. vol. 93, no. 3. pp. 1649–1683. Aug. 2018. doi: 10.1111/brv.12413.
38. Frattini, M. *et al.* Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. **Cancer Letters**. vol. 263, no. 2. pp. 170–181. May 2008. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.021.
39. Boni, L. *et al.* Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer. **Surgical Oncology**. vol. 16. pp. 29–31. Dec. 2007. doi: 10.1016/j.suronc.2007.10.004.
40. Ignatiadis, M., Sledge, G. W., and Jeffrey, S. S. Liquid biopsy enters the clinic — implementation issues and future challenges. **Nature Reviews Clinical Oncology**. vol. 18, no. 5. pp. 297–312. May 2021. doi: 10.1038/s41571-020-00457-x.
41. Elshimali, Y., Khaddour, H., Sarkissyan, M., Wu, Y., and Vadgama, J. The Clinical Utilization of Circulating Cell Free DNA (CCFDNA) in Blood of Cancer Patients. **International Journal of Molecular Sciences**. vol. 14, no. 9. pp. 18925–18958. Sep. 2013. doi: 10.3390/ijms140918925.
42. Wang, Y., Chen, P. M., and Liu, R. B. Advance in plasma SEPT9 gene methylation assay for colorectal cancer early detection. **World J Gastrointest Oncol**. vol. 10, no. 1. pp. 15–22. 2018. doi: 10.4251/wjgo.v10.i1.15.

43. Rasmussen, S. L. *et al.* Hypermethylated DNA, a circulating biomarker for colorectal cancer detection. **PLOS ONE**. vol. 12, no. 7. p. e0180809. Jul. 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0180809.
44. Ahlquist, D. A. *et al.* Next-Generation Stool DNA Test Accurately Detects Colorectal Cancer and Large Adenomas. **Gastroenterology**. vol. 142, no. 2. pp. 248–256. Feb. 2012. doi: 10.1053/j.gastro.2011.10.031.
45. Guimarães, D. P. *et al.* The Performance of Colorectal Cancer Screening in Brazil: The First Two Years of the Implementation Program in Barretos Cancer Hospital. **Cancer Prevention Research**. vol. 14, no. 2. pp. 241–252. Feb. 2021. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-20-0179.
46. Neuber, A. C. *et al.* The biobank of barretos cancer hospital: 14 years of experience in cancer research. **Cell and Tissue Banking**. Jul. 2021. doi: 10.1007/s10561-021-09941-9.
47. Harris, P. A. *et al.* Research electronic data capture (REDCap)—A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. **Journal of Biomedical Informatics**. vol. 42, no. 2. pp. 377–381. Apr. 2009. doi: 10.1016/j.jbi.2008.08.010.
48. Participants in the Paris Workshop. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon. **Gastrointestinal Endoscopy**. vol. 58, no. 6. pp. S3–S43. Dec. 2003. doi: 10.1016/S0016-5107(03)02159-X.
49. Sherwood, J. L. *et al.* Optimised Pre-Analytical Methods Improve KRAS Mutation Detection in Circulating Tumour DNA (ctDNA) from Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). **PLOS ONE**. vol. 11, no. 2. p. e0150197. Feb. 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0150197.
50. Marques, J. F., Junqueira-Neto, S., Pinheiro, J., Machado, J. C., and Costa, J. L. Induction

- of apoptosis increases sensitivity to detect cancer mutations in plasma. **European Journal of Cancer**. vol. 127. pp. 130–138. Mar. 2020. doi: 10.1016/j.ejca.2019.12.023.
51. Raymond, C. Focused size selection of cell-free DNA samples for liquid biopsy applications that rely on next-generation sequencing. **Biotechniques**. 2019. .
 52. Pharo, H. D. *et al.* A robust internal control for high-precision DNA methylation analyses by droplet digital PCR. **Clinical Epigenetics**. vol. 10, no. 1. p. 24. Dec. 2018. doi: 10.1186/s13148-018-0456-5.
 53. C Litterst D Shelton, and M Patil, S. M. Droplet Digital™ PCR: Detection of DNA Methylation . **Bulletin 6554 Rev A**. 2014. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6554.pdf.
 54. Andersen, A. M., Philibert, R. A., Gibbons, F. X., Simons, R. L., and Long, J. Accuracy and utility of an epigenetic biomarker for smoking in populations with varying rates of false self-report. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**. vol. 174, no. 6. pp. 641–650. 2017. doi: 10.1002/ajmg.b.32555.
 55. Technologies, I. D. N. A. OligoAnalyzer Tool. <https://www.idtdna.com/calc/Analyzer/Home/definitions>.
 56. Sobanski, T. ANÁLISE DO PERFIL DE HIPERMETILAÇÃO DE UM PAINEL DE GENES SUPRESSORESTUMORAIS EM LESÕES PRECURSORAS E NO CÂNCER COLORRETAL. Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, São Paulo. 2018.
 57. Olmedillas-López, S., García-Arranz, M., and García-Olmo, D. Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology. **Molecular Diagnosis & Therapy**. vol. 21, no. 5. pp. 493–510. Oct. 2017. doi: 10.1007/s40291-017-0278-8.
 58. Armbruster DA, P. T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. **The Clinical Biochemist Reviews**. vol. 29. 2008.

59. Garrigou, S. *et al.* A Study of Hypermethylated Circulating Tumor DNA as a Universal Colorectal Cancer Biomarker. **Clinical Chemistry**. vol. 62, no. 8. pp. 1129–1139. Aug. 2016. doi: 10.1373/clinchem.2015.253609.
60. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation, Approved Guideline**, Second edi. PA/USA, 2012.
61. Bio-Rad Laboratories. Droplet Digital PCR Applications Guide. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf (accessed Sep. 08, 2020).
62. Hajian-Tilaki, K. The choice of methods in determining the optimal cut-off value for quantitative diagnostic test evaluation. **Statistical Methods in Medical Research**. vol. 27, no. 8. pp. 2374–2383. Aug. 2018. doi: 10.1177/0962280216680383.
63. Habibzadeh, F., Habibzadeh, P., and Yadollahie, M. On determining the most appropriate test cut-off value: the case of tests with continuous results. **Biochemia Medica**. pp. 297–307. 2016. doi: 10.11613/BM.2016.034.
64. Ashktorab, H. and Brim, H. DNA Methylation and Colorectal Cancer. **Current Colorectal Cancer Reports**. vol. 10, no. 4. pp. 425–430. Dec. 2014. doi: 10.1007/s11888-014-0245-2.
65. Winawer, S. J. *et al.* Prevention of Colorectal Cancer by Colonoscopic Polypectomy. **New England Journal of Medicine**. vol. 329, no. 27. pp. 1977–1981. Dec. 1993. doi: 10.1056/NEJM199312303292701.
66. Junca, A. *et al.* Detection of Colorectal Cancer and Advanced Adenoma by Liquid Biopsy (Decalib Study): The ddPCR Challenge. **Cancers**. vol. 12, no. 6. p. 1482. Jun. 2020. doi: 10.3390/cancers12061482.
67. Kotoh, Y. *et al.* Novel Liquid Biopsy Test Based on a Sensitive Methylated SEPT9 Assay

- for Diagnosing Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology Communications**. vol. 4, no. 3. pp. 461–470. Mar. 2020. doi: 10.1002/hep4.1469.
68. Shinjo, K. *et al.* A novel sensitive detection method for DNA methylation in circulating free DNA of pancreatic cancer. **PLOS ONE**. vol. 15, no. 6. p. e0233782. Jun. 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0233782.
69. Suehiro, Y. *et al.* Blood free-circulating DNA testing by highly sensitive methylation assay to diagnose colorectal neoplasias. **Oncotarget**. vol. 9, no. 24. pp. 16974–16987. Mar. 2018. doi: 10.18632/oncotarget.24768.
70. Jensen, S. Ø., Øgaard, N., Nielsen, H. J., Bramsen, J. B., and Andersen, C. L. Enhanced Performance of DNA Methylation Markers by Simultaneous Measurement of Sense and Antisense DNA Strands after Cytosine Conversion. **Clinical Chemistry**. vol. 66, no. 7. pp. 925–933. Jul. 2020. doi: 10.1093/clinchem/hvaa100.
71. Jensen, S. Ø. *et al.* Novel DNA methylation biomarkers show high sensitivity and specificity for blood-based detection of colorectal cancer—a clinical biomarker discovery and validation study. **Clinical Epigenetics**. vol. 11, no. 1. p. 158. Dec. 2019. doi: 10.1186/s13148-019-0757-3.
72. Cho, N.-Y. *et al.* Blood-Based Detection of Colorectal Cancer Using Cancer-Specific DNA Methylation Markers. **Diagnostics**. vol. 11, no. 1. p. 51. Dec. 2020. doi: 10.3390/diagnostics11010051.
73. Bach, S. *et al.* Detection of colorectal cancer in urine using DNA methylation analysis. **Scientific Reports**. vol. 11, no. 1. p. 2363. Dec. 2021. doi: 10.1038/s41598-021-81900-6.
74. Potter, N. T. *et al.* Validation of a Real-Time PCR–Based Qualitative Assay for the Detection of Methylated SEPT9 DNA in Human Plasma. **Clinical Chemistry**. vol. 60, no.

9. pp. 1183–1191. Sep. 2014. doi: 10.1373/clinchem.2013.221044.
75. Tóth, K. *et al.* Detection of Methylated SEPT9 in Plasma Is a Reliable Screening Method for Both Left- and Right-Sided Colon Cancers. **PLoS ONE**. vol. 7, no. 9. p. e46000. Sep. 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0046000.
76. Wu, D. *et al.* Detection of Colorectal Cancer Using a Simplified SEPT9 Gene Methylation Assay Is a Reliable Method for Opportunistic Screening. **The Journal of Molecular Diagnostics**. vol. 18, no. 4. pp. 535–545. Jul. 2016. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.02.005.
77. Ashoori, H. *et al.* Evaluation of the Epigenetic Biomarker Bone Morphogenic Protein 3 for Colorectal Cancer Diagnosis. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**. vol. 12, no. 11. pp. GC07–GC09. 2018. doi: 10.7860/JCDR/2018/37101.12260.
78. Rokni, P., Shariatpanahi, A. M., Sakhinia, E., and Kerachian, M. A. BMP3 promoter hypermethylation in plasma-derived cell-free DNA in colorectal cancer patients. **Genes & Genomics**. vol. 40, no. 4. pp. 423–428. Apr. 2018. doi: 10.1007/s13258-017-0644-2.
79. Chen, J. *et al.* DNA methylation biomarkers in stool for early screening of colorectal cancer. **Journal of Cancer**. vol. 10, no. 21. pp. 5264–5271. 2019. doi: 10.7150/jca.34944.
80. Mu, J. *et al.* Plausibility of an extensive use of stool DNA test for screening advanced colorectal neoplasia. **Clinica Chimica Acta**. vol. 501. pp. 42–47. Feb. 2020. doi: 10.1016/j.cca.2019.12.001.
81. Zou, H. *et al.* Highly Methylated Genes in Colorectal Neoplasia: Implications for Screening. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**. vol. 16, no. 12. pp. 2686–2696. Dec. 2007. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0518.
82. Zou, H. Z. *et al.* Quantification of Methylated Markers with a Multiplex Methylation-Specific Technology. **Clinical Chemistry**. vol. 58, no. 2. pp. 375–383. 2012. doi: 10.1373/clinchem.2011.171264.

83. Payne, S. R. From discovery to the clinic: the novel DNA methylation biomarker m SEPT9 for the detection of colorectal cancer in blood. **Epigenomics**. vol. 2, no. 4. pp. 575–585. Aug. 2010. doi: 10.2217/epi.10.35.
84. Xie, L. *et al.* Diagnostic Value of Methylated Septin9 for Colorectal Cancer Detection. **Frontiers in Oncology**. vol. 8. Jul. 2018. doi: 10.3389/fonc.2018.00247.
85. Dhaliwal, A., Vlachostergios, P. J., Oikonomou, K. G., and Moshenyat, Y. Fecal DNA testing for colorectal cancer screening: Molecular targets and perspectives. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**. vol. 7, no. 10. p. 178. 2015. doi: 10.4251/wjgo.v7.i10.178.
86. Tepus, M. and Yau, T. O. Non-Invasive Colorectal Cancer Screening: An Overview. **Gastrointestinal Tumors**. vol. 7, no. 3. pp. 62–73. 2020. doi: 10.1159/000507701.
87. Bach, S. *et al.* Circulating Tumor DNA Analysis: Clinical Implications for Colorectal Cancer Patients. A Systematic Review. **JNCI Cancer Spectrum**. vol. 3, no. 3. Sep. 2019. doi: 10.1093/jncics/pkz042.
88. Lam, K., Pan, K., Linnekamp, J. F., Medema, J. P., and Kandimalla, R. DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: A systematic review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**. vol. 1866, no. 1. pp. 106–120. Aug. 2016. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.07.001.
89. Herbst, A. *et al.* Methylation of NEUROG1 in Serum Is a Sensitive Marker for the Detection of Early Colorectal Cancer. **American Journal of Gastroenterology**. vol. 106, no. 6. pp. 1110–1118. Jun. 2011. doi: 10.1038/ajg.2011.6.
90. Zhang, G. *et al.* Combining Serum DNA Methylation Biomarkers and Protein Tumor Markers Improved Clinical Sensitivity for Early Detection of Colorectal Cancer. **International Journal of Genomics**. vol. 2021. pp. 1–11. Apr. 2021. doi:

10.1155/2021/6613987.

91. Li, W. *et al.* Predicting the risk for colorectal cancer with personal characteristics and fecal immunochemical test. **Medicine**. vol. 97, no. 18. p. e0529. May 2018. doi: 10.1097/MD.00000000000010529.