



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR



LUDIMILA DE ARAÚJO COSTA

EFEITO DO TABAGISMO NO PERFIL DE METILAÇÃO E HIDROXIMETILAÇÃO
GLOBAL DE DNA E NOS GENES *MIR-9-3* E *MIR-137* EM MUCOSA ORAL

João Pessoa – PB

2016

LUDIMILA DE ARAÚJO COSTA

**EFEITO DO TABAGISMO NO PERFIL DE METILAÇÃO E HIDROXIMETILAÇÃO
GLOBAL DE DNA E NOS GENES *MIR-9-3* E *MIR-137* EM MUCOSA ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

Orientadora: Prof^a Dr^a Naila Francis Paulo de Oliveira.

**João Pessoa - PB
2016**

C837e Costa, Ludimila de Araújo.

Efeito do tabagismo no perfil de metilação e hidroximetilação global de DNA e nos genes MIR-9-3 e MIR-137 em mucosa oral / Ludimila de Araújo Costa.- João Pessoa, 2016.

81f. : il.

Orientadora: Naila Francis Paulo de Oliveira
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)

LUDIMILA DE ARAÚJO COSTA

Dissertação de Mestrado avaliada em 18/03/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Naila Francis Paulo de Oliveira
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Orientadora

Prof^a Dr^a Patrícia Mirella da Silva Scardua
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna

Prof^a Dr^a Nathália de Alencar Cunha Tavares
Programa de Pós Graduação em Biologia aplicada à Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Examinadora Externa

Dr. Juscélio Donizeti Cardoso
Programa de Pós Graduação em Odontologia
Universidade Federal da Paraíba
Suplente Externo

Dr^a. Juliane Alves
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal da Paraíba
Suplente Interno

À minha mãe, pelo exemplo diário
de mulher e ser humano.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Por me permitir enxergar os Seus milagres também através das ciências; a minha mãe, Rosemary, pelo amor, suporte e força demonstrados a cada dia, sem exceção; aos meus amigos, pela vida partilhada e por sempre acreditarem tão profundamente na minha capacidade de seguir adiante; aos meus professores, especialmente os que fizeram parte desta pós-graduação, por fortalecerem o meu alicerce profissional, pela partilha pessoal e intelectual. Aos meus companheiros de pós-graduação, especialmente Sâmia Duarte, Thaís Honorato e Rodrigo Lacerda. Enfrentamos com muitas risadas todos os desafios que nos foram impostos. A equipe LAGEM formada por meus queridos parceiros de laboratório, Alanne Rayssa, Haline Barroso, Isabelle Borba, Mikaelly Batista, Laura Souto, Sabrina Rocha, Daniel Uchôa, Bruno Mariz e Dasaiev Dutra. Vivemos momentos maravilhosos! Dentro e fora do laboratório estivemos unidos. Muito obrigada pelo companheirismo e generosidade. Aos funcionários que compõem o Departamento de Biologia Molecular, pois vocês constituem a base de nossas conquistas! Sem vocês, muitos de nós não celebraríamos vitórias como essa. A minha professora orientadora, Naila Francis, que me abriu as portas do universo da pesquisa científica. Obrigada pelo respeito, por compartilhar seu conhecimento e experiência profissional, por ter acreditado e confiado em mim para a execução deste projeto.

*“Poucos são aqueles que vêem com seus próprios olhos
E sentem com seus próprios corações”.*

Albert Einstein

RESUMO

Epigenética é o estudo das mudanças herdadas e reversíveis no genoma funcional que não alteram a sequência de bases nucleotídicas. Modulam a expressão gênica principalmente por interferência de fatores externos, como o tabagismo. Os microRNAs constituem uma família de pequenos RNAs reguladores pós transcricionais da expressão gênica também controlados pela metilação do DNA. O objetivo deste estudo foi investigar a influência do fumo sobre o perfil de metilação e hidroximetilação global do DNA, e o perfil de metilação em sítios específicos dos genes *miR-9-3* e *miR-137* na mucosa bucal de indivíduos sem alterações clínicas visíveis. Para tanto, amostras de células bucais foram obtidas por bochecho de 95 indivíduos, os quais foram divididos em três grupos de acordo com o hábito de fumar: não fumantes (n=30), fumantes (n=29) e ex-fumantes (n=36). O DNA genômico foi extraído e a análise da metilação e hidroximetilação global foi realizada pelo teste ELISA e a metilação nos sítios específicos dos genes pela técnica de PCR específica para metilação. As análises estatísticas foram realizadas pelo software BioEstat 5.0 ao nível de significância de 5%. Os dados mostraram que indivíduos fumantes por um período superior a 15 anos apresentaram maior nível de metilação global que não fumantes e ex-fumantes. Não foram detectadas diferenças em relação ao nível de hidroximetilação global entre os grupos. O nível de metilação global apresentou-se maior quando comparado ao nível de hidroximetilação global, porém esses níveis não estão correlacionados na mucosa oral. Em relação aos sítios específicos, o gene *miR-137* apresentou-se parcialmente metilado em todos os grupos, e o *miR-9-3* mostrou uma tendência a hipometilação no grupo de indivíduos fumantes em comparação aos não fumantes e ex-fumantes. Não foram observadas diferenças nas marcas epigenéticas analisadas em relação a gênero e idade. Conclui-se que o hábito de fumar pode modificar o perfil de metilação global do DNA e no promotor do gene *miR-9-3*.

Palavras-chave: epigenética, metilação, hidroximetilação, fumo, microRNA, mucosa oral

ABSTRACT

Epigenetic is the study of inherited and reversible changes in functional genome that do not alter the sequence of nucleotide bases. Modulate gene expression mainly by interference of external factors, such as smoking. MicroRNAs are a family of small post transcriptional regulatory RNAs genes which expression can also be controlled by DNA methylation. The aim of this study was to investigate the influence of smoking on the methylation and hydroxymethylation status of global DNA and specific sites of *miR-9-3* and *miR-137* genes in the healthy oral mucosa. Samples of oral epithelial cells were collected using mouthwash from a population of 95 individuals who were divided into three groups according to smoking status: never (n=30), current (n=29) and former smokers (n=36). Genomic DNA was extracted, and global DNA methylation and hydroxymethylation was performed using an ELISA-based technique; DNA methylation at specific sites of *miR-9-3* and *miR-137* was performed using methylation-specific PCR. Higher levels of global DNA methylation were found in current smokers with over 15 years of consumption, but no differences were found in relation to global DNA hydroxymethylation. Global DNA methylation was higher than the hydroxymethylation level but they were not correlated in the oral mucosa. For specific sites, the *miR-137* promoter had partially methylated DNA in all groups and *miR-9-3* hypomethylation was detected in current smokers in comparison to never and former smokers. There were no differences in epigenetic marks analyzed in relation to gender and age. We concluded that smoking habits were capable of inducing changes in global DNA methylation and *miR-9-3* promoter methylation status.

Key words: epigenetic, methylation, hydroxymethylation, smoking, microRNA, oral mucosa.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR – região 3' não traduzida

5-hmC - 5-hidroximetilcitosina

5-mC - 5-metilcitosina

AID - Activation-Induced cytidine Deaminase

APOBEC - Apolipoprotein BmRNA-Editing Catalytic polypeptides

CH₃ - grupo metil

CpG - Citosina/ligação fosfodiéster/Guanina

DNA - ácido desoxiribonucleico

DNMT - DNAmetiltransferase

HIV - vírus da imunodeficiência humana

miR - microRNA

miR-9-3 - microRNA-9-3

miR-137 – microRNA-137

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - tampão fosfato salino

pre-miRNA - pré-microRNA

pri-miRNA - microRNA primário

RISC - RNAinduced silencing complex

RNA -ácido ribonucleico

RNA_m - RNA mensageiro

SAM - S-adenosilmetionina

TET - Ten Eleven Translocases

MDB – Methyl Binding Protein

MSP – PCR específica para metilação

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Processo de metilação da citosina.....	12
Figura 2 – Metilação do DNA e sua influência na expressão gênica.....	14
Figura 3 – Vias de desmetilação.....	15
Figura 4 – Biogênese dos microRNAs.....	17
Figura 5 – Frequência de metilação do DNA do gene <i>miRNA-9-3</i>	30
Figura 6 - Frequência de metilação do DNA do gene <i>miRNA-137</i>	31
Tabela 1 – Sequências dos primers dos genes <i>miR-9-3</i> e <i>miR-137</i>	26
Tabela 2 – Dados demográficos e comportamentais da população.....	27
Tabela 3 – Níveis de metilação e hidroximetilação global do DNA.....	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Epigenética.....	12
1.2	Metilação do DNA.....	12
1.3	Hidroximetilação do DNA.....	14
1.4	MicroRNAs.....	16
1.4.1	<i>miRNA-9-3</i> e <i>miRNA 137</i>	19
1.5	Tabagismo x Metilação do DNA.....	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Geral	22
2.2	Específicos	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Ética em pesquisa.....	23
3.2	População.....	23
3.3	Coleta das amostras e obtenção do DNA.....	23
3.4	Análise de metilação e hidroximetilação global do DNA.....	24
3.5	Análise de metilação do DNA no promotor dos genes <i>miR-9-3</i> e <i>miR 137</i>	25
3.6	Análise estatística.....	27
4	RESULTADOS	27
4.1	População.....	27
4.2	Metilação e hidroximetilação global do DNA.....	28
4.3	Metilação no promotor dos genes <i>miR-9-3</i> e <i>miR-137</i>	29
5.	DISCUSSÃO	31
5.1	Metilação e Hidroximetilação Global do DNA.....	32
5.2	Metilação no promotor dos genes <i>miR-9-3</i> e <i>miR-137</i>	35
5.3	Considerações finais.....	38
6.	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42
	Anexo I - Certificado comitê de ética em pesquisa.....	55
	Anexo II - Artigo submetido no periódico <i>Archives of Oral Biology</i>	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epigenética

A epigenética pode ser definida pelas mudanças hereditárias na expressão gênica que não acarretam em alteração na sequência de bases nucleotídicas (CHOUDHURI, 2011). O prefixo “epi” é derivado da preposição grega *ἐπι*, que significa “acima”, “sobre” ou “mais”. Este termo foi utilizado pela primeira vez em 1942 por C.H. Waddington para se referir a um fenômeno que a genética convencional daquela época não conseguia explicar (CHOUDHURI, 2011).

Os mecanismos epigenéticos envolvem modificações bioquímicas na molécula de DNA através do processo de metilação, alterações pós-transcripcionais nas histonas (SZYF, 2007), como a acetilação, a fosforilação e a própria metilação (BERGER et al., 2009), síntese de RNAs não codificantes, como os microRNAs, os pequenos RNAs de interferência e os longos RNAs não codificantes (BIDISHA & TOLLEFSBOL, 2014), os quais todos têm sido associados à algum tipo de interferência na expressão gênica e na estrutura da cromatina (KAN et al., 2015).

1.2 Metilação do DNA

A metilação do DNA, alvo de interesse deste estudo, é caracterizada por uma modificação covalente daquela macromolécula na qual um grupamento metil (-CH₃) é transferido de um carreador chamado S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5 de citosinas pela ação da família de enzimas que recebem o nome de DNAmetiltransferases (DNMT) (BIDISHA & TOLLEFSBOL, 2014) (Figura 1).

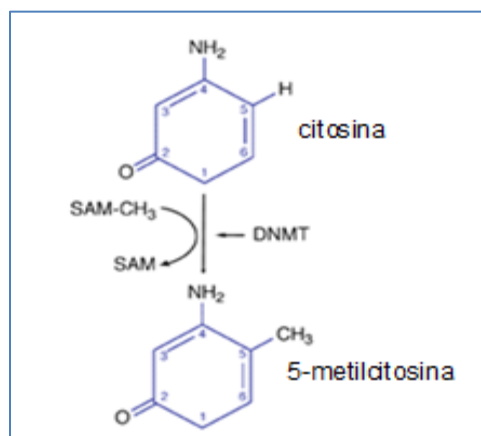


Figura 1 - Processo de metilação da citosina.
Fonte: STRATHDEE & BROWN, 2002
 (adaptado)

As DNAs metiltransferases dividem-se de acordo com a função que exercem em dois grupos: aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA, chamadas de metilases de manutenção, como a DNMT1, e o grupo responsável pela maior parte dos processos de metilação *de novo* (adição de radicais metil em sítios sem nenhum tipo de indicação de metilação, isto é, sem a presença de metilação prévia), como as DNMT2, DNMT3a e DNMT3b (BESTOR, 2000). A ação destas enzimas requer um substrato que atue como doador de radical metil e estes são obtidos pela alimentação através da ingestão de folato, metionina, colina e a vitamina B12, por exemplo (WATERLAND & JIRTLE, 2003; WATERLAND, 2006).

A adição do radical $-CH_3$ ocorre nos chamados dinucleotídeos CpG, isto é, em citosinas que precedem guaninas (BIDISHA & TOLLEFSBOL, 2014). Quando concentrados em grande número em uma mesma localidade este conjunto forma as denominadas ilhas CpG, regiões do DNA maiores que 200 pares de base contendo aproximadamente 50% de bases C e G, sendo que 60% formam os grupamentos CpG (LI & DAHIYA, 2002). Estes sítios estão geralmente localizados nas regiões promotoras dos genes (PORTELA, 2010), e demonstram importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma, sendo ela randômica ou sítio-específica (FEINBERG & TYCKO, 2004).

A metilação do DNA é um processo crucial para o desenvolvimento dos organismos, tanto que seu padrão é estabelecido durante a embriogênese e se mantém no percurso da vida adulta. Entretanto, alterações nestes padrões podem levar ao silenciamento gênico e o desencadeamento de inúmeros processos patológicos (BIDISHA & TOLLEFSBOL, 2014) (Figura 2). Padrões de hipermetilação aberrante em promotores de genes, por exemplo, parecem ser um dos principais mecanismos associados ao desligamento de genes, ocorrendo particularmente em genes supressores tumorais no câncer (FUKUSHIGE et al., 2009). Uma importante característica da epigenética é que os processos bioquímicos que a envolvem são diretamente influenciados pelo ambiente, e são mais frequentes que as mutações (USHIJIMA & ASADA, 2010). Dentre os fatores ambientais, podemos citar a radiação solar, uso de medicamentos, agrotóxicos, álcool e a fumaça do cigarro (SZYF, 2007).

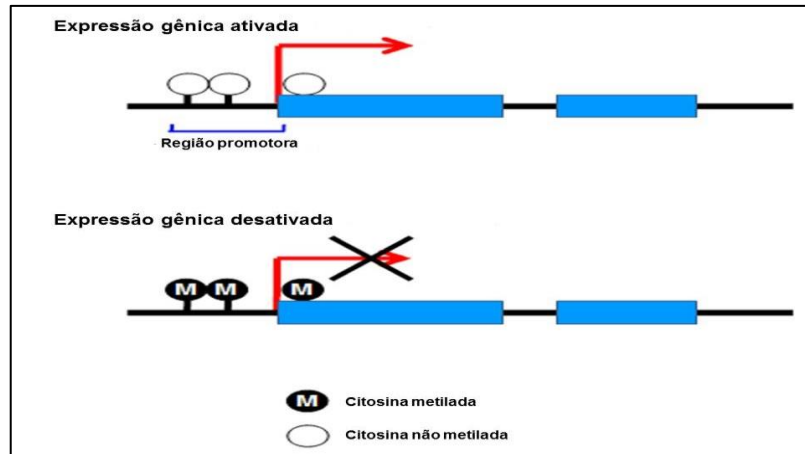


Figura 2 – Metilação do DNA e sua influência na expressão gênica.
Fonte: *National Cancer Center Research Institute, 2015 (adaptado).*

1.3 Hidroximetilação do DNA

Um novo padrão de regulação da expressão gênica associada à molécula de DNA reside em outra conformação da citosina além da 5-metilcitosina: a 5-hidroximetilcitosina, através da ação de enzimas que promovem a oxidação da 5-metilcitosina (KRIAUCIONIS & HEINTZ, 2009; TAHILIANI, 2009; DELATTE et al., 2014). A formação da 5-hidroximetilcitosina é mediada por uma família enzimática denominada TET (do inglês *ten-eleven translocases*). O processo inicial de hidroxilação da 5-metilcitosina tem sido considerado como um passo intermediário para a desmetilação do DNA, algo que permite alto grau de flexibilidade na regulação dos genes durante o desenvolvimento, a plasticidade cerebral, o *imprinting* genômico e alterações da transcrição por fatores ambientais (BHUTANI et al., 2011; AUCLAIR et al. 2012; WOJCIECHOWSKI et al., 2014).

A hidroximetilação do DNA, até então, tem sido amplamente caracterizada como necessária para a retirada do grupo metil da 5-metilcitosina, levando a citosina a assumir a sua configuração não-metilada, inicialmente pela oxidação da 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina (GLOBISCH et al., 2010; TAMMEN et al., 2014). A Família TET de proteínas, como mencionado anteriormente, respondem por este passo inicial por um mecanismo dependente de Ferro²⁺, alfa-cetoglutarato e oxigênio divalente. Estas mesmas enzimas, posteriormente, também catalisam a conversão da 5-hidroximetilcitosina em citosina não-modificada, isto é, não metilada, através dos intermediários 5-formilcitosina e 5-carboxilcitosina (TAHILIANI et al. 2009, TAMMEN et al., 2014). Esta família de desmetilases é composta por três variantes, TET1, TET2 e TET3, onde cada enzima parece ser expressa diferentemente entre os diferentes tipos de tecido (TAMMEN et al., 2014).

Outras famílias enzimáticas parecem estar envolvidas na desmetilação do DNA. Além das enzimas TET, a família AID/APOBEC (do inglês *Activation-Induced cytidine Deaminase* e *Apolipoprotein BmRNA-Editing Catalytic polypeptides*, respectivamente) responde por processos de desaminação da 5-metilcitosina ou 5-hidroximetilcitosina e as glicosilases de reparo de excisão de bases medeiam o reparo da molécula de DNA (BHUTANI et al., 2011). Curiosamente, DNA metiltransferases *de novo* (DNMT 3a/b) também podem ter a habilidade de converter 5-hidroximetilcitosina em 5-formilcitosina e 5-carboxilcitosina através dos mesmos processos de oxidação (CHEN et al., 2012, TAMMEN et al., 2014) (Figura 3).

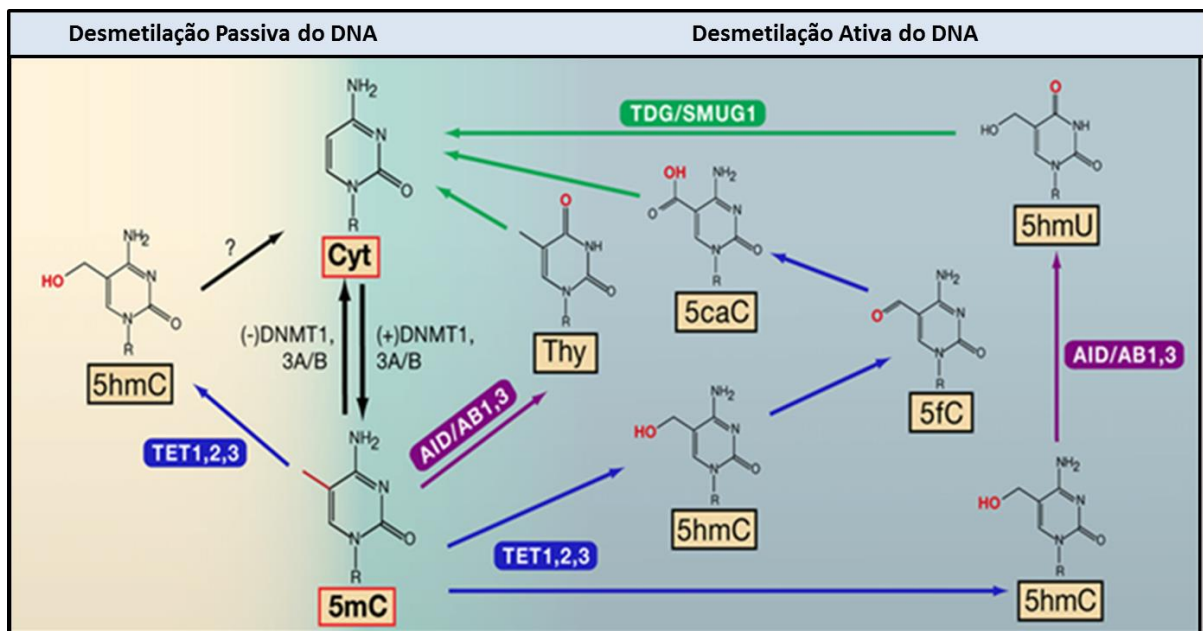


Figura 3 – Vias de desmetilação. As setas em preto indicam a desmetilação passiva do DNA por meio da diminuição/ausência das DNMTs 3A e 3B. As setas em azul mostram a atividades das enzimas TET as quais oxidam a 5-metilcitosina (5-mC) em 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) e, posteriormente leva a formação de 5-formilcitosina (5-fC) e 5-carboxilcitosina (5-caC) por etapas adicionais de oxidação. As setas em roxo indicam a ação das enzimas AID/APOBEC as quais desaminam a 5-mC ou a 5-hmC, formando 5-etiluracila (5-mU) ou 5-hidroximetiluracila (5-hmU). Por fim, as setas verdes mostram a atividade das enzimas glicosilases de reparo por excisão de bases (TDG/SMUG1) as quais induzem a substituição da citosina, culminando com a desmetilação do DNA. **Fonte:** BHUTANI et al., 2011 (adaptado).

A hidroximetilação do DNA é uma marca epigenética recentemente descoberta e relativamente desconhecida (XIONG et al., 2015). A hidroximetilação de sítios CpG através das enzimas TET aparenta contribuir para transcrição gênica através da geração de DNA desmetilado e, assim como a metilação do DNA, também contribui para a regulação da expressão dos genes (WU et al., 2011; SHEN et al., 2013;).

As pesquisas realizadas nos últimos anos tem mostrado que o processo de desmetilação do DNA é um mecanismo mais ativo e prevalente do que se supunha e está diretamente relacionado ao reparo daquela macromolécula (TAYLOR et al., 2014). A hidroximetilação do DNA aparenta ser mais estável e especialmente abundante em células embrionárias e em neurônios (BHUTANI et al., 2011). Mapeamentos feitos com o intuito de identificar um padrão para a distribuição da 5-hmC mostram que esta nova base não é aleatória e se espalha pelo genoma de maneira distinta quando comparada com a 5-mC (FICZ et al., 2011; WU et al., 2011; XIONG et al., 2015), indicando um possível papel fundamental na diferenciação celular e na regulação epigenética. Como exatamente funciona a 5-hmC ainda não se sabe. No entanto, especula-se que a conversão da 5-mC em 5-hmC reduz drasticamente a afinidade das proteínas MDB (proteínas de ligação ao radical metil) (VALINLUCK et al., 2004; LI & LIU, 2011).

Níveis de 5-hmC analisados em diferentes tecidos mostraram que sua maior concentração encontra-se no cérebro, rins e fígado (LI & LIU, 2011; JIN et al., 2011; WIELSHER et al., 2013). Interessantemente, a perda de 5-hmC tem sido observada em diferentes tipos de câncer como desordens hematológicas, câncer de cólon, próstata, mama, melanoma, pâncreas, fígado, pulmão, e cérebro (JIN et al., 2011; ORR et al., 2012; YANG et al., 2013; CHEN et al., 2013; JIN et al., 2013; TAYLOR et al., 2014), geralmente associada à diminuição da expressão das enzimas TET (SHIH et al., 2012; WIELSHER et al., 2013). Além disso, em outros casos, os níveis da 5-hmC parecem correlacionar-se com a fase da doença (LIU et al., 2013; YANG et al., 2013; KROEZE et al., 2015), fato este que tem sugerido que quaisquer alterações em seu estado podem promover a progressão desta patologia.

1.4 MicroRNAs

Mais recentemente, a comunidade científica tem voltado suas atenções para os RNAs não codificantes, em especial os microRNAs (miRNAs), por sua importância em processos como a indução, manutenção e diferenciação direta de células tronco embrionárias, a indução de células tronco pluripotentes (JIA et al., 2013) e se mostrarem promissores na terapia anticâncer, podendo ser utilizados também contra outras doenças (BIDISHA & TOLLEFSBOL, 2014). Além disso, a expressão alterada de miRNAs aparenta se manifestar no início da carcinogênese (HUDDER et al., 2008). Estima-se hoje que cerca de 10% dos

miRNAs sejam regulados epigeneticamente por meio da metilação do DNA (HAN et al., 2007).

Os microRNAs surgem a partir de um precursor com aproximadamente 70 nucleotídeos, o microRNA primário (pri-miRNA), transcrito a partir da ação da enzima RNA polimerase II. Para alcançar a sua forma madura, o pri-miRNA é processado por diversas proteínas em diferentes etapas. Após a transcrição inicial, as enzimas Drosha e Pasha (ou DGCR8), localizadas no núcleo celular, formam o pré-miRNA, estrutura formada por um trecho em fita dupla e uma pequena alça de fita simples a qual é exportada do núcleo via proteína Exportin-5 em direção ao citoplasma. No citoplasma, o complexo enzimático *RNA Dicer* realiza uma clivagem que origina o miRNA de fita dupla. Por fim, este se associa ao complexo de proteínas RISC (do inglês *RNAinduced silencing complex*), dando origem ao miRNA fita simples maduro (ANDREOLI et al., 2014) (Figura 4).

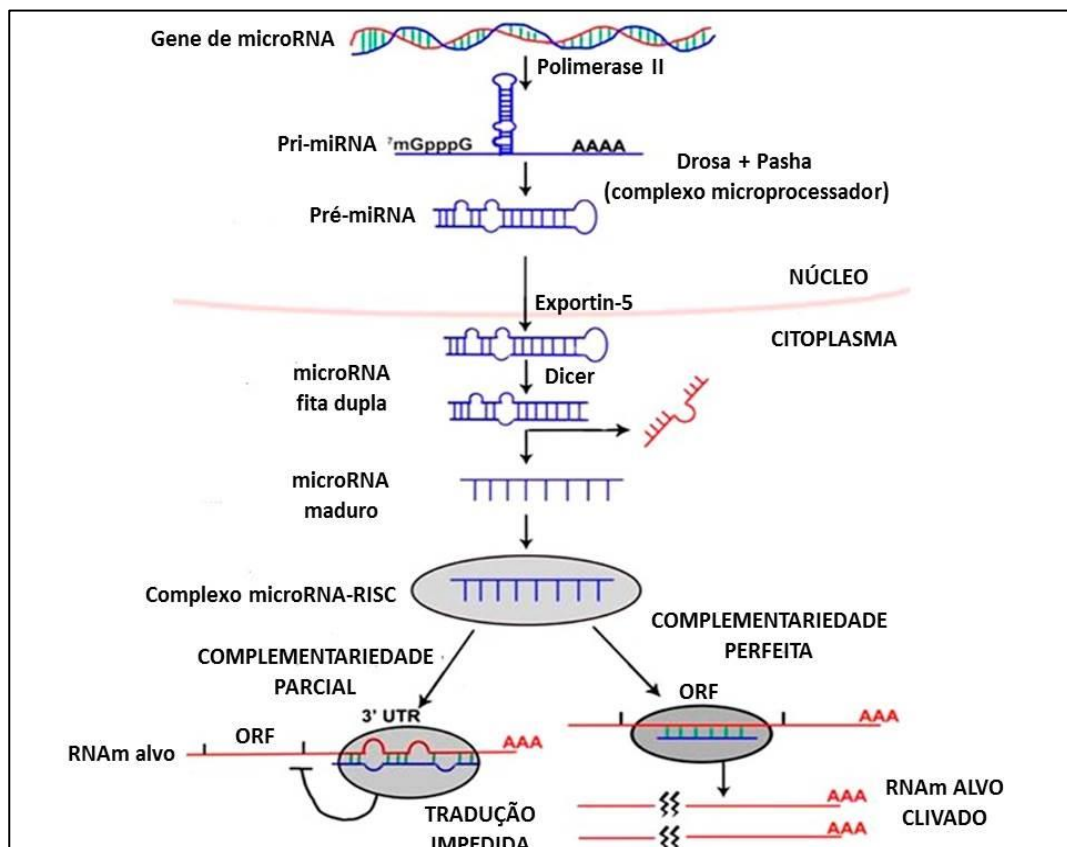


Figura 4- Biogênese dos microRNAs. **Fonte:** TONG & NEMUNAITIS, 2008 (adaptado).

Os miRNAs maduros, por sua vez, são pequenas moléculas de RNA formadas por aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento que podem controlar negativamente a expressão de um gene alvo após a sua tradução de duas formas até então conhecidas: por

complementariedade completa ou parcial. Na complementariedade completa o gene alvo é totalmente degradado, já na parcial, na maioria das vezes em regiões 3'UTR, tem-se a repressão do processo de tradução (BIDISHA & TOLLEFSBOL, 2014). Estima-se que, sejam capazes de controlar pós-transcricionalmente cerca de 50% dos genes humanos por meio da complementariedade parcial às sequências específicas dos RNAs mensageiros alvo (FREIDMAN et al., 2009).

A família que os compõem é bastante vasta. Até então, a literatura tem relatado um número aproximado de 2042 microRNAs maduros, apenas na espécie humana (CHEN et al., 2013; BIDISHA & TOLLEFSBOL, 2014). Estão envolvidos em diversas atividades biológicas, como na diferenciação celular, nos mecanismos de proliferação, apoptose e no ciclo celular (CHEN et al., 2013). Vários são os estudos que tem reportado a sua desregulação em diferentes tipos de câncer, principalmente nos mecanismos de iniciação e progressão de tumores (CALIN et al., 2006; VOLINIA et al., 2006), além de também estarem sendo relatados como moduladores de muitos aspectos referentes a resposta imune, tais como a diferenciação, a proliferação, a determinação do destino da célula e as vias de sinalização intracelular (BALTIMORE et al., 2008; O'CONNELL et al., 2012; HERBERTH et al., 2013) e em outros aspectos fisiológicos e patológicos do processo inflamatório (BALTIMORE et al., 2008; DAVIDSON-MONCADA et al., 2010; O'CONNELL et al., 2012; GAO et al., 2013).

O padrão de expressão dos microRNAs é altamente específico e varia de acordo com o tipo celular e seu estado de diferenciação. Alguns estudos mostram que eles podem estar tanto regulados para cima quanto para baixo, a depender do tipo de câncer, e até mesmo ambas as condições podem ocorrer para o mesmo tipo de câncer em diferentes estágios (CHEN et al., 2013). Estudos mostram que a expressão de diversos miRNAs pode ser modulada por aspectos mutagênicos ambientais, como a luz ultra violeta (POTHOF et al., 2009; IZZOTTI et al., 2011), poluentes do ar (POTHOF et al., 2009) e o fumo de cigarro em especial, sendo este fato já demonstrado em pesquisas realizadas com seres humanos (SCHEMBRI et al., 2009; SPIRA et al., 2004; SONKOLY et al., 2011; IZOTTI et al., 2011).

Considerando a carcinogênese, os miRNAs podem funcionar como oncogenes ou genes supressores tumorais (CHEN, 2005). Nestas categorias, temos como exemplo o *miRNA-9-3* e *miRNA-137*.

1.4.1. *miRNA-9-3* e *miRNA-137*

O gene *miRNA-9-3* pertence a família *miR-9*, está localizado no cromossomo 15, e dependendo do tipo de câncer ou tecido pode desempenhar tanto a função de oncogene quanto de supressor tumoral (TSAI et al., 2011; ZHANG et al., 2012; WANG et al., 2013). A metilação de sua região promotora tem sido associada à ocorrência de câncer de pulmão de células não pequenas (KITANO et al., 2011). Em sua forma madura, apresenta sequência idêntica ao *miRNA-9*, o qual tem sua super expressão relacionada a metástase em casos de câncer de mama e glioblastoma (NASS et al., 2009; MA, et al., 2010; SCHRAIVOGEL et al., 2011; WANG et al., 2013), retinoblastoma (VENKATESAN et al., 2014) e câncer oral (MINOR et al., 2012).

A hipermetilação do *miR-9-3* tem sido mostrada como um biomarcador específico para o câncer de cabeça e pescoço, particularmente relacionado ao carcinoma da cavidade oral e orofaríngea (MINOR et al., 2012). No mesmo ano, foi encontrado que o *miR-9-3* está metilado em pacientes portadores de câncer de pulmão de células não pequenas (HELLER et al., 2012). Além disso, a metilação do *miR-9-3* foi associada com a diminuição da sobrevivência livre de doença em pacientes com câncer de pulmão de células escamosas.

O gene *miRNA-137* está localizado no cromossomo 1 e parece desempenhar um importante papel na diferenciação celular e no controle do ciclo celular através da regulação negativa da expressão da ciclina dependente de quinase 6 (Cdk6) (KOZAKI et al., 2008; SILBER et al., 2008), agindo como um gene supressor tumoral. É detentor de uma vasta ilha CpG e estudos mostram que seu padrão de hipermetilação pode ser associado com diversos tipos de câncer, como o carcinoma oral de células escamosas (KOZAKI et al., 2008), câncer gástrico em linhagens celulares (ANDO et al., 2009) e câncer de cólon (BANDRES et al., 2009).

A metilação do gene *miR-137* tem sido apontada como um evento frequente em cânceres gastrointestinais e parece ocorrer no início e de forma gradual durante a carcinogênese gástrica, sendo inversamente correlacionada com a metilação global. Seu silenciamento deve-se a hipermetilação de seu promotor (STEPONAITIENE et al., 2015); outros estudos mostram ainda a associação da hipermetilação em casos de líquen plano bucal (DANG et al., 2013), câncer de bexiga (SHIMIZU et al., 2013), mama (VRNA et al., 2013), cólon (BANDRES et al., 2009) reto (PEREZ-CARBONEEL et al., 2014) e melanoma (BEMIS et al., 2008).

Os relatos existentes na literatura que abordam o tema epigenética ainda pouco investigam o impacto dos fatores externos sobre o epigenoma, que sabidamente interferem nos padrões de metilação do DNA, como o hábito de fumar, e que muitas vezes são os primeiros a iniciar as

alterações que podem desencadear o início de diversos processos patológicos. Como exemplos desses estudos, temos a associação dos padrões de metilação e o fumo em casos de câncer de pulmão (VAISSIERE et al., 2009; KIKUCHI et al., 2006), próstata (ENOKIDA et al., 2006) e bexiga (MARSIT et al., 2006).

1.5 Tabagismo x Metilação do DNA

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável e um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. A fumaça do cigarro é uma mistura química complexa a qual contém mais de 400 diferentes compostos, sendo que em torno de 69 deles são muito estudados e altamente associados ao câncer (FOWLES & DYBING, 2003).

Estudos revelam que o uso do cigarro pode levar à formação de adutos de DNA, micronúcleos, quebras da dupla hélice de DNA e aberrações cromossômicas. Estudos com recém-nascidos também revelaram mutações gênicas nos bebês expostos à fumaça do cigarro produzida pela mãe. Além disso, em espermatozoides de fumantes foram observados uma alta frequência de aneuploidias, quebras na molécula de DNA, danos oxidativos e adutos de DNA. O efeito genotóxico do cigarro foi encontrado em diversos órgãos e tecidos como: bucal/nasal, esôfago, laringe e faringe, pulmão, pâncreas, órgãos mielóides, bexiga/uretra e cervix uterino (DEMARINI, 2004).

Mais recentemente, o impacto do fumo no epigenoma também tem sido investigado. Estudos revelam a ocorrência de hipermetilação em genes supressores tumorais, tais como *p16*, genes relacionados ao ciclo celular, como: *DAPK*; genes envolvidos na apoptose, como o *Bcl2*, e ainda outros genes, envolvidos nas mais diversas vias do metabolismo celular: *RARβ* - receptor de ácido retinóico; *FHIT* - enzima relacionada ao metabolismo de histidina; *CYP1A1* - enzima do citocromo *P450*; *PTGS2* - enzima envolvida na biossíntese de prostaglandina; *EDNRB* - subunidade da proteína G; *SOCS1* - supressor de citocina, entre outros (LIN et al., 2007; SHARMA et al., 2010). Alguns dos estudos acima citados revelaram alterações epigenéticas em células tumorais da cavidade oral, faringe, laringe e do pulmão, e outros mostraram alterações mesmo em órgãos não diretamente expostos a fumaça do cigarro, tais como: o pâncreas, a bexiga, o útero e o intestino, sugerindo que o cigarro tem um efeito generalizado, provavelmente alterando de alguma forma todo o sistema do indivíduo.

Em adição, outros estudos relatam alterações epigenéticas em tecidos/órgãos saudáveis de fumantes, como pulmão, sangue e escarro (BELINSKY et al., 2002; CHRISTENSEN et

al., 2009). Já foi sugerido que o padrão de metilação do epitélio oral poderia ser um importante marcador para prever a situação dos pulmões, já que ambos sofrem ação de substâncias carcinogênicas do cigarro (BHUTANI et al., 2008).

Um estudo investigou 27578 sítios CpG em 14475 genes e identificou alteração epigenética associada ao hábito de fumar em um novo *locus*, o *GPR15* e sugeriu que as alterações no padrão de metilação de DNA em resposta ao uso do cigarro são dinâmicas, sítio-específicas e permanecem após a cessação do hábito de fumar (WAN et al., 2012). Outro estudo analisou 25000 *loci* em macrófagos alveolares e revelou que para os genes relacionados ao sistema imune e processo inflamatório houve diferenças nos níveis de transcritos de RNA em comparação aos indivíduos não fumantes, e em adição, o padrão de metilação dos genes citados estavam alterados e consistentes com o padrão de expressão. Dentre os genes estudados, o que apresentou diferença mais proeminente foi o *FLT1* (PHILIBERT et al., 2012).

Contudo, a influência do fumo sobre o perfil epigenético de células bucais, as quais são as primeiras a sofrerem com a fumaça do cigarro são escassos. Diante disso, nosso grupo de pesquisas recentemente mostrou o perfil de metilação em genes relacionados ao câncer em amostras de epitélio oral de indivíduos fumantes e ex-fumantes e encontramos hipermetilação nos genes *MLH1* (que codifica um dos principais componentes da via de reparo do DNA, contribuindo para a estabilidade genômica) e *hTERT* (responsável por codificar a subunidade catalítica da telomerase, mantendo o comprimento dos telômeros) em indivíduos fumantes e, em adição, mostramos que o perfil de ex-fumantes era semelhante aos indivíduos não fumantes, mostrando que a cessação do hábito pode reverter o perfil de metilação (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Vale ressaltar que nada se sabe sobre a influência do tabagismo sobre o perfil de hidroximetilação global de DNA e metilação em sítios específicos em nenhum gene da família de microRNAs em células bucais de indivíduos saudáveis. Baseado nesses fatos, no presente estudo focamos em estudar essas modificações do DNA em indivíduos fumantes e ex-fumantes sem alterações clínicas visíveis na mucosa oral na tentativa de encontrar alterações epigenéticas que poderiam ser utilizadas como marcadores de alterações bucais relacionadas ao tabagismo.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar a influência do hábito de fumar sobre o perfil epigenético de células da mucosa oral de indivíduos sem alterações clínicas visíveis.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar se o hábito de fumar tem influência sobre o perfil de metilação e hidroximetilação global de DNA;
- Investigar se o hábito de fumar tem influência sobre o perfil de metilação em sítios específicos nos genes *miR-9-3* e *miR-137*;
- Investigar se fatores intrínsecos, como idade e gênero tem influência sobre o perfil de metilação e hidroximetilação global do DNA e em sítios específicos dos genes *miR-9-3* e *miR-137*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ética em pesquisa

Os procedimentos que envolveram a realização deste estudo respeitaram todas as diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos, aprovadas pela Resolução número 466, de 13 de junho de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, além de ter sido devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (protocolo número 0136/12) (ANEXO 01).

3.2 População

A amostra foi composta por 95 voluntários brasileiros, saudáveis, de ambos os sexos, com faixa etária a partir de 30 anos, os quais foram selecionados na Clínica Integrada de Odontologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba. Todos os indivíduos foram propriamente informados a respeito da natureza da pesquisa, assinando um termo escrito de livre consentimento para sua participação.

A população foi dividida em três grupos de acordo com o hábito de fumar: Grupo Controle, n=30 (indivíduos que nunca fumaram), Grupo Fumante, n=29 (indivíduos que fumam há pelo menos 05 anos, 05 cigarros por dia) e Grupo Ex-Fumante, n=36 (indivíduos que fumaram há pelo menos 05 anos, 05 cigarros por dia e que pararam há pelo menos 05 anos). Foram excluídos os indivíduos com histórico médico de doença autoimune, infecção por HIV e/ou câncer, assim como indivíduos que apresentavam sinais visíveis de qualquer alteração no local avaliado.

3.3 Coleta das amostras e obtenção do DNA

Células epiteliais da mucosa bucal foram obtidas a partir de um bochecho vigoroso com uma solução de 10 mL de dextrose (3%, autoclavada por 1 minuto). A seguir, em laboratório, as amostras obtidas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e lavadas com 5 mL de tampão fosfato salino (PBS) (LINE & TREVILATTO, 2000 com modificações). Posteriormente, o DNA genômico foi purificado utilizando acetato de amônio (8M) segundo o protocolo de AIDAR & LINE (2007). Ao final, a quantidade de DNA extraído e sua pureza foram mensuradas em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific)

utilizando a razão OD 260/280. Foram considerados puros DNAs que apresentavam a razão entre as duas leituras acima de 1,8. As amostras foram congeladas a -20°C até as análises de metilação do DNA.

3.4 Análise de metilação e hidroximetilação global do DNA

A quantificação dos níveis de metilação e hidroximetilação global de DNA dos grupos não fumantes, fumantes e ex-fumantes foi realizada através do teste de Elisa indireto (DE ARRUDA et al., 2013). O teste ELISA permite a detecção colorimétrica da quantidade relativa de metilação e hidroximetilação do DNA em relação ao DNA controle positivo (100% metilado ou 100% hidroximetilado) (5-Methylcytosine & 5-Hydroxymethylcytosine DNA Standard Set, Zymo Research). As soluções de Coating, Blocking, Wash e Stop, bem como o anticorpo secundário foram providas pelo kit Protein Detector Kit™ ELISA (KPL Inc.).

Foram utilizadas microplacas de 96 poços de poliestireno, e, em cada poço foi adicionado 100 μL (50ng) de DNA extraído de células da mucosa bucal dos voluntários e diluído em Coating Solution. Em seguida, a microplaca foi incubada em estufa à temperatura de 37°C por 1 hora. Após esse período, os poços foram lavados três vezes com solução de lavagem (Wash Solution) e, logo após, foram adicionados 200 μL de uma solução bloqueadora BSA (Diluent/Blocking Solution) por 10 minutos. O procedimento de lavagem foi repetido por mais três vezes. A seguir, foram adicionados separadamente 50 μL de anticorpo de captura 5-metilcitosina ou 5-hidroximetilcitosina (5-mC; diluição 1:125; Merck Millipore; 5-hmC; diluição 1:2000; Epigentek) em cada poço e a microplaca foi incubada em estufa à temperatura de 37°C por mais 1 hora. Após o período estipulado, o procedimento de lavagem, como descrito acima, foi repetido por mais três vezes. A seguir foi adicionado 50 μL de anticorpo secundário conjugado com peroxidase, seguido de nova incubação por mais 1 hora à temperatura ambiente. Foi realizado um novo procedimento de lavagem e posterior adição de 100 μL de solução reveladora, a qual reage com a peroxidase e em caso positivo desenvolve uma coloração, em cada poço. Após o desenvolvimento da cor, 100 μL de solução de parada (Stop Solution) foi adicionada.

A absorbância da solução contida nos poços foi mesurada com a utilização do leitor de microplacas Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) no comprimento de onda de 405 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicata. A

análise de espectrofotometria seguiu a metodologia do ponto único: média das duplicatas das amostras foi subtraída do valor relativo à média dos valores do branco e os valores foram comparados em relação à média do DNA controle positivo subtraindo-se mais uma vez o valor relativo à média dos valores do branco, o mesmo valor citado anteriormente, seguindo a fórmula a seguir:

$$A = \frac{[(\text{Média da absorbância da amostra} - \text{Média do branco})]}{[(\text{Média do DNA controle positivo} - \text{Média do branco})]} \times 100$$

3.5 Análise da metilação do DNA no promotor dos genes *miR-9-3* e *miR-137*

A análise de metilação do DNA em sítios específicos nos genes *miR-9-3* e *miR-137* foi realizada utilizando a técnica de PCR específica para Metilação (MSP – do inglês *Methylation Specific PCR*). Para tanto, o DNA genômico (800 ng) foi submetido à modificação com bissulfito de sódio a partir do Kit CpGenome™ Turbo Bisulfite Modification (Merck Millipore), de acordo com as especificações do fabricante. A transformação do DNA com bissulfito de sódio consiste na substituição das citosinas não metiladas pela base nitrogenada uracila e na permanência das citosinas quando estas estão ligadas a radicais metil (CARR et al., 2007). Desse modo, é possível distinguir as citosinas metiladas das não metiladas após o processo de amplificação do DNA. Isto explica o fato de serem usados dois pares de iniciadores para cada gene. Os sítios CpG estudados estão localizados na região promotora dos genes *miR-9-3* e *miR-137*, como previamente descrito (DANG et al., 2013; WANG et al., 2013).

Para o gene *miR-9-3*, após a modificação com bissulfito, o fragmento foi amplificado com iniciadores específicos para as condições metilada e não metilada (Tabela 1), ambas com 116 pb. Cada reação de MSP contou com 100 ng de DNA modificado com bissulfito, 1 µl (10 µM) de cada iniciador e Go Taq Start Green Master Mix 1x (Promega Corporations, Madison, WI, USA), totalizando 25 µL de volume final de reação. As condições para amplificação dos fragmentos foram: 95 °C x 5 minutos; 45 ciclos (95 °C x 1 min, 58 °C - condição metilada- / 55 °C - condição não metilada- x 1 min, 72 °C x 7 min e 72 °C x 5 min) (WANG et al., 2013).

Para o gene *miR-137*, o mesmo procedimento foi realizado, produzindo contudo fragmento com 86 pb. Cada reação de MSP contou com 100 ng de DNA modificado com

bissulfito, 1 µl (10 µM) de cada iniciador e Go Taq Hot Start Green Master Mix 1x (Promega Corporations, Madison, WI, USA), totalizando 25 µL de volume final de reação. As condições para a amplificação dos fragmentos foram: 95°C x 5 minutos; 40 ciclos (95 °C x 1 min, 58 °C - condição metilada- / 51 °C -condição não metilada-, x 1 min, 72 °C x 1 min e 72 °C x 5 min.) (DANG et al., 2013).

Gene	Primer M	Primer U
<i>mir-9-3</i>	F: 5'-attggctgatttttgattgac-3'	F: 5'-ttaggtatgtgaaataggtagatgt-3'
	R: 5'-cgcttaaaaaacctcgaacg-3'	R: 5'-aaaacacttaaaaaacctcaaaca-3'
<i>mir 137</i>	F: 5'-gcggtagtagtagcggtagc-3'	F: 5'-ggtgtagtagtagtgtagt-3'
	R: 5'-accgtcaccgaaaaaaa-3'	R: 5'-taccatcaccaaaaaaaa-3'

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados para amplificação dos genes *miR-9-3* (WANG et al., 2013) e *miR-137* (DANG et al., 2013).

DNA metilado (Methylated Control DNA, Sigma Aldrich) e não metilado (CpGenome Universal Unmethylated DNA, Merck Millipore) foram modificados utilizando a técnica supracitada e amplificados com os iniciadores específicos para cada gene como controle das reações para as condições metilada e não metilada, respectivamente.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e após a MSP, as amostras (7 µL) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, seguido de coloração por nitrato de prata.

A partir dos resultados do gel de eletroforese, teríamos três possibilidades de resultado:

- Condição metilada: a banda visualizada no gel de eletroforese corresponde a amplificação dos fragmentos com citosinas associadas ao radical metil;
- Condição não metilada: a banda visualizada no gel de eletroforese corresponde a amplificação dos fragmentos com uracilas;
- Condição parcialmente metilada: resultado positivo tanto para a condição metilada quanto para a condição não metilada:
 - Possivelmente a metilação do DNA na ilha CpG em questão não ocorre em todas as células/alelos.

3.6 Análise Estatística

Diferenças entre o perfil de metilação e hidroximetilação global entre os grupos foram avaliadas pelo Teste ANOVA One Way. Diferenças entre o perfil de metilação e hidroximetilação global na mucosa oral foram avaliadas pelo Teste Mann-Whitney e para a análise de correlação entre estas condições foi utilizado a Teste de correlação de Spearman. O Teste T foi utilizado para avaliar a influência da idade, do gênero, do tempo de consumo de cigarros e a quantidade de cigarros sobre o perfil de metilação e hidroximetilação global do DNA.

Para avaliar diferenças no perfil de metilação em sítios específicos entre os grupos foi utilizado o Teste Qui-quadrado (χ^2), assim como para avaliar a influência da idade, do gênero, do tempo de consumo de cigarros e a quantidade de cigarros. Os resultados obtidos nestas análises foram dados em porcentagem pelo método matemático de regra de três simples: o número total de indivíduos de cada categoria investigada equivaleria aos 100% em comparação com a quantidade de indivíduos que apresentariam a condição metilada e/ou não metilada. Todas as análises foram realizadas com software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007) ao nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 População

A tabela abaixo apresenta os dados demográficos e comportamentais da população estudada.

Dados	Não fumantes	Fumantes	Ex-fumantes
demográficos/comportamentais	(n = 30)	(n = 29)	(n = 36)
Idade (anos)*	44,15 ± 10	47,4 ± 10,6	55,3 ± 11
Homens (%) **	30	72,4	66,7
Mulheres (%)	70	27,6	33,3
Consumo de cigarros por dia	-----	18,8 ± 10,9	23,5 ± 15,5
Consumo de cigarro (em anos)	-----	24,3 ± 13,2	20 ± 12,2
Anos sem fumar	-----	-----	15,3 ± 8,7

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão para os dados demográficos e comportamentais da população estudada. *p<0,01; ANOVA, **p<0,05; χ^2 .

4.2 Metilação e Hidroximetilação Global do DNA

A tabela 2 mostra os dados de metilação (5-mC) e hidroximetilação (5-hmC) global do DNA da população estudada.

Não foram encontradas diferenças nos níveis de 5-mC entre indivíduos fumantes ($32,2 \pm 14,0$), não fumantes ($27,3 \pm 12,0$) e ex-fumantes ($26,2 \pm 11,0$). Entretanto, diferenças nos níveis de 5-mC foram encontradas em relação ao período de consumo de cigarros. Ao avaliar o grupo de indivíduos fumantes, observamos que os indivíduos que fumavam por mais de 15 anos apresentaram maior nível de metilação global ($37,9 \pm 11,0$) em comparação aos indivíduos que fumavam por menos de 15 anos ($25,9 \pm 14,0$) ($p=0,04$; Teste T). Contudo, nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao número de cigarros fumados por dia.

Para a hidroximetilação global, também não foram encontradas diferenças entre os grupos (fumantes: $14,1 \pm 3,0$; ex-fumantes: $14 \pm 3,0$; não-fumantes: $13 \pm 4,0$), nem mesmo em relação ao tempo de consumo de cigarros ou o número de cigarros consumidos por dia.

Os níveis de metilação e hidroximetilação global do DNA foram comparados e foi observado que o nível de 5-mC é maior em relação a 5-hmC na mucosa oral ($p < 0,001$; Mann-Whitney), entretanto esses níveis não estão correlacionados ($p > 0,05$; Teste de Correlação de Serman).

Analisando somente aspectos intrínsecos, como idade e gênero, também não foram encontradas diferenças em relação aos níveis de 5-mC e 5-hmC entre homens e mulheres e nem entre os indivíduos com idade até 40 anos ou mais de 40 anos, como mostra a Tabela 2.

Grupos							
Modificação global do DNA (%)	Não fumantes	Fumantes	Ex-fumantes	Tempo de fumo (em anos)		Quantidade de cigarros consumidos	
				≤ 15	>15	≤15	>15
Metilação	27,3 (±12) } #	32,2 (±14) } #	26,2 (±11) } #	25,9 (±14)	37,9* (±11)	32,3 (±11)	25,5 (±11)
Hidroximetilação	13 (±4)	14,1 (±3)	14 (±3)	15,1 (±3)	13,4 (±3)	15,5 (±3)	14,3 (±3)
Independente do hábito de fumar							
Gênero				Idade			
	Homens	Mulheres	≤ 40	> 40			
Metilação	28,1 (±12)	28,4 (±13)	29,9 (±14)	28 (±12)			
Hidroximetilação	13,5 (±3)	13,9 (±3)	13,5 (±3)	13,7 (±3)			

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão de um experimento realizado em duplicata para os níveis de metilação e hidroximetilação global do DNA para a população estudada. *p=0,04; test T, # p<0,001; Mann-Whitney.

4.3 Metilação no promotor dos genes *miR-9-3* e *miR-137*

Para o gene *miR-9-3*, diferenças significativas foram detectadas entre os grupos, sendo a condição não metilada a mais frequente em indivíduos fumantes (50%) em comparação aos indivíduos não fumantes (25%) e ex-fumantes (4,2%) ($p < 0,001$; χ^2) (Figura 5).

Para o gene *miR-137*, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, sendo a condição parcialmente metilada a mais frequente em indivíduos fumantes (77%), não fumantes (82%) e ex-fumantes (80%) ($p > 0,05$; χ^2) (Figura 6).

Não observamos diferenças em relação ao tempo de consumo de cigarros nem em relação ao número de cigarros consumidos por dia ($p > 0,05$; χ^2), assim como quando analisamos os aspectos intrínsecos e independentes do hábito de fumar, como gênero e idade (≤ 40 anos e > 40 anos) para ambos os genes ($p > 0,05$; χ^2).

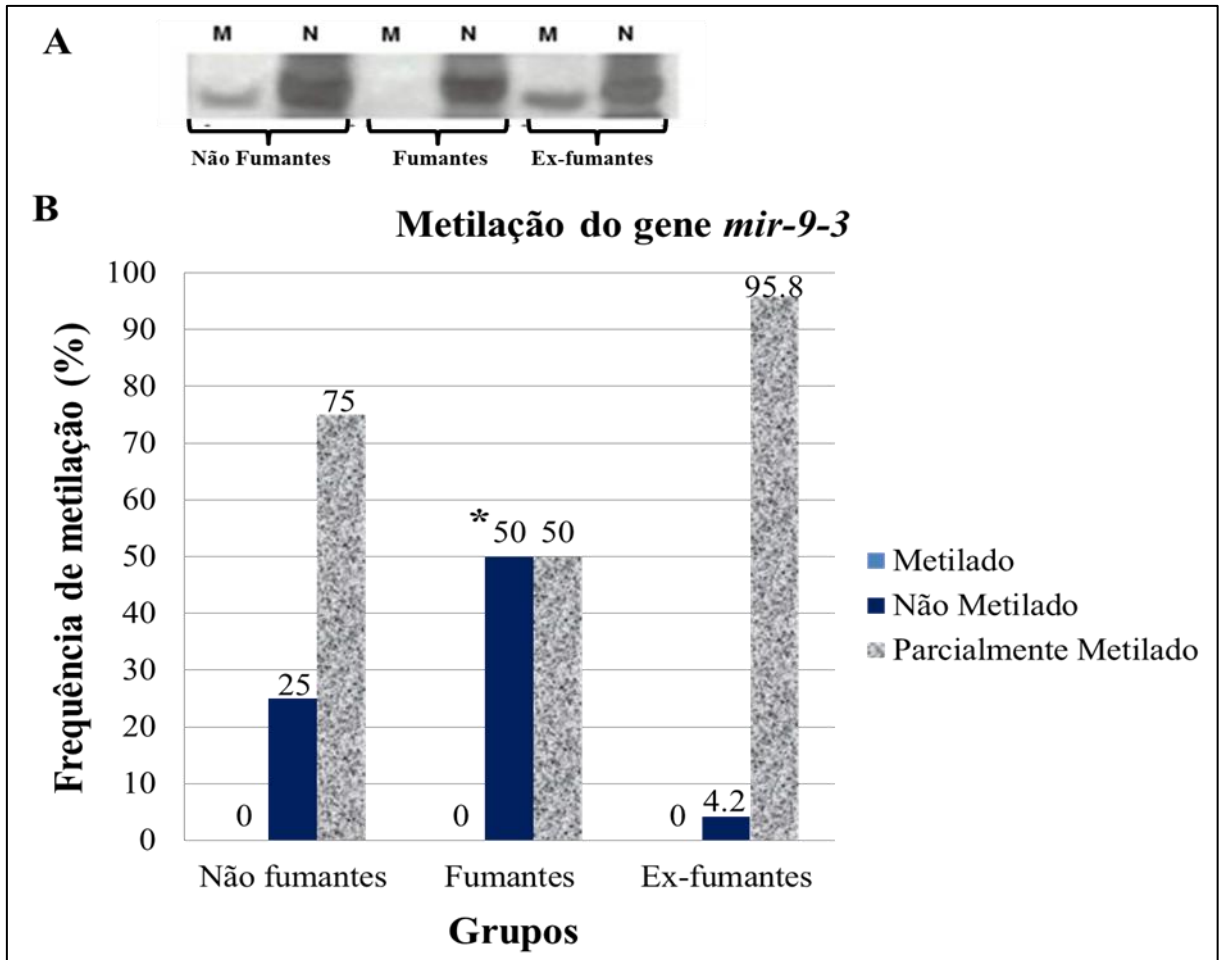


Figura 5 – Frequência de metilação do DNA do gene *miRNA-9-3*. (A) Amostras representativas dos três grupos estudados após MSP (116 pb). M – metilado; N – não metilado. (B) Frequência de metilação dos indivíduos fumantes, não fumantes e ex - fumantes (* $p < 0,001$; χ^2). Não fumantes $n = 24$, fumantes $n = 26$ ex-fumantes $n = 25$.

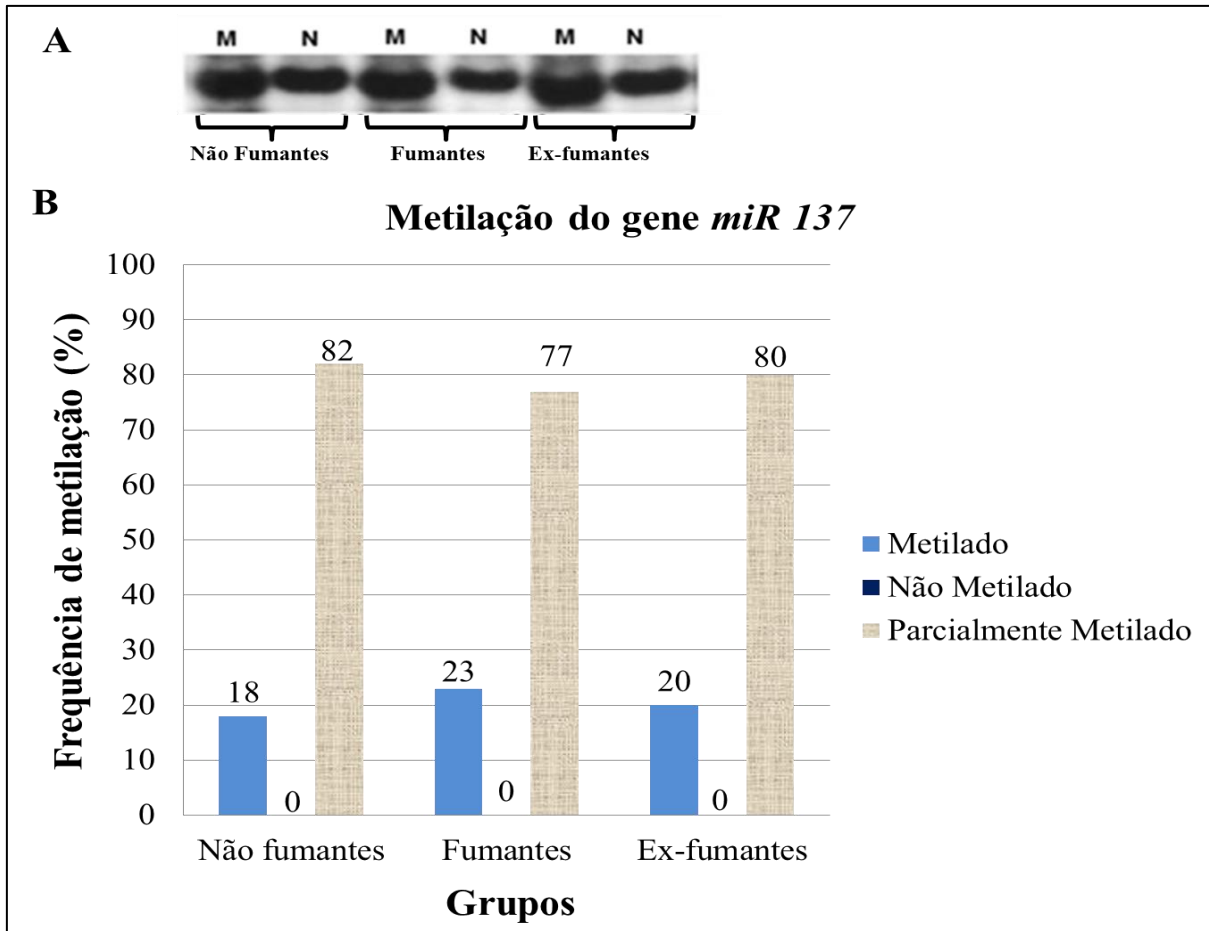


Figura 6 – Frequência de metilação do DNA do gene *miR-137*. (A) Amostras representativas dos três grupos estudados após MSP (86 pb). M – metilado; N – não metilado. (B) Frequência de metilação dos indivíduos fumantes, não fumantes e ex-fumantes ($p > 0,05$; χ^2). Não fumantes $n=26$, fumantes $n=22$, ex-fumantes $n=25$.

5. DISCUSSÃO

Estima-se que existam aproximadamente 1,3 bilhões de fumantes no mundo, hábito este que leva a cerca de 5 milhões de mortes ao ano (OMS, 2014). Sabe-se que o tabagismo é um fator de risco significativo para o desencadeamento de diversas patologias por promover a indução de uma série de mudanças genéticas e moleculares, principalmente no trato respiratório, como a atopia celular e a perda de heterozigosidade, e epigenéticas, como a hipermetilação de promotores (SCHEMBRI et al., 2009) e a desregulação de miRNAs (IZZOTI et al., 2011).

Padrões epigenéticos anormais têm sido associados à etiologia de diversas doenças, como o câncer, síndromes pediátricas, desordens genéticas, doenças autoimunes, doenças reumáticas, doenças inflamatórias e até mesmo ao processo molecular que induz ao

envelhecimento. É importante ressaltar que o meio ambiente pode potencializar os impactos sobre esses perfis em qualquer período da vida (NEIDHART, 2015).

O consumo de cigarro tem sido associado a mudanças no perfil de metilação do DNA de diversos genes e tecidos (TALIKKA et al., 2012). Surpreendentemente, poucos estudos epigenéticos têm sido realizados com células da mucosa oral, as quais são as primeiras a sofrer danos a partir das toxinas do cigarro. Nosso grupo de pesquisa recentemente publicou um estudo demonstrando mudanças no perfil de metilação do DNA de genes relacionados ao câncer na mucosa oral (DE OLIVEIRA et al., 2015). As células expostas podem tornar-se malignas e desencadear o câncer de células escamosas. A malignidade detectada precocemente, entretanto, resulta em menos sofrimento e um menor risco a saúde do paciente, assim como em menores custos relacionados à sua saúde.

5.1 Metilação e Hidroximetilação Global do DNA

Mais acentuadamente nos últimos anos, as análises globais dos padrões epigenéticos estão sendo averiguadas no sentido de caracterizar de modo randômico como se comporta o epigenoma mediante, principalmente, a instalação de processos patológicos (ASMAR et al., 2015). Hipometilação global e a hipermetilação sítio específica são frequentemente associadas ao câncer (GOMES et al., 2012).

No presente estudo, um maior nível de metilação global foi encontrado nos indivíduos fumantes consumidores de cigarro por um período superior a 15 anos, mas não em relação ao número de cigarros consumidos. Em relação à idade e gênero, nenhuma diferença foi detectada. Uma pesquisa anterior demonstrou que idade e gênero não influenciam nos níveis de metilação global do DNA de células da mucosa bucal (DE ARRUDA et al., 2013). Godderis et al. (2015) ao analisar sangue e saliva de voluntários saudáveis também não observaram diferenças nos níveis de metilação global entre homens e mulheres. Teschendorff et al. (2015) demonstraram, em nível de escala genômica, um “índice do fumo”, onde 1501 sítios CpG foram detectados na mucosa oral e associados ao fumo (912 hipermetilados). Além disso, os sítios foram correlacionados com mudanças na metilação do DNA no câncer epitelial. Wan e colaboradores (2015) mostraram sete sítios CpG associados ao tabagismo, e correlações entre a exposição cumulativa a fumaça e o tempo desde a cessação do uso do cigarro foram observados em um subconjunto de sítios CpG significativamente associados.

No tecido sanguíneo os dados sobre a influência do fumo são controversos. Hillemacher e colaboradores (2008) analisaram 278 amostras genômicas de leucócitos e não detectaram diferenças entre os perfis de metilação global entre fumantes e não fumantes, enquanto que, Teschendorff e colaboradores (2015) encontraram diferenças. Esse último estudo, revelou ainda que, as alterações são mais proeminentes em células bucais em comparação com as células sanguíneas. Outro estudo recente também revelou que o hábito de fumar associado ao abuso do álcool, está associado a maiores níveis de metilação global do DNA (SEMMLER et al., 2015).

Um estudo desenvolvido por Piyathilake e colaboradores (2001) avaliou amostras de fumantes que desenvolveram carcinoma espinocelular de pulmão e de fumantes que não desenvolveram a doença. A equipe observou por imunohistoquímica, uma redução na metilação global do DNA nos fumantes portadores do carcinoma supracitado em comparação aos fumantes portadores apenas de hiperplasia epitelial. A redução da metilação global também foi associada ao tamanho do tumor e ao estágio da doença, sugerindo uma ligação com a progressão da patologia. Os resultados do estudo também indicaram que a metilação normal do DNA nas lesões hiperplásicas epiteliais poderia impedir a transformação das mesmas, isto é, os pesquisadores puderam concluir que o estado de metilação do DNA em lesões precoces, tais como a hiperplasia epitelial, poderia ser utilizado para identificar fumantes em risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer de pulmão.

Towle e colaboradores (2013) com o intuito de investigar os eventos epigenéticos envolvidos no câncer oral realizou um estudo a partir de biópsias de tecido normal, displasia, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo de células escamosas provenientes do mesmo paciente. A hipermetilação global foi observada como prevalente nos fragmentos de tecidos normais e nas displasias, enquanto que a porcentagem de hipometilação global foi mais característica dos carcinomas, apesar da frequência de hipermetilação também ter sido significativa.

Em relação à hidroximetilação, este é o primeiro estudo a reportar os níveis de hidroximetilação global do DNA de células orais expostas ao cigarro, e nenhuma diferença foi encontrada entre fumantes e não fumantes. Pesquisas centradas na influência dos fatores ambientais no perfil de hidroximetilação do DNA ainda permanecem inexploradas, porém um estudo recente mostrou que a exposição ao arsênio está associada a alterações destes níveis em células sanguíneas (TELLEZ-PLAZA et al., 2014).

No presente estudo, observamos que os níveis de 5-mC são maiores que os níveis de 5-hmC, assim como prévio estudo também realizado com células bucais (GODDERIS et al., 2015). A literatura científica tem apontado que, muito embora a existência da 5-hmC dependa de uma 5-mC, ambas apresentam padrões de distribuição genômica distintos, inclusive em células que compõem o mesmo tecido (YU et al., 2012), como mostram os nossos dados. Assim, o perfil tecido-específico já descrito para 5-mC também é verdadeiro para 5-hmC (KINNEY et al., 2011). Algumas pesquisas sugerem que uma diminuição global de 5-hmC estaria relacionada a aumento nos níveis de metilação global do DNA (KO et al., 2010), porém mais estudos ainda precisam ser realizados.

No presente trabalho não foi detectada correlação entre os percentuais de metilação e hidroximetilação global em células de mucosa oral, em contraste com o estudo de Godderis (2015). Foi proposto que o equilíbrio entre níveis de 5-hmC e 5-mC está envolvida no equilíbrio entre a pluripotência celular e o comprometimento da linhagem, (Laird et al., 2013) mas as implicações dessa relação para a saúde são ainda desconhecidas. Os estudos que encontraram associações entre os níveis das duas bases, suportam a hipótese de que a 5-hmC atua como um intermediário de desmetilação activa de 5-mC. No entanto, no presente estudo, não foi detectado correlação entre essas duas bases, e isto pode ser devido ao fato de que as células epiteliais orais obtidas por bochecho são principalmente células em processo de morte celular (células esfoliativas) e, assim, o processo de desmetilação ativa realizada por enzimas TET está comprometida, levando à um "desequilíbrio" na correlação entre as duas bases. Além disso, o nível de 5-hmC também é regulada por microRNAs, que têm como alvo as proteínas TET e outros componentes da via de desmetilação (Kroeze et al., 2015). Entretanto, a maior parte dos RNAs está degradada nas células esfoliativas epitelial bucais (Klaassen et al., 1998).

Inconsistências também foram observadas em estudos com células sanguíneas nos quais alguns autores encontraram correlação (TELLEZ-PLAZA et al., 2014) e outros não (GODDERIS et al., 2015). Wielsher et al. (2013) em um pesquisa feita com amostras de câncer de mama também não encontraram correlação entre as duas bases. Nosso grupo detectou correlação em células não tumorais de pele (dados não publicados), mas não em células da mucosa oral.

Enquanto que, a influência dos fatores extrínsecos é associada à metilação global do DNA, pouco se sabe a respeito dessas influências no perfil de hidroximetilação, portanto, mais estudos são necessários para a compreensão da capacidade desses fatores alterarem os

níveis de 5-hmC e qual das duas modificações (metilação ou hidroximetilação) é mais sensível aos mesmos.

Sabe-se que tanto a metilação global quanto a sítio-específica são influenciadas pelo envelhecimento (BEZERRA et al., 2015; JONES et al., 2015). Atualmente, a hidroximetilação global tem sido caracterizada como uma marca forte e reproduzível da idade cronológica, com potencial para uso em avaliações de saúde e na prevenção de doenças (XIONG et al., 2015). Recentemente foi reportado que os níveis de hidroximetilação de células T do sangue periférico e o tecido hepático são dependentes do envelhecimento e estão associados com o decréscimo gradual da expressão da enzima TET3 (TRUONG et al., 2015; TAMMEN et al., 2014).

Entretanto, em nosso estudo, não detectamos influência do envelhecimento na metilação e hidroximetilação global do DNA de células da mucosa oral. Modificações na metilação do DNA em sítios específicos do epitélio da mucosa oral relativas ao envelhecimento já foram detectados (BEZERRA et al., 2014) e para células epiteliais da pele tem-se sugerido que alterações provocadas pelo envelhecimento são mais proeminentes em sítios específicos do que no perfil global do DNA (GRÖNNIGER et al., 2015). Quando a comparação foi estabelecida entre os gêneros, nenhuma diferença foi encontrada, assim como Godderis e colaboradores (2015) também observaram em seu estudo com células bucais.

É importante ressaltar que as inconsistências entre os estudos que avaliam a metilação e hidroximetilação global podem ser explicadas pela variabilidade de amostragem aleatória, diferenças residuais, o delineamento dos estudos e os níveis de exposição da população avaliada. Contudo, é consenso que alterações para mais ou para menos, tanto da 5-mC quanto da 5-hmC, indicam problemas no equilíbrio do balanço metilação/desmetilação, o que pode levar ao silenciamento de genes supressores tumorais ou ativação de oncogenes, o que favorece ao surgimento do câncer. Desse modo, estudos que visem aprofundar os conhecimentos em relação metilação e hidroximetilação global do genoma humano podem auxiliar na identificação de que genes são diferentemente hidroximetilados ou metilados em indivíduos saudáveis ou portadores de doenças com o objetivo de ampliar os alvos para a criação de novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas (KROEZE et al., 2015).

5.2 Metilação no promotor dos genes *miR-9-3* e *miR-137*

Embora o perfil de metilação global do DNA possa indicar importantes alterações no epigenoma, a hipermetilação gene-específica representa uma das marcas mais consistentes do processo de tumorigênese (PORTELLA & ESTELLER, 2010), e as modificações observadas em células não cancerígenas podem se tornar um poderoso biomarcador capaz de indicar que a célula em questão pode se submeter a um processo maligno. De fato, o tabagismo tem sido associado a alterações no perfil de metilação do DNA em diversos genes e tecidos (TALIKKA et al., 2012), porém poucos estudos mostram esta associação em células da mucosa bucal.

Tem sido mostrado que a expressão da família dos genes *miR* é regulada por metilação do DNA (HAN et al., 2015), e que sua expressão pode ser modulada por fatores ambientais, entretanto, pouco se sabe a respeito de como os fatores extrínsecos influenciam o perfil de metilação desses genes. Particularmente, as famílias *miR-9* e *miR-137* mostram grande potencial como ferramentas para diagnóstico molecular já que mudanças na metilação do DNA destes genes foram encontradas em vários tipos de câncer (KOTURBASH et al., 2011), incluindo o câncer oral (KOZAKI et al., 2008; LANGEVIN et al., 2010).

miR-9-3 – O sítio CpG estudado está localizado na região promotora, como previamente citado. No presente estudo, detectamos hipometilação do *miR-9-3* em células orais não malignas de fumantes. Um estudo realizado por Endo e colaboradores (2015) visando identificar se o uso de cigarro poderia interferir no perfil de metilação de indivíduos saudáveis também identificou uma tendência à hipometilação do sítio cg23576855 no gene *AHRR* em indivíduos fumantes e ainda averigou um aumento do perfil de metilação mediante a interrupção deste hábito. Estudos mostram que o fumo está associado tanto à hipermetilação quanto à hipometilação em diferentes genes e, ainda, um mesmo gene pode apresentar perfil hipometilado ou hipermetilado no mesmo tecido quando se considera sítios CpG diferentes (DE OLIVEIRA et al., 2015).

A hipermetilação pode silenciar miRNAs supressores tumorais, enquanto que a hipometilação desencadeia regulação positiva de miRNAs oncogênicos (oncomirs) (HE & HANNON, 2004). No câncer, o *miR-9* pode assumir o papel tanto de oncogene quanto de gene supressor tumoral, dependendo do tipo de câncer ou tecido (TSAI et al., 2011; ZHANG et al., 2012). Assim como a expressão do *miR-9* pode estar positiva ou negativamente regulada em diferentes estágios do câncer de pulmão, incluindo os estágios precoces de hiperplasia, o nível de metilação de DNA pode variar em distintas fases de transformação de

células malignas (MOMI et al., 2014), já que este mecanismo epigenético regula a expressão gênica. No presente estudo, detectamos hipometilação do *miR-9-3* em células orais não malignas de fumantes, em contraste com estudos que mostram a hipermetilação em células malignas da mucosa oral (MINOR et al., 2012). É possível que a hipometilação, entre outros fatores, seja um evento precoce de transformação. Entretanto, outros estudos são necessários para confirmar esta hipótese, já que a presente pesquisa foi a primeira a demonstrar o perfil de metilação do gene *miR-9-3* em células orais de fumantes saudáveis, e alteração em relação ao uso do cigarro foi encontrada.

miR-137 - O sítio CpG estudado está localizado na região promotora, como previamente citado. Neste trabalho foi constatado que a condição parcialmente metilada é um evento comum nas células orais, já que nenhuma diferença em relação ao hábito de fumar foi detectada. Este perfil também já foi observado em células da pele (DA SILVA et al., 2015).

A metilação do *miR-137* foi encontrada no câncer oral (LANGEVIN et al., 2010; WIKLUND et al., 2011), porém alguns estudos mostraram a hipermetilação tanto em células normais quanto em células de tumor hepático, sugerindo a tecido-especificidade mas não a tumor-especificidade da metilação dos miRNAs (LUJAMBIO et al., 2007). Entretanto, o *miRNA 137* tem demonstrado possuir um importante papel na etiologia e progressão do câncer oral (DANG et al., 2013) e a metilação do seu promotor pode ser detectada em produtos de bochecho e saliva de pacientes com este tipo de carcinoma (LANGEVIN et al., 2010; WIKLUND et al., 2011). É possível que o mecanismo pelo qual o fumo contribui para o desenvolvimento de câncer oral pode não estimular a metilação aberrante deste microRNA, uma vez que não detectamos diferenças entre os grupos e estudamos o mesmo sítio CpG anteriormente estudado em amostras tumorais de câncer bucal (DANG et al., 2013).

A literatura mostra que o tempo e o número de cigarros consumidos por dia pode influenciar o perfil epigenético do indivíduo. Como exemplo, hipermetilação das regiões promotoras dos genes *p16*, (KIM et al., 2001) *APC*, *RASSF1A* e *MTHFR* (TOYOOKA et al., 2004; VAISSIERE et al., 2009). No presente estudo verificamos que indivíduos fumantes por mais de 15 anos apresentaram maior nível de metilação global em comparação aos indivíduos que fumam por menos de 15 anos. Contudo, em relação à metilação em sítios específicos dos genes *miR-9-3* e *miR-137* não foram encontradas diferenças significativas.

A literatura estabelece a existência de inúmeros microRNAs os quais apresentam expressões aberrantes ligadas ao desencadeamento de doenças (MARKOU et al., 2011), em alguns casos com associações diretas ao consumo de cigarro (THUN et al., 2010). Faz-se necessário, todavia, a realização de mais estudos sobre como o hábito de fumar pode

influenciar o perfil de metilação desta classe de genes, visto que parte delas também é regulada pelo acréscimo do radical metil em suas regiões promotoras (HAN et al., 2015).

No presente estudo não foram detectadas diferenças significativas em ambos os genes relativas ao envelhecimento quando os indivíduos foram extratificados em dois grupos, sendo um deles com indivíduos com até 40 anos e outro com indivíduos com mais de 40 anos. O envelhecimento é tradicionalmente caracterizado pela interação de inúmeros fatores, como os danos oxidativos na molécula de DNA, mutações mitocondriais e genômicas (principalmente nas regiões responsáveis pelo reparo do DNA), encurtamento dos telômeros, entre outros (Kirkwood, 2005). Em adição, sabe-se que em mamíferos, o envelhecimento é acompanhado pela perda global e progressiva de 5-mC no DNA de maneira tecido-específica e que aparentemente está relacionada à diminuição da atividade das enzimas DNAmetiltransferases. O nível de metilação de certos sítios CpG podem demonstrar uma estreita relação com o envelhecimento, isto é, tem o potencial de ser utilizados com marcadores biológicos do estado fisiológico de células, tecidos e até mesmo de organismos (ASHAPKIN et al., 2015).

Tanto a hipometilação quanto a hipermetilação em sítios específicos já foram associados ao envelhecimento. Nossa equipe já detectou previamente a hipometilação associada ao envelhecimento da mucosa oral, particularmente no gene *hTERT* (BEZERRA et al., 2014). Além disso, já foi observado hipermetilação do gene *COL1A* em células do ligamento periodontal em indivíduos idosos (OHI et al., 2006). Contudo, no presente estudo não foram detectadas diferenças significativas em ambos os genes, quando os indivíduos foram extratificados em dois grupos, sendo um deles com indivíduos com até 40 anos e outro com indivíduos com mais de 40 anos.

Pouco se sabe sobre a influência do envelhecimento sobre o perfil de metilação da família de genes de microRNAs. Estes, tem sido mais amplamente estudados quanto ao seu grau de expressão em relação ao envelhecimento. Recentemente, vários microRNAs foram identificados como reguladores do processo de envelhecimento por meio do aumento ou diminuição de sua expressão (SMITH-VIKOS et al., 2012). Hooten e colaboradores (2013) em uma pesquisa realizada com soro sanguíneo identificou que o *miR-151a-5p*, *miR-181a-5p* e *miR-1248* apresentavam expressão significativamente menor em idosos. Olivieri et al. (2012) detectaram que o *miR-21* teve sua expressão aumentada em indivíduos entre 66-95 anos.

Em relação ao gênero, não foram detectadas diferenças nos genes estudados, sendo a condição parcialmente metilada a mais frequente para ambos os sexos e genes. Em contraste com células bucais, nosso grupo recentemente mostrou que o gene *miR-137* tem tendência à

hipermetilação no tecido da pele em mulheres (DA SILVA et al., 2015). A literatura relata que o gênero feminino está associado à hipermetilação de certos genes (LIND et al., 2004; LEAL et al., 2007; VAISSIERE et al., 2009) e à proteção contra metilação em outros (LAI et al., 2005; KIKUCHI et al., 2006; VAISSIERE et al., 2009).

Diferenças significativas foram observadas em relação à idade ($p < 0,01$; ANOVA) e gênero ($p < 0,05$; χ^2) entre os grupos que compuseram a população do presente estudo (Tabela 2). Assim, os resultados mostrados nesta pesquisa talvez tenham sido influenciados pela heterogeneidade dos mesmos, tanto nas investigações globais quanto sítio-específicas. Contudo, embora a população tenha sido heterogênea quanto à idade e gênero, alterações no perfil de metilação global e sítio-específica no gene *miR-9-3* foram encontradas, sugerindo que o efeito do cigarro prevalece sobre os fatores intrínsecos idade e gênero.

5.3 Considerações finais

Pesquisas têm evidenciado a correlação entre a exposição a fatores ambientais, com ênfase ao fumo de cigarro, e as alterações epigenéticas, dentre elas, a metilação ou desmetilação do DNA (WAN et al., 2012; HERBERTH et al., 2014), a modificação das histonas (CHUNG et al., 2011; HERBERTH et al., 2014) e a expressão diferencial de miRNAs (MACCANI et al., 2012; HERBERTH et al., 2014). Simultaneamente ou não, estas alterações induzem a diferenciação celular de uma maneira duradoura (YANG & SCHWARTZ, 2012; HERBERTH et al., 2014), trazendo impactos negativos ao organismo. A maioria das alterações investigadas, entretanto, está ligada ao surgimento do câncer (HELLER et al., 2012). Mais pesquisas, portanto, são necessárias a fim de elucidar melhor de que maneira os fatores extrínsecos podem alterar o epigenoma, antes mesmo da instalação de processos patológicos.

Poucos estudos abordam a influência do tabagismo sobre o perfil de metilação de DNA em células orais, as primeiras a sofrer com a exposição da fumaça crônica do cigarro, mesmo após o fato de o hábito de fumar já ter sido associado a alterações nos padrões de metilação e o ao início de diversos processos patológicos, como o câncer de pulmão (KIKUCHI et al., 2006; VAISSIERE et al., 2009), câncer de próstata (ENOKIDA et al., 2006) e o câncer de bexiga (MARSIT et al., 2006).

Identificar os caminhos moleculares que contribuem para o atraso entre a exposição e a doença podem oferecer oportunidades para o desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico precoce e terapias direcionadas. Vários autores têm sugerido que a triagem de um

conjunto de marcadores na saliva ou bochecho de pacientes tem um grande potencial para a detecção eficaz e não invasiva do câncer bucal (RADHAKRISHNAN et al., 2011; GASCHÉ & GOEL, 2012). Alguns autores até sugeriram que estes marcadores poderiam prever a condição dos pulmões, uma vez que ambos são afetados pelos compostos cancerígenos da fumaça do cigarro (BHUTANI et al., 2008).

Baseado nesses fatos e nos resultados do presente estudo, sugerimos que o perfil de metilação global e o promotor do gene *miR-9-3* são marcadores promissores para o monitoramento de alterações relacionadas ao efeito do cigarro nas células bucais.

6. CONCLUSÕES

1- O hábito de fumar por um período superior a 15 anos está associado ao aumento do perfil de metilação global do DNA em células da mucosa oral.

2- O fumo está associado à hipometilação do gene *miR-9-3* em células da mucosa oral.

3- Fatores intrínsecos como idade e gênero não estão associados a alterações no perfil de metilação e hidroximetilação global nem em sítios específicos dos genes *miR-9-3* e *miR-137* em células da mucosa oral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AIDAR, M.; LINE, S.R.P. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. **Brazilian Dental Journal**, v.18, n.2, p.148-52, 2007.
- ANDO, T.; YOSHIDA, T.; ENOMOTO, S.; ASADA, K.; TATEMATSU, M.; ICHIOSE, M., USHIJIMA, T. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. **International Journal of Cancer**, v.124, n.10, p.2367-74, 2009.
- ANDREOLI, S.C.D. S.; GASPARINI, N.J.; CARVALHO, G.P.D.; GARICOCHEA, B.; POGUE, R. E.; ANDRADE, R. V. D. Use of microRNAs in directing therapy and evaluating treatment response in colorectal cancer. **Einstein (São Paulo)**, v.12, n.2, p.256-258, 2014.
- ASHAPKIN, V.V.; KUTUEVA, L.I.; VANYUSHIN, B.F. Aging epigenetics: Accumulation of errors or realization of a specific program?. **Biochemistry (Moscow)**, v.80, n.11, p.1406-1417, 2015.
- ASMAR, F.; SOGAARD, A.; GRONBAEK, K. Chapter 2 – DNA Methylation and Hydroxymethylation in Cancer. Epigenetic Cancer Therapy. **Academic Press**, p.9-30, 2015.
- AUCLAIR, G.; WEBER, M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. **Biochimie**, v.94, n.11, p.2202-2211, 2012.
- AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.D.A. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. **Instituto Mamirauá, Belém**, 2007.
- BALTIMORE, D.; BOLDIN, M.P.; O'CONNELL, R.M.; RAO, D.S.; TAGANOV, K.D. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. **Nature Immunology**, v.9, n.8, p.839-45, 2008.
- BANDRES, E.; AGIRRE, X.; BITARTE, N.; RAMIREZ, N.; ZARATE, R.; ROMAN-GOMEZ, J.; GARCIA-FONCILLAS, J. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, v.125, n.11, p.2737-43, 2009.
- BELINSKY, S.A.; PALMISANO, W.A.; GILLILAND, F.D.; CROOKS, L.A.; DIVINE, K.K.; WINTERS, S.A.; et al. Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. **Cancer Research**, v.62, n.8, p.2370-7, 2002.
- BEMIS, L.T.; CHEN, R.; AMATO, C.M.; CLASSEN, E.H.; ROBINSON, S.E.; COFFEY, D.G.; ERICKSON, P.F.; SHELLMAN, Y.G.; ROBINSON, W.A. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. **Cancer Research**, v. 5, n.68, p.1362-8, 2008.
- BENNETT, P.E.; BEMIS, L.; NORRIS, D.A.; SHELLMAN, Y.G. miR in melanoma development: miRNAs and acquired hallmarks of cancer in melanoma. **Physiological Genomics**, v.45, n.22, p.1049 – 59, 2013.
- BERGER, S.L.; KOUZARIDES, T; SHIEKHATTAR, R; SHILATIFARD, A. An operational definition of epigenetics. **Genes & Development**, v.23, n.7, p.781-783, 2009.
- BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human Molecular Genetics**, v.9, n.16, p.2395-2402, 2000.
- BEZERRA, S.F.O.; COSTA, L.A.; FREITAS, P.A.N.; OLIVEIRA, N.F.P. Age-related Changes in DNA Methylation Status of *hTERT* Gene Promoter of Oral Epithelial Cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology - An International Journal**, 2014.

BHUTANI, M.; PATHAK, A.K.; FAN, Y.H.; LIU, D.D.; LEE, J.J.; TANG, H.; MAO, L. Oral epithelium as a surrogate tissue for assessing smoking-induced molecular alterations in the lungs. **Cancer Prevention Research**, v.1, n.1, p.39-44, 2008.

BHUTANI, N.; BURNS, D.M.; BLAU, H.M. DNA demethylation dynamics. **Cell**, v.146, n.6, p.866-872, 2011.

BIER, A.; GILADI, N.; KRONFELD, N.; LEE, H.K.; CAZACU, S.; FINNISS, S.; XIANG, C.; POISSON, L.; DE CARVALHO, A.C.; SLAVIN, S.; JACOBY, E.; YALON, M.; TOREN, A.; MIKKELSEN, T.; BRODIE, C. MicroRNA-137 is downregulated in glioblastoma and inhibits the stemness of glioma stem cells by targeting RTVP-1. **Oncotarget**, v.4, n.5, p.665–76, 2013.

BIDISHA, P.; TRYGVE, O.T. Outline of Epigenetics – Chapter 2. **Epigenetics in Psychiatry**, Elsevier, 2014.

CALIN, G.A.; CROCE, C.M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nature Reviews Cancer**, v.6, n.11, p.857-66, 2006.

CARR, I.M.; VALLELEY, E.M.A.; CORDERY, S.F.; MARKHAM, A.F.; BONTHRON, D.T. Sequence analysis and editing for bisulphite genomic sequencing projects. **Nucleic Acids Research**, v.35, n.10, p.e79, 2007

CHEN, C.Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **New England Journal of Medicine**, n.353, n.17, p.1768–71, 2005.

CHEN, D.; CABAY, R.J.; JIN, Y.; WANG, A.; LU, Y.; SHAH-KHAN, M.; ZHOUL, X. MicroRNA Deregulations in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. **Journal of Oral & Maxillofacial Research**, v.4, n.1, e.2, p.1, 2013.

CHEN, M.L.; SHEN, F.; Huang W et al. Quantification of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA from hepatocellular carcinoma tissues by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/quadrupole TOF mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v.59, n.5, p.824–32, 2013.

CHOI, J.Y.; JAMES, S.R.; LINK, P.A.; MCCANN, S.E.; HONG, C.C., et al. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. **Carcinogenesis**, v.30, n.11, p.1889–97, 2009.

CHOUDHURI, S. From Waddington’s epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v.21, n. 4, p.252-74, 2011.

CHUNG, S.; SUNDAR, I.K.; HWANG, J.W.; YULL, F.E.; BLACKWELL, T.S.; KINNULA, V.L. et al. NF-kappaB inducing kinase, NIK mediates cigarette smoke/TNFalpha-induced histone acetylation and inflammation through differential activation of IKKs. **Plos One**, v.6, n.8, p.e23488, 2011.

CHRISTENSEN, B. C.; HOUSEMAN, E.A.; MARSIT, C.J.; ZHENG, S.; WRENSCH, M.R.; WIEMELS, J.L.; NELSON, H.H.; KARAGAS, M.R.; PADBURY, J.F.; BUENO, R.; SUGARBAKER, D.J.; YEH, R.F.; WIENCKE, J.K.; KELSEY, K.T. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. **Plos Genet**, v.5, n.8, p.e1000602, 2009.

- DA SILVA, A.R. M.; BARROSO, H.; DE ARAÚJO, DU.; PEREIRA, F.R; DE OLIVEIRA, N.F.P. The influence of sun exposure on the DNA methylation status of *MMP9*, *miR-137*, *KRT14* and *KRT19* genes in human skin. **European Journal of Dermatology**, v.1, n.1, 2015.
- DANG, J.; BIAN, Y.Q.; SUN, J.Y.; CHEN, F.; DONG, G.Y.; LIU, Q.; WANG, Q.T. MicroRNA-137 promoter methylation in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.42, n.4, p.315-321, 2013.
- DAVIDSON-MONCADA, J.; PAPAVALIIOU, F.N.; TAM, W. MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1183, n.1, p.183–194, 2010.
- DE ARRUDA, I.T.S.; PERSUHN, D.C.; DE OLIVEIRA, N.F.P. The *MTHFR* C677T polymorphism and global DNA methylation in oral epithelial cells. **Genetics and Molecular Biology**, v.36, n.4, p.490-493, 2013.
- DELATTE, B.; DEPLUS, R.; FUKS, F. Playing TETris with DNA modifications. **The EMBO journal**, p.e201488290, 2014.
- DEMARINI, D. M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v.567, n.2-3, p.447-74, 2004.
- DE OLIVEIRA, S.R.L.; DA SILVA, I.C.B.; MARIZ, B.A.L.A.; PEREIRA, A.M.B.C.; DE OLIVEIRA, N.F.P. DNA methylation analysis of cancer-related genes in oral epithelial cells of healthy smokers. **Archives of Oral Biology**, v.60, n.6, p.825-833, 2015.
- ENDO, K.; LI, J.; NAKANISHI, M.; ASADA, T.; IKESUE, M.; GOTO, Y.; IWAI, N. Establishment of the MethyLight assay for assessing aging, cigarette smoking, and alcohol consumption. **BioMed Research International**, v.2015, 2015
- ENOKIDA, H.; SHIINA, H.; URAKAMI, S.; TERASHIMA, M.; OGISHIMA, T.; LI, L.C.; IGAWA, M. Smoking influences aberrant CpG hypermethylation of multiple genes in human prostate carcinoma. **Cancer**, v.106, n.1, p.79-86, 2006.
- FEINBERG, A.P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews Cancer**, v.4, n.2, p.143-153, 2004.
- FICZ, G.; BRANCO, M.R.; SEISENBERGER, S.; SANTOS, F.; KRUEGER, F.; HORE, T.A.; REIK, W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. **Nature**, v.473, n.7347, p.398–402, 2011.
- FOWLES, J.; DYBING, E. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. **Tobacco Control**, v.12, n.4, p.424–30, 2003.
- FRIEDMAN, R.C.; FARH, K.K.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v.19, n.1, p.92-105, 2009.
- FUKE, C.; SHIMABUKURO, M.; PETRONIS, A.; SUGIMOTO, J.; ODA, T.; MIURA, K.; JINNO, Y. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. **Annals of Human Genetics**, pt.68, n.3, p.196–204, 2004.
- FUKUSHIGE, S.; KONDO, E.; HORII, A. Methyl-CpG targeted recruitment of p300 reactivates tumor suppressor genes in human cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.379, n.4, p.1021-6, 2009.

GAO, F.; ZHAO, Z.L.; ZHAO, W.T.; FAN, Q.R.; WANG, S.C.; LI, J.; XIE, R.Y. *miR-9* modulates the expression of interferon-regulated genes and MHC class I molecules in human nasopharyngeal carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.431, n.3, p.610-616, 2013.

GAO, Y.; BACCARELLI, A.; SHU, X.; JI, B.; YU, K., et al. Blood leukocyte Alu and *LINE-1* methylation and gastric cancer risk in the Shanghai Women's Health Study. **British Journal of Cancer**, v.106, n.3, p.585-91, 2012.

GASCHE, J.A.; GOEL, A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. **Future Oncology**, v.8, n.11, p.1407-25, 2012.

GLOBISCH, D.; MÜNZEL, M.; MÜLLER, M.; MICHALAKIS, S.; WAGNER, M.; KOCH, S.; CARELL, T. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. **PLoS One**, v.5, n.12, p.e15367, 2010.

GODDERIS, L.; SCHOUTEDEN, C.; TABISH, A.; POELS, K.; HOET, P.; BACCARELLI, A.A.; VAN LANDUYT, K. Global methylation and hydroxymethylation in DNA from blood and saliva in healthy volunteers. **BioMed Research International**, v.2015, 2015.

GOMES, M.V.M.; TOFFOLI, L.V.; ARRUDA, D.W.; SOLDERA, L.M.; PELOSI, G.G.; NEVES-SOUZA, R.D.; FREITAS, E.R.; CASTRO, D.T.; MARQUEZ, A.S. Age-Related Changes in the Global DNA Methylation Profile of Leukocytes Are Linked to Nutrition but Are Not Associated with the *MTHFR* C677T Genotype or to Functional Capacities. **PLoS One**, v.7, n.12, 2012.

GRONNIGER, E.; WEBER, B.; HEIL, O.; PETERS, N.; STAB, F.; WENCK, H.; LYKO, F. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. **PLoS Genet**, v.6, n.5, p.e1000971, 2010.

HAN, L.; WITMER, P.D.; CASEY, E.; VALLE, D.; SUKUMAR, S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. **Cancer Biology & Therapy**, v.6, p.1284-8, 2015.

HE, L.; HANNON, G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature Reviews Genetics**, v.5, n.7, p.522-531, 2004.

HELLER, G.; WEINZIERL, M.; NOLL, C.; BABINSKY, V.; ZIEGLER, B.; ALTENBERGER, C.; MINICHSDORFER, C.; LANG, G.; DECOME, B.; END-PFUTZENREUTER, A.; ARNS, B.M.; GRIN, Y.; KLEPETKO, W.; ZIELINSKI, C.C.; ZOCHBAUER-MULLER, S. Genome-Wide miRNA Expression Profiling Identifies *miR-9-3* and *miR-193a* as Targets for DNA Methylation in Non-Small Cell Lung Cancers. **Clinical Cancer Research**, v.18, n.6, p.1619-29, 2012.

HERBERTH, G.; BAUER, M.; GASCH, M.; HINZ, D.; RODER, S.; OLEK, S.; BORTE, M. Maternal and cord blood *miR-223* expression associates with prenatal tobacco smoke exposure and low regulatory T-cell numbers. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.133, n.2, p.543-550.e4, 2014.

HILDEBRANDT, M.A.; GU, J.; LIN, J.; YE, Y.; TAN, W.; TAMBOLI, P.; WU, X. *Hsa-miR-9* methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. **Oncogene**, v.29, n.42, p.5724-8, 2010.

HILLEMACHER, T.; FRIELING, H.; MOSKAU, S.; MUSCHLER, M.A.N.; SEMMLER, A.; KOMHUBER, J.; KLOCKGETHER, T.; BLEICH, S.; LINNEBANK, M. Global DNA methylation is influenced by smoking behavior. **European Neuropsychopharmacology**, v.18, n.4, p.295-8, 2008.

- HOEIKMAKERS, J.; POTHOF, J. MicroRNA and response to DNA (UV) damage, **Mutation Reseaarch**, v.717, n.1, 2011.
- HOOTEN, N.N.; FITZPATRICK, M; WOOD 3RD, W.H.; DE, S.; EJOGU, N.; ZHANG, Y.; EVANS, M.K.. Age-related changes in microRNA levels in serum. **Aging (Albany NY)**, v.5, n.10, p.725, 2013.
- HSIUNG, D.T.; MARSIT, C.J.; HOUSEMAN, E.A.; EDDY, K.; FURNSS, C.S., et al. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.16, n.1, p.108–14, 2007.
- HUDDER, A.; NOVAK, R.F. miRNAs: effectors of environmental influences on gene expression and disease. **Toxicological Science**, v.103, n.2, p.228–240, 2008.
- IZZOTTI, A.; CARTIGLIA, C.; LONGOBARDI, M.; BAGNASCO, M.; MERELLO, A.; YOU, M.; LUBET, R.A.; DE FLORA, S. Gene expression in the lung of *p53* mutant mice exposed to cigarette smoke. **Cancer Research**, v.64, n.23, p.8566–72, 2004.
- IZZOTTI, A.; LARGHERO, P.; LONGOBARDI, M.; CARTIGLIA, C.; CAMOIRANO, A.; STEELE, V.E.; DE FLORA, S. Dose-responsiveness and persistence of microRNA expression alterations induced by cigarette smoke in mouse lung. **Mutation Research**, v.717, n.1, p.9– 16, 2011.
- JIA, W.; CHEN, W.; KANG, J. The functions of microRNAs and long non-coding RNAs in embryonic and induced pluripotent stem cells. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v.11, n.5, p.275–83, 2013.
- JIN, S.G.; WU, X.; LI, A.X.; PFEIFER, G.P. Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. **Nucleic Acids Research**, p.gkr120, 2011.
- JIN, S.G.; JIANG, Y.; QIU, R.; RAUCH, T.A.; WANG, Y.; SCHACKERT, G.; PFEIPER, G.P. 5-hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with *IDH1* mutations. **Cancer Research**, v.71, n.24, p.7360–5, 2011.
- JONES, M.J.; GOODMAN, S.J.; KOBOR, M. S. DNA methylation and healthy human aging. **Aging Cell**, v.14, n.6, p.924-32, 2015.
- KHAN, S.A.; REDDY, D.; GUPTA, S. Global histone post-translational modifications and cancer: Biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment?. **World Journal of Biological Chemistry**, v.6, n.4, p.333, 2015.
- KIKUCHI, S.; YAMADA, D.; FUKAMI, T. et al. Hypermethylation of the *TSLC1/IGSF4* promoter is associated with tobacco smoking and a poor prognosis in primary nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer**, v.106, n.8, p.1751–8, 2006.
- KIM, D.H.; NELSON, H.N.; WIENCKE, J.K.; ZHENG, S.; CHRISTIANI, D.C.; WAIN, J.C.; KELSEY, K.T. *p16INK4a* and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. **Cancer Research**, v.61, n.8, p.3419-24, 2001.
- KINNEY, S.M.; CHIN, H.G.; VAISVILA, R.; BITINAITE, J.; ZHENG, Y.; ESTÈVE, P.O.; PRADHAN, S. Tissue-specific distribution and dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in mammalian genomes. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, n.28, p.24685-24693, 2011.
- KIRKWOOD TB. Understanding the odd science of aging. **Cell**, v.120, p.437-447, 2005.

- KITANO, K.; WATANABE, K.; EMOTO, N.; KAGE, H.; HAMANO, E.; NAGASE, T.; SANO, A.; MURAKAWA, T.; NAKAJIMA, J.; GOTO, A.; FUKAYAMA, M.; YATOMI, Y.; OHISHI, N.; TAKAI, D. CpG island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of non-small-cell lung cancer. **Cancer Science**, v.102, n.12, p.2126–31, 2011.
- KLAASSEN, I.; COPPER, MP.; BRAKENHOFF, RH.; SMEETS, SJ.; SNOW, GB.; BRAAKHUIS, BJ. Exfoliated oral cell messenger RNA: suitability for biomarker studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 6, p.469-72, 1998.
- KO, M.; HUANG, Y.; JANKOWSKA, A. M., et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant *TET2*. **Nature**, v.468, n.7325, p.839–43, 2010.
- KOTURBASH, I.; ZEMP, F.J.; POGRIBNY, I.; KOVALCHUK, O. Small molecules with big effects: the role of the microRNAome in cancer and carcinogenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.722, n.2, p. 4-105, 2011.
- KOZAKI, K.; IMOTO, I.; MOGI, S.; OMURA, K.; INAZAWA, J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. **Cancer Research**, v.68, n.7, p.2094–2105, 2008.
- KRIAUCIONIS, S.; HEINTZ, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. **Science**, v.324, n.5929, p.929-930, 2009.
- KROEZE, L.I.; VAN DER REIJDEN, B.A.; JASEN, J.H. 5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1855, n.2, p.144–54, 2015.
- LAI, J.C.; CHENG, Y.M.; CHIOU, H.L.; WU, M.F.; CHEN, C.Y.; LEE, H. Gender difference in estrogen receptor alpha promoter hypermethylation and its prognostic value in non-small cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, v.117, n.6, p.974-980, 2005.
- LAIRD, A.; THOMSON, J.P.; HARRISON, D.J.; MEEHAN, R.R. 5-hydroxymethylcytosine profiling as an indicator of cellular state. **Epigenomics**, v.5, n.6, p.655-669, 2013.
- LANGVIN, S.M.; STONE, R.A.; BUNKER, C.H.; GRANDIS, J.R.; SOBOL, R.W.; & TAIOLI, E. MicroRNA-137 promoter methylation in oral rinses from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with gender and body mass index. **Carcinogenesis**, v.31, n.5, p.864-70, 2010.
- LEAL, M.; LIMA, E.; SILVA, P.; ASSUMPÇÃO, P.; CALCAGNO, D.; PAYÃO, S.; SMITH, M. Promoter hypermethylation of *CDH1*, *FHIT*, *MTAP* and *PLAGL1* in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v.13, n.18, p.2568-2574, 2007.
- LIAO, L.M.; BRENNAN, P.; VAN BEMMEL, D.M.; ZARIDZE, D. MATVEEV, V.; JANOUT, V.; MATES, D. *L1NE-1* methylation levels in leukocyte DNA and risk of renal cell cancer. **Plos One**, v.6, n.11, 2011.
- LI, L.C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v.18, p.1427-31, 2002.
- LI, W.; LIU, M. Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. **Journal of Nucleic Acids**, v.2011, 2011.

LIN, J.C.; JEONG, S.; LIANG, G.T.D.; FATEMI, M.; TSAI, Y.C.; JONES, P.A. Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. **Cancer Cell**, v.12, n.5, p.432-444, 2007.

LIND, G.E.; THORSTENSEN, L.; LOVIG, T.; MELING, G.I.; HAMELIN, R.; ROGNUM, T.O.; LOTHE, R.A. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. **Molecular Cancer**, v.3, n.1, p.28, 2004.

LIU, C.; LIU, L.; CHEN, X. et al., Decrease of 5-hydroxymethylcytosine is associated with progression of hepatocellular carcinoma through downregulation of TET1, **Plos One**, v.8, n.5, 2013.

LU, Y.C.; CHANG, J.T. C.; HUANG, Y.C.; HUANG, C.C.; CHENC, W.H.; LEE, L.Y.; HUANG, B. S.; CHEN, Y.J.; LI, H.F.; CHENG, A.J. Combined determination of circulating *miR-196a* and *miR-196b* levels produces high sensitivity and specificity for early detection of oral cancer. **Clinical Biochemistry**, v.48, n.3, p.115-121, 2015.

LUJAMBIO, A.; CALIN, G.A.; VILLANUEVA, A.; ROPERO, S.; SANCHEZ-CESPEDES, M.; BLANCO, D.; GALLAGHER, W.M. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n.36, p.13556–61, 2008.

LUJAMBIO, A.; ROPERO, S.; BALLESTAR, E.; FRAGA, M.F.; CERRATO, C.; SETIÉN, F.; SPITERI, I. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. **Cancer Research**, v.67, n.4, p.1424-9, 2007.

MA, L.; YOUNG, J.; PRABHALA, H.; PAN, E.; MESTDAGH, P.; MUTH, D.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; REINHARDT, F.; ONDER, T.T.; VALASTYAN, S. *miR-9*, a MYC/MYCN-activated micro- RNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. **Nature Cell Biology**, v.12, n.3, p.247–56, 2010

MACCANI, M.A.; KNOPIK, V. S. Cigarette smoke exposure-associated alterations to non-coding RNA. **Front Genet**, n.3, p.53, 2012.

MARKOU, A.; LIANG, Y.; LIANIDOU, E. Prognostic, therapeutic and diagnostic potential of microRNAs in non-small cell lung cancer. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.49, n.10, p.1591-1603, 2011.

MARSIT, C.J.; KARAGAS, M.R.; ÚNAEE, H.; DANAE, H.; LIU, M.; ANDREW, A.; SCHNED, A.; KELSEY, K.T. Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer. **Carcinogenesis**, v.27, n.1, p.112–16, 2006.

MINOR, J.; WANG, X.; ZHANG, F.; SONG, J.; JIMENO, A.; WANG, X.J.; LU, X.; GROSS, N.; WANG, M.K.M.D.; LUA, S. L. Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, v.48, n.1, p.73-78, 2012.

MOMI, N.; KAUR, S.; RACHAGANI, S.; GANTI, A.K.; BATRA, S.K. Smoking and microRNA dysregulation: a cancerous combination. **Trends in Molecular Medicine**, v.20, n.1, p.36-47, 2014.

MYDLARZ, W.K.; HENNESSEY, P.T.; CALIFANO, J.A. Advances and perspectives in the molecular diagnosis of head and neck cancer. **Expert Opinion on Medical Diagnostics**, v.4, n.1, p.53-65, 2010.

NASS, D.; ROSENWALD, S.; MEIRI, E.; GILAD, S.; TABIBIAN-KEISSAR, H.; SCHOLOSBERG, A.; KUKER, H.; SION-VARDY, N.; TOBAR, A.; KHARENJO O. *miR-92b* and *miR-9/9** are

specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors. **Brain Pathology**, v.19, n.3, p.375–83, 2009.

NEIDHART, M. Chapter 4 – DNA Methylation and Environmental Factors. DNA Methylation and Complex Human Disease. **Academic Press**, p.45–65, 2015.

O'CONNELL, R.M.; RAO, D.S.; BALTIMORE, D. microRNA regulation of inflammatory responses. **Annual review of immunology**, v.30, p.295-312, 2012.

OHI, T.; UEHARA, Y.; TAKATSU, M.; WATANABE, M.; ONO, T. Hypermethylation of CpGs in the promoter of the COL1A1 gene in the aged periodontal ligament. **Journal of Dental Research**, v.85, n.3, p.245-250, 2006.

OLIVEIRA, N.F.; DAMM, G.R.; ANDIA, D.C.; SALMON, C.; NOCITI, F.H.JR.; LINE, S.R.; DE SOUZA, A.P. DNA methylation status of the *IL8* gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v.36, n.9, p.719-25, 2009.

OLIVIERI, F.; SPAZZAFUMO, L.; SANTINI, G.; LAZZARINI, R.; ALBERTINI, M. C.; RIPPO, M. R.; OSTAN, R. Age-related differences in the expression of circulating microRNAs: miR-21 as a new circulating marker of inflammaging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.133, n.11, p.675-685, 2012.

OMURA, N.; LI, C.P.; LI, A.; HONG, S.M.; WALTER, K.; JIMENO, A.; GOGGINS, M. Genome-wide profiling of methylated promoters in pancreatic adenocarcinoma. **Cancer Biology Theraphy.**, v.7, n.7, p.1146–56, 2008.

ORR, B.A.; HAFFNER, M.C.; NELSON, W.G.; YEGNASUBRAMANIAN, S.; EBERHART, C.G. Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma. **Plos One**, v.7, n.7, 2012.

PEREZ-CARBONELL, L.; BALAGUER, F.; TOIYAMAL, Y.; EGOAVIL, C.; ROJAS, E.; GUARINOS, C.; ANDREU, M.; LLOR, X.; CASTELLS, A.; JOVER, R.; BOLAND, C.R.; GOELL, A. *IGFBP3* Methylation Is a Novel Diagnostic and Predictive Biomarker in Colorectal Cancer. **Plos One**, v.9, n.8, 2014.

PHILIBERT, R.; PLUME, J.M.; GIBBONS, F.X.; BRODY, G.H.; BEACH, S.R. The impact of recent alcohol use on genome wide DNA methylation signatures. **Frontiers in Genetics**, v.3, p.54, 2012.

PIYATHILAKE, C.J.; FROST, A.R.; BELL, W.C.; OELSCHLAGER, D.; WEISS, H.; JOHANNING, G.L.; NIVELEAU, A.; HEIMBURGER, D.C.; GRIZZLE, W.E. Altered Global Methylation of DNA: An Epigenetic Difference in Susceptibility for Lung Cancer Is Associated With Its Progression. **Human Pathology**, v.32, n.8, p.856-62, 2001.

PORTELLA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, v.28, n.10, p.1057-1068, 2010.

POTHOF, J.; VERKAIK, N.S.; VAN IJCKEN, W.; WIEMER, E.A.; TA, V.T.; VAN DER HORST, G.T.; JASPERS, N.G.; VAN GENT, D.C.; HOEIJMAKERS, J.H.; PERSENGIEV, S.P. MicroRNAmatediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response. **The EMBO Journal**, v.28, n.14, p.2090–99, 2009.

PROBST, A.V.; DUNLEAVY, E.; ALMOUZNI, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. **Nature reviews Molecular cell biology.**, v.10, n.3, p.192–206, 2009.

- PUFULETE, M.; AL-GHNANIEM, R.; LEATHER, A.J.; APPLEBY, P.; GOUT, S.; TERRY, C.; SANDERS, T.A. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. **Gastroenterology**, v.124, n.5, p.1240–1248, 2003.
- RADHAKRISHNAN, R.; KABEKKODU, S.; SATYAMOORTHY, K. DNA hypermethylation as an epigenetic mark for oral cancer diagnosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.40, n.9, p.665-676, 2011.
- ROACH, H.I.; YAMADA, N.; CHEUNG, K.S.; TILLEY, S.; CLARKE, N.M.; OREFFO, R.O.; KOKUBUN, S.; BRONNER, F. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. **Arthritis & Rheumatis**, v.52, n.10, p.3110-24, 2005.
- RODGER, E.J.; CHATTERJEE, A.; MORISON, I.M. 1.5-hydroxymethylcytosine: a potential therapeutic target in cancer. **Epigenomics**, v.5, n.6, p.503–514, 2014.
- SCHRAIVOGEL, D.; WEINMANN, L.; BEIER, D.; TABATABAI, G.; EICHNER, A.; ZHU, J.Y.; ANTON, M.; SIXT, M.; WELLER, M.; BEIER, C.P. *CAMTA1* is a novel tumour suppressor regulated by *miR-9/9** in glioblastoma stem cells. **The EMBO Journal**, v.30, n.20, p.4309–22, 2011.
- SCHEMBRI, F.; SRIDHAR, S.; PERDOMO, C.; ADAM, M. G.; ZHANG, X.; ERGUN, A.; LU, J.; LIU, G.; ZHANG, X.; BOWERS, J.; VAZIRI, C.; OTT, K.; SENSINGER, K.; COLLINS, J.J.; BRODY, J.S.; GETTS, R.; LENBURG, M.E.; SPIRAA, A. MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. **PNAS**, v.106, n.7, p.2319–24, 2009.
- SHARMA, S.; KELLY, T.K.; JONES, P.A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v.31, n.1, p.27-36, 2010.
- SHEN, L.; WU, H.; DIEP, D.; YAMAGUCHI, S.; D’ALESSIO, A.C.; FUNG, H.L.; ZHANG, Y. Genome-wide analysis reveals TET-and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. **Cell**, v.153, n.3, p.692-706, 2013.
- SHIH, A.H.; ABDEL-WAHAB, O.; PATEL, J.P.; LEVINE, R.L. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. **Nature Reviews Cancer**, v.12, n.9, p.599–612, 2012.
- SHIMIZU, T.; SUZUKI, H.; NOJIMA, M.; KITAMURA, H.; YAMAMOTO, E.; MARUYAMA, R.; ASHIDA, M.; HATAHIRA, T.; KAI, M.; MASUMORI, N.; TOKINO, T.; IMAI, K.; TSUKAMOTO, T.; TOYOTA, M. Methylation of a Panel of MicroRNA Genes Is a Novel Biomarker for Detection of Bladder Cancer. **European Urology**, v.63, n.6, p.1091–1100, 2013.
- SILBER, J.; LIM, D.A.; PETRITSCH, C.; PERSSON, A.I.; MAUNAKEA, A.K.; YU, M.; BERGERS, G. *miR-124* and *miR-137* inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. **BMC Medicine**, v.6, n.1, p.14, 2008.
- SEMMLER, A.; HEESE, P.; STOFFEL-WAGNER, B.; MUSCHELER, M.; HEBERLEIN, A.; PROST, J.C.; FRIELING, H.; KORNHUBER, J.; BANGER, M.; BLEICH, S.; HILLEMACHER, T.; LINNEBANK, M. Alcohol abuse and cigarette smoking are associated with global DNA hypermethylation: results from the German Investigation on Neurobiology in Alcoholism (GINA). **Alcohol**, v.46, n.2, p.7-17, 2015.
- SMITH-VIKOS, T.; SLACK, F.J. MicroRNAs and their roles in aging. **Journal of Cell Science**, v.125, n.1, p.7-17, 2012.
- SONKOLY, E.; PIVARCSI, A. MicroRNAs in inflammation and response to injuries induced by environmental pollution, **Mutation Research**, v.717, n.1, p.46-53, 2011.

SPIRA, A.; BEANE, J.; SHAH, V.; LIU, G.; SCHEMBRI, F.; YANG, X.; PALMA, J.; BRODY, J.S. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.27, p.10143–8, 2004.

STEPONAITIENE, R.; KUPCINSKAS, J.; LANGNER, C.; BALAGUER, F.; VENCLAUSKAS, L.; PAUZAS, H.; TAMELIS, A.; SKIECEVICIENE, J.; KUPCONSKAS, L.; MALFERTHEINER, P.; LINK, A. Epigenetic Silencing of *miR-137* is a Frequent Event in Gastric Carcinogenesis. **Molecular Carcinogenesis**, 2015.

STRATHDEE, G.; BROWN, R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.4, n.4, p.1-17, 2002

SZULWACH, K.E.; LI, X.; LI, Y.; SONG, C. X.; WU, H.; DAI, Q.; VASANTHAKUMAR, A. 5-hmC mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. **Nature Neuroscience**, v.14, n.12, p.1607-16, 2011.

SZYF, M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. **Toxicological Science**, v.100, n.1, p.7-23, 2007.

TAHILIANI, M.; KOH, K.P.; SHEN, Y.; PASTOR, W.A.; BANDUKWALA, H.; BRUDNO, Y.; RAO, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**, v 324, n.5929, p.930-935, 2009.

TALIKKA, M.; SIERRA, N.; IVANOV, N.V.; CHAUDHARY, N.; PECK, M.J.; HOENG, J.; PEITSCH, M.C. Genomic impact of cigarette smoke, with application to three smoking-related diseases. **Critical Reviews in Toxicology**, v.42, n.10, p.877-889, 2012.

TAMMEN, S.A.; DOLNIKOWSKI, G.G.; AUSMAN, L.M.; LIU, Z.; SAUER, J.; FRISO, S.; CHOI, S.W. Aging and alcohol interact to alter hepatic DNA hydroxymethylation. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.38, n.8, p.2178-2185, 2014.

TAYLOR, S.E.B.; SMERIGLIO, P.; LAKSHMI, D.; RATH, M.; BHUTANI, N. A Global Increase in 5-Hydroxymethylcytosine Levels Marks Osteoarthritic Chondrocytes. **Arthritis & Rheumatology**, v.66, n.1, p.90–100, 2014.

TELLEZ-PLAZA, M.; TANG, W.Y.; SHANG, Y.; UMANS, J.G.; FRANCESCONI, K.A.; GOESSLER, W.; GUALLAR, E. Association of global DNA methylation and global DNA hydroxymethylation with metals and other exposures in human blood DNA samples. **Environmental Health Perspectives (Online)**, v.122, n.9, p.946-954, 2014.

TESCHENDORFF, A.E., YANG, Z.; WONG, A.; PIPINIKAS, C.P.; JIAO, Y.; JONES, A.; JANES, S.M. Correlation of Smoking-Associated DNA Methylation Changes in Buccal Cells With DNA Methylation Changes in Epithelial Cancer. **JAMA Oncology**, v.1, n.4, p.476-485, 2015.

THUN, M. J.; DeLANCEY, J.O.; CENTER, M.M.; JEMAL, A.; WARD, E.M. The global burden of cancer: priorities for prevention. **Carcinogenesis**, v.31, n.1, p.100-110, 2010.

TONG, A.W.; NEMUNAITIS, J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy?. **Cancer Gene Therapy**, v.15, n.6, p.341-355, 2008.

TOWLE, R.; TRUONG, D.; HOGG, K.; ROBINSON, W.P.; POH, C.F.; GARNIS, C. **Oral oncology**, v.49, n.11, p.1033-1042, 2013.

TOYOOKA, S.; SUZUKI, M.; TSUDA, T.; TOYOOKA, K.O.; MARUYAMA, R.; TSUKUDA, K.; MINNA, J.D. Dose effect of smoking on aberrant methylation in non-small cell lung cancers. **International Journal of Cancer**, v.110, n.3, p.462-464, 2004.

TREVILATTO, P.C.; LINE, S.R. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. **The Journal of Forensic Odonto-Stomatology**, v.18, n.1, p.6-9, 2000.

TRUONG, T.P.; SAKATA-YANAGIMOTO, M.; YAMADA, M.; NAGAE, G.; ENAMI, T.; NAKAMOTO-MATSUBARA, R.; ABURATANI, H.; CHIBA, S. Age-Dependent Decrease of DNA Hydroxymethylation in Human T Cells. **Journal of Clinical and Experimental Hematopathology**, v.55, n.1, 2015.

TSAI, K. W.; LIAO, Y.L.; WU, C.W.; HU, L.Y.; LI, S.C.; CHAN, W.C.; HUANG, K.H. Aberrant hypermethylation of *miR-9* genes in gastric cancer. **Epigenetics**, v.6, n.10, p.1189-97, 2011.

UESUGI, A.; KOZAKI, K.I.; TSURUTA, T.; FURUTA, M.; MORITA, K.I.; IMOTO, I.; INAZAWA, J. The tumor suppressive microRNA *miR-218* targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. **Cancer Research**, v.71, n.17, p.5765-78, 2011.

USHIJIMA, T.; ASADA, K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Sci**, v.101, n.2, p.300-5, 2010.

VAISSIERE, T.; HUNG R.J.; ZARIDZE, D.; MOUKERIA, A.; CUENIN, C.; FASOLO, V.; TOST, J. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. **Cancer Research**, v.69, v.1, p.243-52, 2009.

VALINLUCK, V.; TSAI, H.H.; ROGSTAD, D.K.; BURDZY, A.B.; SOWERS, L.C. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). **Nucleic Acids Research**, v.32, n.14, p.4100-08, 2004.

VENKATESAN, N.; DEEPA, P.R.; VASUDEVAN, M.; KHETAN, V.; REDDY, A.M.; KRISHNAKUMAR, S. Integrated analysis of dysregulated miRNA-gene expression in HMGA2-silenced retinoblastoma cells. **Bioinformatics and Biology Insights**, v.8, p.177, 2014.

VOLINIA, S.; CALIN, G.A.; LIU, C.G.; AMBS, S.; CIMMINO, A.; PETROCCA, F.; VISIONE, R.; IORIO, M.; ROLDO, C.; FERRACIN, M.; PRUEITT, R.L.; YANAIHARA, N.; LANZA, G.; SCARPA, A.; VECCHIONE, A.; NEGRINI, M.; HARRIS, C.C.; CROCE, C.M. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n.7, p.2257-61, 2006.

VRNA, L.; MUÑOS-RODRIGUEZ, J.L.; STAMPFER, M.R.; FUTSCHER, B.W. miRNA Gene Promoters Are Frequent Targets of Aberrant DNA Methylation in Human Breast Cancer. **Plos One**, v.8, n.1, 2013.

WAN, E.S.; QIU, W.; CAREY, V.J.; MORROW, J.; BACHERMAN, H.; FOREMAN, M.G.; DeMEO, D.L. Smoking Associated Site Specific Differential Methylation in Buccal Mucosa in the COPD Gene Study. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.53, n.2, p.246-54, 2015.

WAN, E.S.; QIU, W.; BACCARELLI, A.; CAREY, V.J.; BACHERMAN, H.; RENNARD, S.I.; DeMEO, D.L. Cigarette smoking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome. **Human Molecular Genetics**, v.21, n.13, p.3073-82, 2012.

- WANG, L.Q.; KWONG, Y.L.; KHO, C.S.B.; WONG, K.F.; WONG, K.Y.; FERRACIN, M.; CHIM, C.S. Epigenetic inactivation of *miR-9* family microRNAs in chronic lymphocytic leukemia-implications on constitutive activation of NF κ B pathway. **Leukemia (CLL)**, v.7, p.11, 2013.
- WATERLAND, R.A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **The Journal of Nutrition**, v.136, n.6, p.1706S-1710S, 2006.
- WATERLAND, R.A.; JIRTLE, R.L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. **Molecular and Cellular Biology**, v.23, n.15, p.5293-5300, 2003.
- WIELSHER, M.; LIOU, W.; PULVERER, W.; SINGER, C.F.; RAPPAPORT-FUERHAUSER, C.; KANDIOLER, D.; EGGER, G.; WEINHAUSEL, A. Cytosine 5-Hydroxymethylation of the *LZTS1* Gene Is Reduced in Breast Cancer. **Translational Oncology**, v.6, n.6, p.715–21, 2013.
- WIKLUND, E.D.; GAO, S.; HULF, T.; SIBBRITT, T.; NAIR.; COSTEA, D.E.; KROGDAHL, A. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. **Plos One**, v.61, n.1, 2011.
- WILHELM, C.S.; KELSEY, K.T.; BUTLER, R.; PLAZA, S.; GAGNE, L., et al. Implications of *LINE1* methylation for bladder cancer risk in women. **Clinical Cancer Research**, v.16, n.5, p.1682–9, 2010.
- WOJCIECHOWSKI, M.; RAFALSKI, D.; KUCHARSKI, R.; MISZTAL, K.; MALESZKA, J.; BOCHTLER, M.; MALESZKA, R. Insights into DNA hydroxymethylation in the honeybee from in-depth analyses of TET dioxygenase. **Open Biology**, v.4, n.8, p.140110, 2014.
- WU, H.; D'ALESSIO, A.C.; ITO, S.; WANG, Z.; CUI, K.; ZHAO, K.; ZHANG, Y. Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. **Genes & Development**, v.25, n.7, p.679–84, 2011.
- WU, H.; ZHANG, Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. **Genes & Development**, v.25, n.23, p.2436-2452, 2011.
- XI, S.; XU, H.; SHAN, J.; TAO, Y.; HONG, J.A.; INCHAUSTE, S.; SCHRUMP, D.S. Cigarette smoke mediates epigenetic repression of *miR-487b* during pulmonary carcinogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.123, n.3, p.1241, 2013.
- XIONG, J.; JIANG, H.P.; PENG, C.Y.; DENG, Q.Y.; LAN, M.D.; ZENG, H.; ZHENG, F.; FENG, Y. Q.; YUAN, B.F. DNA hydroxymethylation age of human blood determined by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/mass spectrometry. **Clinical Epigenetics**, v.7, n.1, p.72, 2015.
- YANG, H.; LIU, Y.; BAI, F.; ZHANG, J.Y.; MA.; S.H.; LIU, J.; GUAN, K.L. Tumor development is associated with decrease of *TET* gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. **Oncogene**, v.32, n.5, p.663–669, 2013.
- YANG, I. V.; SCHWARTZ, D. A. Epigenetic mechanisms and the development of asthma. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.130, n.6, p.1243-55, 2012.
- YANG, Q.; WU, K.; JI, M.; JIN, W.; HE, N.; SHI, B.; HOU, P. Decreased 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) is an independent poor prognostic factor in gastric cancer patients, **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.9, n.9, p.1607–16, 2013.
- YU, M.; HON, G.C.; SZULWACH, K.E.; SONG, C.X.; ZHANG, L.; KIM, A.; MIN, J.H. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. **Cell**, v.149, n.6, p.1368–80, 2012.

ZAGHLOOL, S. B.; AL-SHAFAI, M.; AL MUFTAH, W. A.; KUMAR, P.; FALCHI, M.; SUHREL, K. Association of DNA methylation with age, gender, and smoking in an Arab population. **Clinical Epigenetics**, v.7, p.6, 2015.

ZHANG, H.; QI, M.; LI, S.; QI, T.; MEI, H.; HUANG, K.; ZHENG, L.; TONG, Q. microRNA-9 targets matrix metalloproteinase 14 to inhibit invasion, metastasis, and angiogenesis of neuroblastoma cells. **Molecular Cancer Therapy**, v.11, n.7, p.1454–66, 2012.

ZHU, X.; LI, Y.; SHEN, H.; LI, H.; LONG, L.; HUI, L.; XU, W. *miR-137* inhibits the proliferation of lung cancer cells by targeting Cdc42 and Cdk6. **FEBS Letters**, v.587, n.1, p.73–81, 2013.

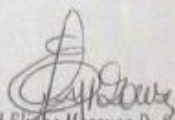
ANEXO I- CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 5ª Reunião realizada no dia 22/05/2014, o Projeto de pesquisa intitulado: **“EFEITO DO TABAGISMO SOBRE MARCAS EPIGENÉTICAS EM CÉLULAS BUCAIS”** da pesquisadora Naila Francis Paulo de Oliveira. Protocolo 0136/12. CAAE: 02886912.1.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Drª Gláucia Marques D. Sousa
Coordenadora CEP/CCS/UFPB
Mat. SIAPE: 0332618

ANEXO II- ARTIGO SUBMETIDO NO PERIÓDICO ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

Decision on Your Submission AOB-D-15-00694 (3) [Pessoas](#) ★

Archives of Oral Biology Mar 17 em 12:30 AM ★
<ees.aob.0.37ffb9.02cef734@eesmail.elsevier.com>
Para naila_francis@yahoo.com.br

Ref: AOB-D-15-00694
Title: INFLUENCE OF SMOKING ON METHYLATION AND
HYDROXYMETHYLATION LEVELS IN GLOBAL DNA AND SPECIFIC SITES OF
KRT14, KRT19, MIR-9-3 AND MIR-137 GENES OF ORAL MUCOSA
Archives of Oral Biology

Dear Prof. de Oliveira,

We have considered the reviewers comments on your manuscript, and I am pleased to tell you that your paper may be acceptable for publication in the Archives of Oral Biology, but requires revision and further review.

I enclose reviewers comments which I hope are helpful, and we invite you to submit a revised manuscript, taking these into account. Should you wish to undertake the revisions/alterations please resubmit by logging onto EES with changes highlighted.

In addition please provide a list of points describing how you have responded to the reviewers and editor's suggestions and a note indicating that all authors have seen and approved the changes. You will see in your menu items that your paper has been moved to the 'Submissions Needing Revision' category.

Please resubmit your revised manuscript here. If you do not wish to proceed, please let us know in order to complete our records. The maximum time allowed for revision is 4 weeks.

**INFLUENCE OF SMOKING ON METHYLATION AND
HYDROXYMETHYLATION LEVELS IN GLOBAL DNA AND SPECIFIC SITES
OF *KRT14*, *KRT19*, *MIR-9-3* AND *MIR-137* GENES OF ORAL MUCOSA**

LUDIMILA DE ARAÚJO COSTA^{1#}, ISABELLE CRISTINA BORBA DA SILVA^{2#}, BRUNO AUGUSTO LINHARES ALMEIDA MARIZ², MIKAELLY BATISTA DA SILVA¹, GLÁUCIA MARQUES FREITAS-RIBEIRO², NAILA FRANCIS PAULO DE OLIVEIRA^{1,2,3*}

These authors contributed equally to the study

¹ Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB-Brazil

² Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB-Brazil

³ Programa de Pós Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB-Brazil

*Corresponding Author:

Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Departamento de Biologia Molecular

Cidade Universitária – Campus I

João Pessoa-PB

Brazil

CEP 58051-900

Phone: +55 83 3216-7643

naila_francis@yahoo.com.br

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the influence of smoking on the methylation and hydroxymethylation status of global DNA and specific sites of *KRT14*, *KRT19*, *miR-9-3* and *miR-137* genes in the healthy oral mucosa. *Methods:* Samples of oral epithelial cells were collected using mouthwash from a population of former and current smokers and those who had never smoked. Genomic DNA was extracted, and global DNA methylation and hydroxymethylation was performed using an ELISA-based technique; DNA methylation at specific sites was performed using Methylation-Specific PCR (MSP) (*KRT14*, *miR-9-3* and *miR-137*) or Methylation-Sensitive Restriction Enzymes (MSRE) (*KRT19*). K14 and K19 protein expression was analysed by immunohistochemistry. *Results:* Higher levels of global DNA methylation were found in current smokers with over 15 years of consumption ($p=0.04$), but no differences were found in relation to global DNA hydroxymethylation. No differences in global DNA methylation and hydroxymethylation levels were found in relation to age or gender. Global DNA methylation was higher than the hydroxymethylation level ($p<0.001$) but they were not correlated in the oral mucosa. For specific sites, *miR-9-3* hypomethylation was detected in current smokers ($p<0.001$). Additional analysis showed no difference in the methylation status when age, gender, period of consumption or amount of cigarettes were considered for any of the studied genes. K19 expression was higher in current smokers in comparison to former smokers and those who had never smoked ($p<0.05$). *Conclusion:* We concluded that smoking habits were capable of inducing changes in global DNA methylation, *miR-9-3* methylation status and K19 expression.

Keywords: epigenetic, methylation, hydroxymethylation, smoking, microRNA, oral mucosa

1. Introduction

The World Health Organization (WHO) considers smoking a major public health problem worldwide because it is the leading cause of preventable death and leads to the development of oral and lung cancer and cardiovascular complications.¹ Identifying molecular pathways that contribute to the delay between exposure and disease may offer opportunities to target diagnostic and therapeutic interventions. The ability of tobacco smoking to induce changes in DNA molecules has been investigated, including in epigenetic studies.²

Epigenetic information is that which, other than the DNA sequence, is faithfully replicated upon somatic cell replication. This is carried out by DNA methylation, post-translational histone modification and non-coding RNAs, all of which are related to gene expression and chromatin structure. DNA methylation is characterised by the addition of a methyl group in cytosines within CpG dinucleotides by DNMTs (DNA methyltransferases) and can modify gene transcription, leading to decreased expression or even gene silencing.³ Global DNA hypomethylation and aberrant hypermethylation in tumour suppressor genes represents one of the main mechanisms associated with gene inactivation and often occurs in cancer.⁴ Altered methylation profiles have also been reported in oral inflammatory diseases.^{5,6}

5-Hydroxymethylcytosine (5-hmC), a hydroxylated and methylated form of cytosine, is a novel DNA modification revealed. The conversion of 5-mC (5-methylcytosine) to 5-hmC that occurs through the action of TET (ten-eleven translocation) enzymes is a step prior to demethylation⁷ and seems to play a direct role in the regulation of gene expression.⁸ Little is known about the biological role of 5-hmC in sickness and health or whether 5-hmC levels may be influenced by intrinsic and extrinsic factors, but a recent study showed that the hydroxymethylation profile can be a potential biomarker for environmental exposure.⁹

Epithelial tissue acts as a protective barrier against damage caused by chemical, physical and biological agents and is essential to the survival of an organism. To perform this function, epithelial keratinocytes undergo a defined program of differentiation that results in the expression of structural proteins that maintain the integrity and function of the tissue. The proteins, called keratins, are the main components of the cytoskeleton of epithelial tissue. The family of keratins has the largest number of gene members (*KRT*) in humans with 54 distinct functional genes: 31 epithelial keratins (cytokeratins), 15 specific hair keratins, and eight keratins of the inner root sheath.¹⁰ Among the most powerful tumour markers, cytokeratins exhibit specific distribution for each epithelium subtype, allowing them to be used as

important markers of differentiation. Antibody-specific keratins are routinely used in laboratories for the diagnosis of tumours in the process of immunohistochemistry.¹¹ In fact, cytokeratin 14 and 19 (K14 and K19) expression has been shown to be deregulated in oral squamous cell carcinoma (SCC).¹²

MicroRNAs (miRNAs) are 19 to 25 nucleotide non-coding RNAs that regulate gene expression either by translational inhibition or by degradation of target mRNAs.¹³ Computational algorithms for miRNA target gene prediction have revealed that each miRNA family can target more than 200 different mRNAs.¹⁴ They can act as oncogene or tumour suppressors depending on the cell type in which they are expressed,¹⁵ and assume an important role in silencing of genes involved in cell proliferation, differentiation, apoptosis and carcinogenesis.¹³

In particular, the *miR-9* family (*9-1*, *9-2* and *9-3*) and *miR-137* are interesting because they have already been shown to be associated with various cancer types,¹⁶ including oral cancer.^{17,18} Although the capacity of exposure to toxic agents to influence miRNA expression has been investigated,^{19,20} the capacity of these agents, particularly cigarette smoke, in causing changes in the methylation profile of these genes is still unexplored.

Based on these facts, the aim of this study was to investigate the influence of smoking on global DNA methylation and hydroxymethylation status, on the DNA methylation status of specific sites of *KRT14*, *KRT19*, *miR-9-3* and *miR-137* genes and on K14 and K19 protein expression in healthy oral mucosa, in an attempt to find changes in the epigenetic and protein status that could be used as markers of smoking-related changes.

2. Materials and Methods

2.1 Ethics statement and subject population

The study was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Paraiba, Brazil (UFPB) (protocol number 0136/2012). All volunteers were attended in the Clinics of the Dental School at UFPB, and provided written informed consent. Inclusion criteria included subjects > 30 years old with good general health. Subjects' smoking habits and general health were recorded via questionnaire. The total number of participants was 95 and were divided into three groups, according to smoking habit: (1) those who had never smoked, (2) current smokers (volunteers who had consumed 5 cigarettes/day for at least

5years) and (3) former smokers (volunteers who had consumed 5 cigarettes/day for at least 5 years and had quit at least 5 years previously). Exclusion criteria included volunteers with any systemic disorder and volunteers who had used systemic antibiotics or anti-inflammatory medication in the six months prior to recording the baseline assessment. Individuals with a history of oral cancer, as well as individuals with clinical signs of any visible change in the location evaluated, were also not included.

2.2 Sample collection

Epithelial cells of the oral mucosa were collected by mouthwash with 10 mL of 3% dextrose, centrifuged at 3000 rpm for 10 min and then washed with 5 mL phosphate buffered saline (PBS) at 3000 rpm for 10 min.²¹ Afterward, 20 μ L was used to prepare smears on salinised slides (four smears per patient) that were air dried and then fixed with a spray of absolute ethanol and propylene for 5 min. Prior to execution of the smear, a circle (diameter 1.5 cm) was drawn in the centre of the slides with a PAP pen (Dako Corp.) to select the area for smear and antibody application to avoid losses. Slides were then frozen at -80°C until one week before the protocol for protein detection.²² With the remaining sample, DNA was purified using 8 M ammonium acetate and 1 mM EDTA as previously described.²³ DNA samples were then frozen at -20°C until global and specific DNA methylation analysis.

2.3 Global DNA methylation and hydroxymethylation analysis

Global DNA methylation and hydroxymethylation levels were assessed with an ELISA-based technique. Briefly, wells were coated with 50 ng of DNA diluted in Coating solution. The methylated and hydroxymethylated fraction of DNA was detected separately using capture of the respective monoclonal antibodies (5mC – dilution 1:125 (Merck Millipore); 5hmC – dilution 1:2000 (Epigentek)). Coating, Wash, Stop and Blocking Solutions and antibody detection were provided in the Protein Detector ELISA Kit™ (KPL Inc.) and used according to the manufacturer's recommendations. The optical density was read at 405 nm using a Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Levels of 5-mC or 5-hmC in DNA were measured as the percentage of methylated or hydroxymethylated cytosines in total DNA content (%5-mC and %5-hmC) relative to standard DNA (5-Methylcytosine & 5-Hydroxymethylcytosine DNA Standard Set, Zymo Research).²⁴ All samples and methylated/hydroxymethylated standards were measured in duplicate, and the average reported.

2.4 DNA methylation analysis at specific sites of *KRT14*, *KRT19*, *miR-9-3* and *miR-137* genes

Methylation-specific PCR (MSP) was performed to evaluate the DNA methylation status for *KRT14*, *miR-9-3* and *miR-137* genes. Bisulphite modification of genomic DNA (800 ng) was performed with the CpGenome™ Turbo Bisulfite Modification Kit (Merck Millipore), according to the manufacturer's instructions. After modification, each MSP reaction incorporated 100 ng of bisulphite-modified DNA, 1 µL (10 µM) of each primer and 1 × GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega Corporations, Madison, WI, USA) in a final reaction of 25 µL. Fragments were amplified with specific primers for either methylated or unmethylated targets as previously described (Table 1).^{25,26,27} Methylated (Methylated Control DNA, Sigma Aldrich) and unmethylated (CpGenome Universal Unmethylated DNA, Merck Millipore) DNA were modified, as previously described, and amplified by PCR as control reactions with primers for the methylated and unmethylated conditions, respectively.

Methylation-sensitive restriction enzyme (MSRE) analysis was performed to evaluate the DNA methylation status for the *KRT19* gene. Genomic DNA (100 ng) was completely digested with the restriction enzyme (*HpaII*) in a total volume of 20 µL, as recommended by the manufacturer (New England Biolabs, Ipswich, MA). After digestion, 4 µL (20 ng) of each solution was pipetted into a 15 µl PCR mixture containing 7.5 µl GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI), and 1 µl (10 µM) of each primer. Fragments were amplified with specific primers as previously described.²⁵ The non-enzyme-treated control DNA sample was always amplified with the primers in parallel with the enzyme-treated samples and both were subjected to electrophoresis in adjacent lanes. This provided a positive control for the PCR reaction and for DNA loading.

All reactions were performed in duplicate, and amplified PCR samples (10 µL MSP and 5 µL MSRE) were loaded onto 6% polyacrylamide gels and subjected to electrophoresis. DNA bands were detected after silver staining.

2.5 Protein expression analysis

Analysis of protein expression was performed by immunohistochemistry based on the avidin-biotin method with immunoperoxidase staining. First, the fixed slides were permeabilised with 0.5% Triton X in PBS for 15 min to improve penetration to the antibodies. To retrieve antigens, the slides were incubated with 10 mM citric acid monohydrate, pH 6.0, in a microwave oven for 15 min (3 cycles of 5 min each) at 700 W.²² K14 (LL001 mouse sc-

53253, dilution 1:40) and K19 (A53-B/A2 IGG2A sc-6278, dilution 1:40, Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA) monoclonal antibodies were incubated at 4 °C overnight. The inhibition of endogenous peroxidase, application of secondary antibodies and tertiary complex and revelation with diaminobenzidine were performed by ImmunoCruz goat LSAB Staining System sc-2053 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The slides were counterstained with Mayer's haematoxylin. All reactions included negative and positive controls and were performed in duplicate. The positive controls were paraffin sections histopathologically diagnosed as oral SCC, kindly provided by the Laboratory of Oral Pathology II (Department of Clinical and Social Dentistry, Centre for Health Sciences, UFPB). Slides were analysed by light microscopy at 40× magnification. The percentage of marked cells (brown cytoplasm indicates immunohistochemical localization of K14 or K19) was performed in five random fields, defined by the extension of the ocular micrometric scale coupled to the 10x ocular, equivalent to 300 µm in extension and objective of 40x. The average percentage of total fields were calculated. The slides were analysed by two calibrated observers (k=1).

2.6 Statistical analysis

Differences in global DNA methylation and hydroxymethylation between groups were evaluated by ANOVA. Differences between global DNA methylation and hydroxymethylation in the oral mucosa were assessed by the Mann-Whitney test, and Spearman's correlation test was used for correlation analysis. Additional analysis to evaluate the influence of age, gender, cigarette smoking period and the amount of cigarettes smoked was performed by *t*-test. To evaluate differences in DNA methylation at specific sites between groups a chi-squared test was used. The protein expression profile was evaluated by ANOVA. For additional analysis to evaluate the influence of age, gender, cigarette smoking period and the amount of cigarettes smoked on the specific methylation profile, we used a chi-squared test. All analyses were performed using Bioestat 5.0 software (Pará, Brazil) at a 5% significance level.

3. Results

Demographic data are shown in Table 2.

3.1 Global DNA methylation and hydroxymethylation

Table 3 shows the data obtained for global DNA methylation and hydroxymethylation levels in the oral mucosa. No differences were found for either 5-mC or 5-hmC levels between former and current smokers and those who had never smoked. However, differences were found in the 5-mC levels in relation to the period of cigarette consumption ($p=0.04$) but not for the amount of cigarettes smoked. No significant differences were found regarding age or gender. In relation to 5-mC and 5-hmC levels in the oral mucosa, it was found that 5-mC levels were higher in comparison to 5-hmC levels ($p<0.001$), but no significant correlation was found between levels of 5-mC and 5-hmC.

3.2 DNA methylation at specific sites (*KRT14*, *KRT19*, *miR-9-3* and *miR-137*) and protein expression (*K14* and *K19*)

Partial DNA methylation was considered when volunteers were positive for both methylated and unmethylated conditions (MPS) or when band intensities of enzyme-digested and non-enzyme-digested samples were clearly different (MSRE), indicating that DNA methylation in CpG did not occur in all cells or in all of the alleles.

We analysed DNA methylation and protein expression of K14 and K19 of oral epithelial cells obtained by mouthwash, which provided a large amount of cells. We separated some of them for protein analysis and the remainder for DNA analysis; thus, the analyses were performed from cells collected together.

Cytokeratin 14 – For DNA methylation analysis, no differences were found between groups, and the methylated condition was found to be the most frequent. For protein expression, we also observed no differences between the groups, and the average percentage of marked cells was 51.4, 53.7 and 53.5 for current and former smokers and those who had never smoked, respectively (Fig. 1).

Cytokeratin 19 – For DNA methylation analysis, no differences were found between groups, and the partially methylated condition was found to be the most frequent. For protein expression, the percentage of marked cells was 73.7, 53.7 and 39.2 for current and former smokers and those who had never smoked, respectively, and we found differences between current smokers and those who had never smoked ($p<0.05$) (Fig. 2).

miR-9-3 – significant differences between the groups were detected, and the unmethylated condition was found to be more frequent in current smokers in comparison to former smokers and those who had never smoked ($p < 0.001$) (Fig. 3).

miR-137 – no differences were found between the groups, and the partially methylated DNA condition was found to be the most frequent (Fig. 4).

4. Discussion

Smoking has been associated with changes in the DNA methylation profile of several genes and tissues.²⁸ Surprisingly, few epigenetic studies have been done with oral cells, which are the first to suffer from cigarette toxins. In light of this, we recently showed changes in the DNA methylation profile of cancer-related genes in the oral mucosa.²⁹ The exposed cells may acquire malignancy and result in squamous cell cancer. Malignancy detected early, however, results in less suffering and a lower health risk to the patient as well as lower health expenses.

4.1 Global DNA methylation and hydroxymethylation

In the present study, a higher global DNA methylation level was found in current smokers who had smoked for more than 15 years. Teschendorff et al.³⁰ have already shown, on a genome-scale level, a ‘smoking index’ where 1501 smoking-associated CpG sites (912 CpG sites hypermethylated) were detected in a buccal set. In addition, it was correlated with DNA methylation changes in epithelial cancer. Wan et al.³¹ showed seven CpG sites associated with current smoking, and correlations between cumulative smoke exposure and time since smoking cessation were observed in a subset of the significantly associated CpG sites. In the present study, we detected differences in relation to the period of cigarette consumption (more than 15 years) ($p = 0.04$) but not for the amount of cigarettes smoked.

In relation to age and gender, no differences were detected. A previous study has also shown that age and gender do not influence global DNA methylation levels in oral cells.²⁴ Godderis et al.,³² studying blood and saliva, did not observe significant differences in global DNA methylation levels between males and females either.

In relation to hydroxymethylation, to the best of our knowledge this is the first study to report levels of global DNA hydroxymethylation in smoking-exposed oral cells, and no differences were found between current smokers and those who had never smoked. Studies

focusing on the influence of environmental factors on the DNA global hydroxymethylation profile are unexplored, but a recent study showed that exposure to arsenic is associated with changes in these levels in blood cells.⁹ DNA hydroxymethylation change was detected in some tumours³³ but in oral cancer is currently unknown. Hydroxymethylation at CpG sites via TETs is shown to contribute to gene transcription by generating demethylated DNA and therefore it, as well as DNA methylation, also contributes to the regulation of gene expression.^{7,8}

According to a previous study with oral cells,³² it was detected that 5-mC levels were significantly higher in comparison to 5-hmC levels ($p < 0.001$). However, no correlation was detected between levels of 5-mC and 5-hmC, in contrast to a previous study.³² It has been proposed that the balance between 5-mC and 5-hmC levels is involved in the balance between cellular pluripotency and lineage commitment,³⁴ but the health implications of the relationship are currently unknown. The studies that have found associations between the levels of the two bases, support the hypothesis that the 5-hmC acts as an intermediary of active demethylation of 5-mC. However, in the present study it was not detect correlation between these two bases, and this may be due to the fact that oral epithelial cells obtained by mouthwash are mostly cells in cell death process (exfoliated oral epithelial cells) and thus the active demethylation process performed by TET enzymes is committed, leading an "imbalance" in the correlation between the two bases. In addition, 5-hmC level is also regulated by microRNAs, by targeting TET proteins and other components of the demethylation pathway³³. Most of the RNAs are degraded in oral exfoliated epithelial cells.³⁵ However, inconsistencies can also be observed in studies with blood cells, in which some authors have found some correlation⁹ and others have not.²⁹ We have already detected correlation in skin tissue (unpublished data), but not in oral cells. Inconsistencies across studies evaluating global methylation and hydroxymethylation can be explained by random sampling variability, differences in residual confounding, study design and population exposure levels.

It is known that the methylation profile of both global and site-specific DNA is influenced by aging.^{36,37} Currently, global DNA hydroxymethylation is being characterised as a strong and reproducible trademark of chronological age, with potential for use in assessment of health and disease prevention.³⁸ It was recently reported that the level of hydroxymethylation in peripheral blood T cells and hepatic tissue is dependent on age and is associated with gradual decrease of TET3 expression levels.^{39,40} However, in our study, we detected no influence of age on DNA global methylation and hydroxymethylation levels in

the oral mucosa (Table 1). Age-related DNA methylation changes at specific sites in oral epithelial mucosa have been detected,³⁶ and for epithelial cells of skin tissue it has been suggested that age-related changes are more pronounced at specific sites than in the global DNA profile.⁴¹

4.2 DNA methylation at specific sites

Although the global DNA methylation profile may indicate important changes in the epigenome, gene-specific hypermethylation of suppressor tumoral genes represents one of the most consistent markers of tumorigenesis,³ and those changes observed in non-tumour cells can be a powerful biomarker indicating that the cell may be undergoing a malignant process. In fact, smoking has been associated with changes in the DNA methylation profile of several genes and tissues,²⁸ but few studies have shown this association in buccal cells.

Keratin superfamily proteins are well established as important tumour markers because they are specific to each epithelium subtype and score the state of differentiation.¹¹

Cytokeratin 14 – the CpG site studied is located in exon 1, as previously described.²⁵ The methylated condition was found to be common in healthy oral epithelial tissue because no differences were found between the groups. Studies have shown that methylation is observed more frequently in regions where there are no CpG islands, as opposed to regions where, in the presence of CpG islands, the CpG sites are not methylated and play a crucial role in the regulation of gene transcription.³ However, we cannot neglect analysis of the DNA methylation status in promoters containing sparse CpG sites or CpG sites located in exon regions, because it has been shown that changes in those CpG sites may be involved in gene regulation.^{5,42} *KRT14* methylation has been found to be a common event in skin cells too.²⁵ In relation to K14 expression, our data show that smoking does not change the K14 expression profile; the average of marked cells is around 50% (Fig. 1). Donetti et al.⁴³ also showed, from biotical fragments obtained from the gingival mucosa from non-smokers and smokers, that the expression of K14 did not vary between the groups; immunolocalisation confirmed the expression of K14 in basal keratinocytes and only slightly in the suprabasal cells for both smokers and non-smokers. In contrast, a study revealed overexpression in the suprabasal layers as early as 3 h after smoke exposure in cell culture.⁴⁴ K14 expression changes were found in patients with oral dysplasia and cancer.¹² DNA methylation results for *KRT14* did not correlate with protein expression, since the most frequent pattern was methylated for all

groups and it was detected K14 expression at around 50%. It is possible that other CpG sites may be involved in regulating the expression of that gene.

Cytokeratin 19 – the CpG site studied is located in exon 1, as previously described.²⁵ The partially methylated condition is apparently common in healthy oral epithelial tissue, because no differences were found between groups. *KRT19* hypermethylation of tumour cell lines has been shown in renal cancer but this has not been confirmed in samples from patients with renal cancer. However, in the same study, it was observed that *KRT19* expression is epigenetically regulated.⁴⁵ In relation to protein expression, Lima et al.²² showed upregulation of K19 in cells of the lateral border of the tongue; however, there was no analysis of former smokers. We wanted to know whether the oral cavity also presents a change in the K19 expression profile. We found that smoking habits alter the K19 expression profile, showing a higher average proportion of marked cells in current smokers in comparison to former smokers and those who have never smoked. Although there was no significant difference between current and former smokers, it is possible to observe a decreasing trend in the expression of K19 in former smokers compared to current smokers (Fig. 2). K19 expression has been found deregulated in patients with dysplasia and oral cancer.^{12,46-48} DNA methylation analysis for *KRT19* did not correlate with protein expression, since the most frequent pattern was partially methylated for all groups and K19 expression was higher in smokers. Thus, additional genetic and epigenetic mechanisms might be involved in the *KRT19* gene-altered expression in smokers, or other CpG sites may be involved in regulating the expression of that gene.

During their maturation, called terminal differentiation, oral keratinocytes migrate from the basal proliferative monolayer, gradually losing their replicating ability and modifying their cytokeatin synthetic profile and becoming progressively enriched with keratin bundles.⁴⁹ The K19 protein is detected in basal cells of normal oral stratified epithelia (mucosal epithelia); however, in pathological conditions such as dentigerous cysts and odontogenic keratocysts⁵⁰ or in cells exposed to carcinogens,⁵¹ this cytokeatin is also found in the superficial layer of the epithelium. Our study confirms the findings of Lima et al. because we also found a higher expression of K19 in the oral mucosa of smokers. They suggested that those findings indicate the onset of dysregulation of the epithelial maturation process and, since K19 is a well-known marker of proliferative keratinocytes, those data suggest a state of hyperproliferation.²² In samples of SCCs, a higher number and intensity of cells stained for K19 were found as the tumour became more undifferentiated. This is

important for the diagnosis of potentially malignant lesions and determination of the SCC differentiation level, and suggests its prospective application as a marker for subclassifying oral SCC.^{52,53}

MiRNAs are involved in various biological activities such as cell differentiation, proliferation mechanisms, apoptosis and cell cycle regulation.¹³ Studies have shown that the expression of several miRNAs can be modulated by tobacco cigarette.¹⁹ Also, it has been shown that *miR* gene family expression can be modulated by DNA methylation;⁵⁴ however, little is known about the influence of extrinsic factors on the DNA methylation status of *miR* genes. In particular, the *miR-9* family and *miR-137* have shown great potential as tools for molecular diagnostics because DNA methylation changes have been found in various cancer types,¹⁶ including oral cancer.^{17,18}

miR-9-3 – the CpG site studied is located in the promoter region, as previously described.²⁶ Hypomethylation was detected there in current smokers in comparison to former smokers and those who had never smoked (Fig. 3). *miR-9-3* hypermethylation has been shown as a specific biomarker for head and neck cancer, particularly related to carcinoma of the oral cavity and oropharynx.⁵⁵ In the same year, it was found that *miR-9-3* is specifically methylated in patients with non-small cell lung cancer.⁵⁶ Also, *miR-9-3* methylation was associated with decreased disease-free survival in patients with squamous cell lung cancer. Hypermethylation can silence tumour suppressor miRNAs, whereas DNA hypomethylation causes upregulation of putative oncogenic miRNAs (oncomirs- microRNA genes that act as oncogenes).¹³ In cancers, *miR-9* could be either oncomir or tumour-suppressor miRNA, depending on the type of cancer or tissue.^{57,58} As well as *miR-9* expression that may be either up- or downregulated in different stages of lung cancer, including the early stage of hyperplasia, DNA methylation status may also vary at different stages of malignant cell transformation,¹⁹ since this epigenetic mechanism regulates gene expression. Here we detected *miR-9-3* hypomethylation in non-malignant oral cells of smokers, in contrast with studies that showed hypermethylation in malignant oral cells. It is possible that hypomethylation may be, among others, an early event of transformation. However, other studies are need to confirm this hypothesis, because the present study was the first to show the methylation status of the *miR-9-3* gene in healthy oral cells of smokers, and a smoking-related change was found.

miR-137 – the CpG site studied is located in the promoter region, as previously described.²⁷ It was detected that partial methylation is a common event in oral cells, because no differences according smoking status were found. It was already shown in normal skin cells too.²⁵ *miR-137* methylation has been found in oral cancer,^{17,59} but some studies showed hypermethylation in both normal and tumour hepatic cells, suggesting tissue-specific but not tumour-specific miRNA methylation.⁶⁰ It is possible that the mechanism by which smoking contributes to the development of oral cancer may not stimulate aberrant methylation of these miRNAs.

Since the period of consumption and the number of cigarettes smoked can also influence the DNA methylation⁶¹ and protein expression profiles,²² we evaluated whether these aspects are associated with the studied profiles. We therefore classified the subjects into one of two categories based on the period of cigarette consumption (≤ 15 years and > 15 years) and in relation to number of cigarettes smoked (≤ 15 cigarettes/day and > 15 cigarettes/day). Our data revealed no significant differences regarding the period of consumption or number of cigarettes smoked for specific DNA methylation of any of the genes studied ($p > 0.05$, χ^2 test) or for protein expression analysis ($p > 0.05$, Mann-Whitney test).

Besides smoking habits, intrinsic factors such as age and gender are also associated with different DNA methylation and protein expression profiles between individuals.^{22,36,62} Here, the subjects were classified into one of two categories based on their age (≤ 40 years old and > 40 years old) and in relation to gender, independent of smoking status. Our data revealed no significant difference regarding age or gender for DNA methylation of any of the genes studied ($p > 0.05$; χ^2 test) or for protein expression analysis ($p > 0.05$; Mann-Whitney test).

We conclude that smoking induces increased global DNA methylation of oral cells in current smokers with over 15 years of consumption, but not for global DNA hydroxymethylation levels. At specific sites, only *miR-9-3* showed influence of smoking status. In addition, smoking habits were capable of inducing changes in K19 expression in non-malignant oral epithelial cells.

COMPETING INTERESTS

There is no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financial supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) (477542/2012-3) and Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal da Paraíba, Brazil. Ludimila A Costa and Mikaelly B da Silva were supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). Isabelle CB da Silva was supported Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq, Brazil). We thank Dr. Socorro Aragão, Coordinator of Laboratory of Oral Pathology II (Department of Clinical and Social Dentistry/CCS/UFPB) for kindly providing paraffin sections of oral squamous cell carcinoma, which we used as a positive control in this study.

Table 1. Primers sequences and DNA methylation analysis conditions for *KRT14*, *KRT19*, *miR-9-3* and *miR-137*.^{25,26,27}

Gene	Primer (3'-5') F/R	Fragment Size (bp)	Anneling Temperature (°C)	Cycles
<i>KRT14</i> (MSP)	tttagtttatgaagggttttgc (M) gaaaaataaaacaaacaaaccg (M)	137	47 (40 sec)	40
	ttagtttatgaagggttttgc (U) aaaaataaaacaaacaaacc (U)	135	48 (40 sec)	
<i>KRT19</i> (MSRE)	tgaagagtgggaggagatgg ggtggaccagatcaccaaag (<i>Hpa</i> II CpG site)	110	58 (40 sec)	35
<i>miR-9-3</i> (MSP)	attggtcgattttggattgac (M) cgctaaaaaacctcgaacg (M)	116	58 (1 min)	35
	gattggtgattttggattgat (U) caaaacacttaaaaaacctaaca (U)	116	55 (1 min)	
<i>miR-137</i> (MSP)	gcggtagtagtagcggtagc (M) accgcaccgaaaaaaaa (M)	86	58 (1 min)	40
	ggtgtagtagtagtgtagt (U) taccatcaccaaaaaaaaa (U)	86	51 (1 min)	

Table 2. Mean values and standard deviation for the demographic and behavioural data in studied population.

<i>Demography</i>	<i>Smoking Status</i>		
	Never (n=30)	Current (n=29)	Former (n=36)
Age (years) *	44.15 ± 10	47.4 ± 10.6	55.3 ± 11
Men (%)**	30	72.4	66.7
Women (%)	70	27.6	33.3
Cigarettes/day	-----	18.8 ± 10.9	23.5 ± 15.5
Cigarette consumption (years)	-----	24.3 ± 13.2	20 ± 12.2
Quitting smoking (years)	-----	-----	15.3 ± 8.7

*p<0.01; ANOVA, **p<0.05; χ^2 .

Table 3. Mean values and standard deviation for global DNA methylation and hydroxymethylation levels in studied population.

<i>Smoking status</i>							
Global DNA modification (%)	Never	Current	Former	Cigarette smoking time (years)		Amount of cigarettes smoked	
				≤ 15	>15	≤15	>15
DNA methylation	27.3 (±12)	32.2 (±14)	26.2 (±11)	25.9 (± 14)	37.9*	32.3 (±11)	25.5 (± 11)
DNA hydroxymethylation	13 (±4)	14.1 (±3)	14 (±3)	15.1 (± 3)	13.4 (± 3)	15.5 (± 3)	14.3 (± 3)
<i>Independent of smoking status</i>							
	Gender		Age				
	Male	Female	≤ 40	> 40			
DNA methylation	28.1 (±12)	28.4 (±13)	29.9 (±14)	28 (±12)			
DNA hydroxymethylation	13.5 (±3)	13.9 (±3)	13.5 (±3)	13.7 (±3)			

*p=0.04; T test, # p<0.001; Mann-Whitney

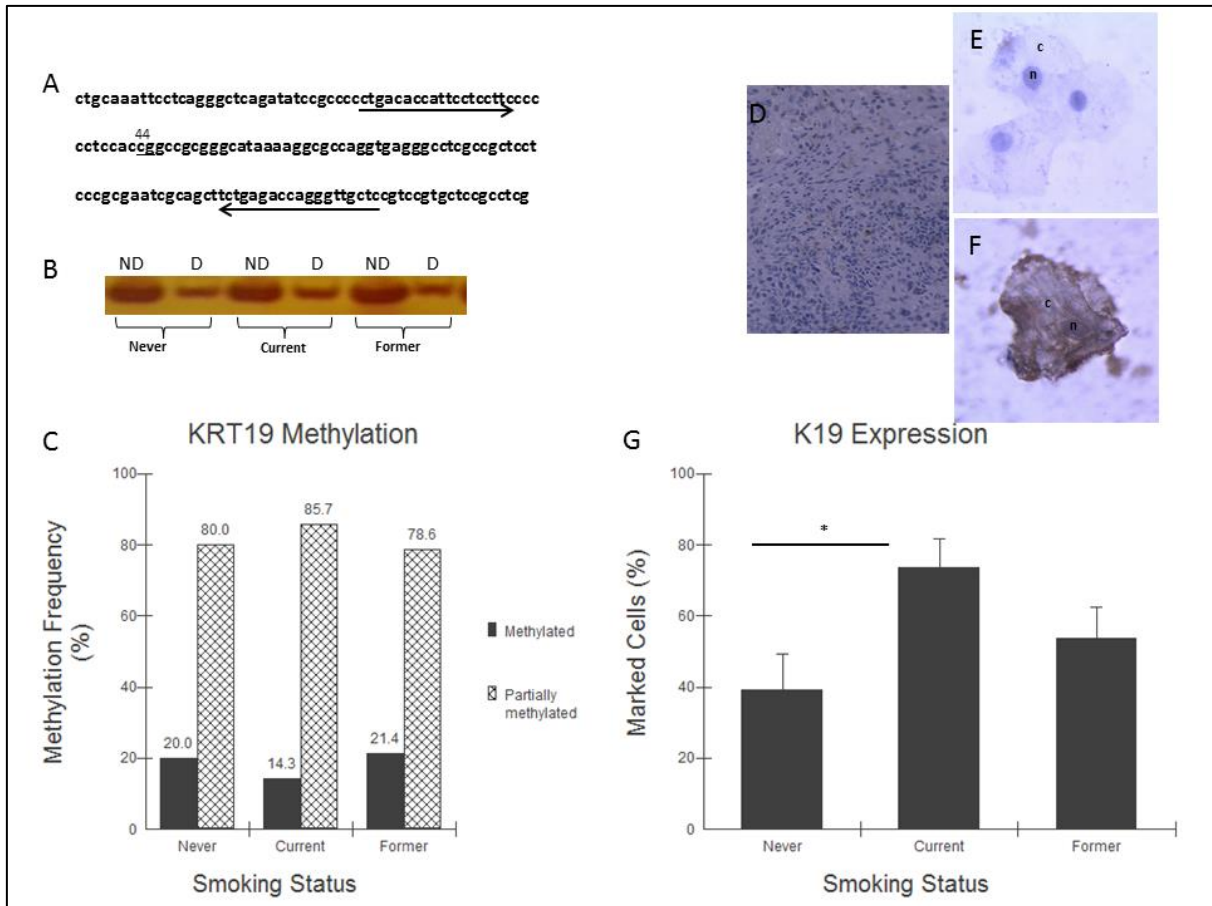


Figure 2- DNA methylation and protein expression of cytokeratin 19 in oral mucosa. **(A)** Partial genomic sequence of the *KRT19* exon 1 region is presented (GenBank accession number AF202321.1). The CpG site studied is presented. Primers regions are indicated by arrows. **(B)** Bands of representative samples of each group obtained after polymerase chain reaction of *KRT19* (110 pb); ND - non-digested DNA samples, and D - digested DNA samples. **(C)** Methylation frequency among groups ($p > 0.05$; χ^2). **(D)** Immunohistochemical localization of K19 in positive control (oral squamous carcinoma tissue- brown cytoplasm and blue nucleus). **(E)** Representative sample of oral epithelial cell not marked (blue cytoplasm (c) and blue nucleus (n)). **(F)** Immunohistochemical localization of K19 in representative sample of oral epithelial cell (brown cytoplasm (c) and blue nucleus (n)). (Original magnification $\times 100$). **(G)** K19 protein expression among groups ($p < 0.05$; ANOVA).

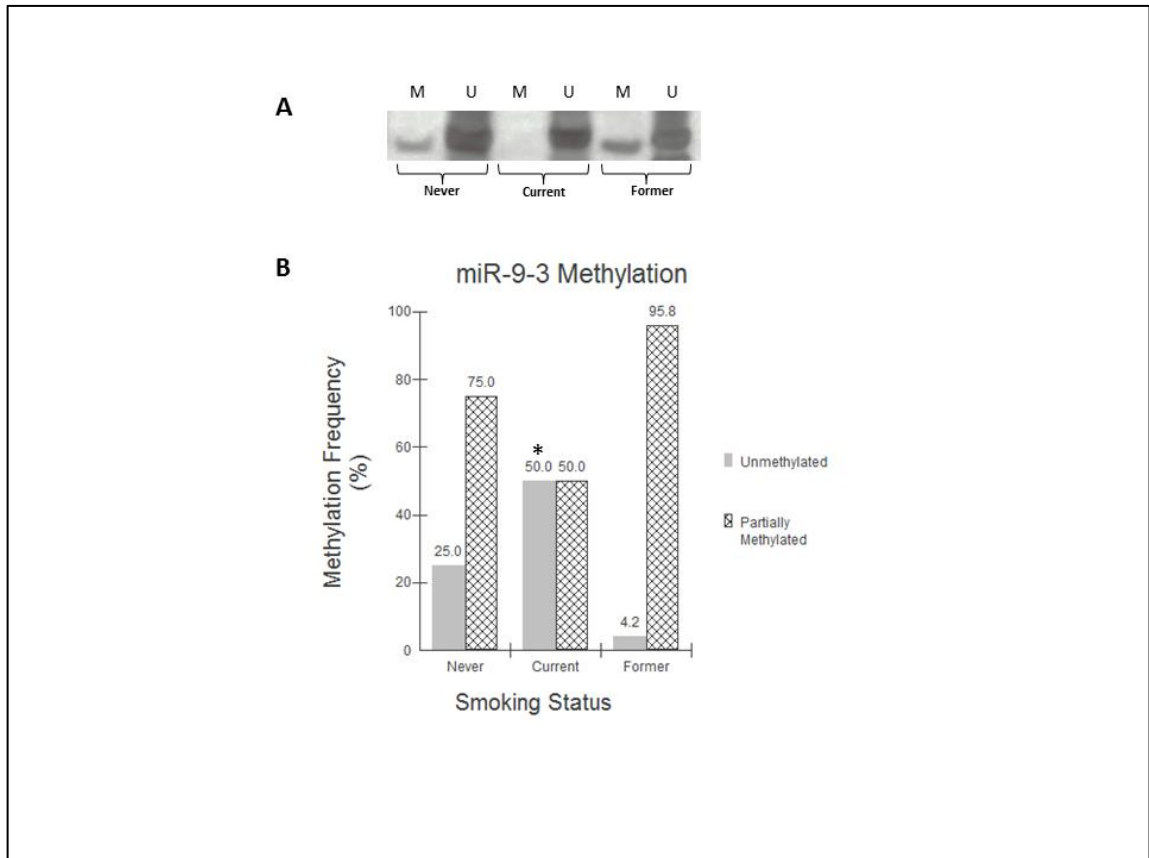


Figure 3 DNA methylation analysis of *miR-9-3* promoter in oral mucosa. **(A)** Bands of representative samples obtained after polymerase chain reaction (116 bp). **(B)** Methylation frequency (* $p < 0.05$; χ^2 test). M – methylated, U – unmethylated.

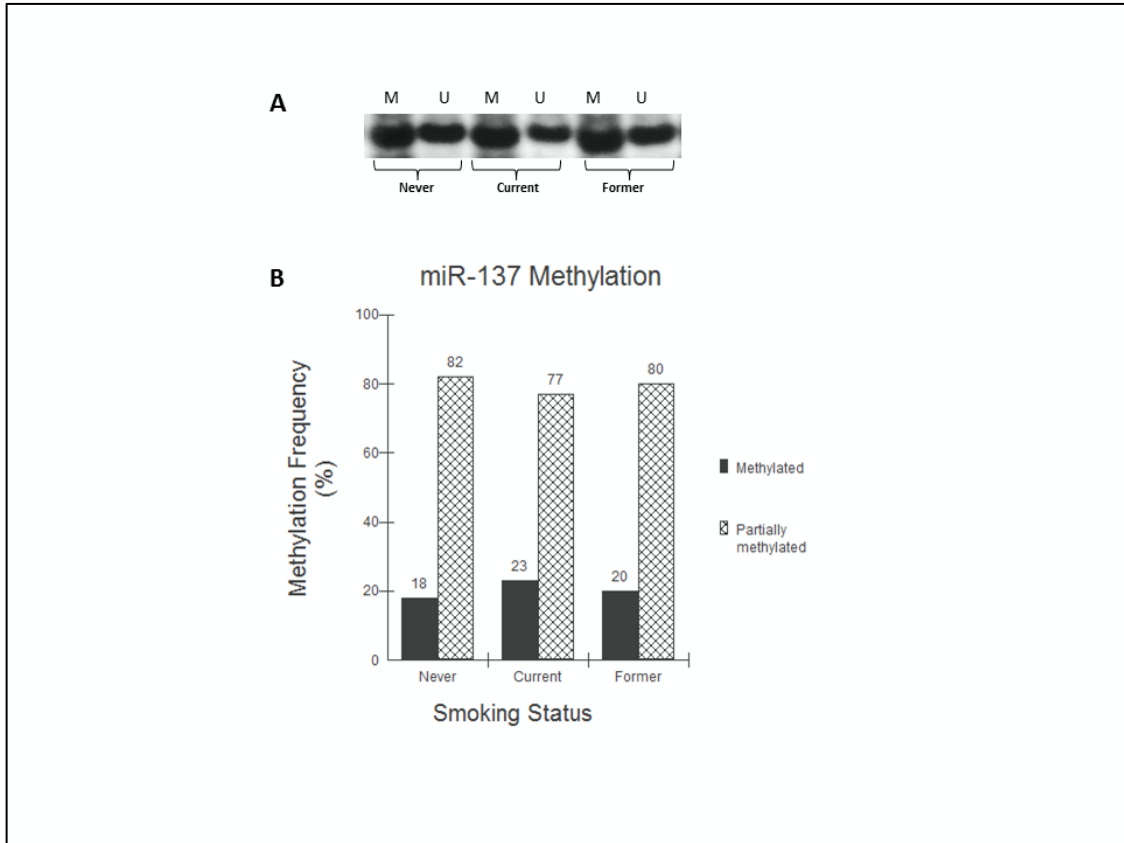


Figure 4 DNA methylation analysis of *miR-137* promoter in oral mucosa. **(A)** Bands of representative samples obtained after polymerase chain reaction (86 bp). **(B)** Methylation frequency ($p > 0.05$; χ^2 test). M – methylated, U – unmethylated.

REFERENCES*

1. La Torre G, Ferketich A, Grassi MC. Tobacco smoking: the evidence from prevention and cessation. *Biomed Res Int* 2014; 894208.
2. Philibert RA, Beach SR, Brody GH. The DNA methylation signature of smoking: an archetype for the identification of biomarkers for behavioral illness. *Nebr Symp Motiv* 2014; **61**: 109-127.
3. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; **28**: 1057-1068.
4. Fukushige S, Kondo E, Horii A. Methyl-CpG targeted recruitment of p300 reactivates tumor suppressor genes in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **379**: 1021-1026.
5. Oliveira NF, Damm GR, Andia DC, Salmon C, Nociti FH JR, Line SR, De Souza AP. DNA methylation status of the *IL8* gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; **369**: 719-725.
6. De Oliveira NF, Andia DC, Planello AC, Pasetto S, Marques MR, Nociti FHJr, Line SR, De Souza AP. *TLR2* and *TLR4* gene promoter methylation status during chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2011; **38**: 975-983.
7. Shen L, Wu H, Diep D, Yamaguchi S, D'Alessio AC, Fung HL, Zhang K, Zhang Y. Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. *Cell*. 2013; **153**: 692-706.
8. Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes & Development* 2011; **25**: 2436-52.
9. Tellez-Plaza M, Tang WY, Shang Y, Umans JG, Francesconi KA, et al. Association of global DNA methylation and global DNA hydroxymethylation with metals and other exposures in human blood DNA samples. *Environ Health Perspect* 2014; **122**: 946-54.
10. Hesse M, Zimek A, Weber K, Magin TM. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol* 2004; **83**: 19-26.
11. Knöbel M, O'Toole EA, Smith FJ. Keratins and skin disease. *Cell Tissue Res* 2015; **360**: 583-9.
12. Su L, Morgan PR, Lane EB. Keratin 14 and 19 expression in normal, dysplastic and malignant oral epithelia. A study using in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Oral Pathol Med* 1996; **25**: 293-301.
13. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; **5**: 522-31
14. Yue D, Liu H, Huang Y. Survey of computational algorithms for microRNA target prediction. *Curr Genomics* 2009; **10**: 478-92.
15. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; **23**: 175-205.
16. Koturbash I, Zemp FJ, Pogribny I, Kovalchuk O. Small molecules with big effects: the role of the microRNAome in cancer and carcinogenesis. *Mutat Res* 2011; **722**: 94-105.

17. Langevin SM, Stone RA, Bunker CH, Grandis JR, Sobol RW, Taioli E. *MicroRNA-137* promoter methylation in oral rinses from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with gender and body mass index. *Carcinogenesis* 2010; **31**: 864-70.
18. Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 2008; **68**: 2094-105.
19. Momi N, Kaur S, Rachagani S, Ganti AK, Batra SK. Smoking and microRNA dysregulation: a cancerous combination. *Trends Mol Med* 2014; **20**: 36-47.
20. Vrijens K, Bollati V, Nawrot TS. MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: a systematic review. *Environ Health Perspect* 2015; **123**: 399-411.
21. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000; **18**: 6-9.
22. Lima CF, Leite SF, Carvalho YR, Cabral LA, Balducci I, Almeida JD. Cytokeratin profile in exfoliative cytology of smokers. *Anal Quant Cytol Histol* 2011; **33**: 19-24.
23. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* 2007; **18**: 148-152.
24. De Arruda IT, Persuhn DC, de Oliveira NF. The *MTHFR* C677T polymorphism and global DNA methylation in oral epithelial cells. *Genet Mol Biol* 2013; **36**: 490-3.
25. Da Silva Melo AR, Barroso H, Uchôa De Araújo D, Ruidomar Pereira F, De Oliveira NF. The influence of sun exposure on the DNA methylation status of *MMP9*, *miR-137*, *KRT14* and *KRT19* genes in human skin. *Eur J Dermatol* 2015; **25**: 436-43.
26. Wang LQ, Kwong YL, Kho CS, Wong KF, Wong KY, et al. Epigenetic inactivation of *miR-9* family microRNAs in chronic lymphocytic leukemia - implications on constitutive activation of NFκB pathway. *Mol Cancer* 2013; **12**: 173.
27. Dang J, Bian YQ, Sun JY, et al. *MicroRNA-137* promoter methylation in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2013; **42**: 315-21.
28. Talikka M, Sierro N, Ivanov NV, Chaudhary N, Peck MJ, Hoeng J, Coggins CR, Peitsch MC. Genomic impact of cigarette smoke, with application to three smoking-related diseases. *Crit Rev Toxicol* 2012; **42**: 877-889.
29. De Oliveira SRL, Da Silva ICB, Mariz BALA, Pereira AMBC, De Oliveira NFP. DNA methylation analysis of cancer-related genes in oral epithelial cells of healthy smokers. *Arch Oral Biol* 2015; **60**: 825-833.
30. Teschendorff AE, Yang Z, Wong A, Pipinikas CP, Jiao Y, Jones A, Anjum S, Hardy R, Salvesen HB, Thirlwell C, Janes SM, Kuh D, Widschwendter M. Correlation of smoking-associated DNAmethylation changes in buccal cells with DNAmethylation changes in epithelial cancer. *JAMA Oncol* 2015; **1**: 476-85.
31. Wan ES, Qiu W, Carey VJ, Morrow J, Bacherman H, Foreman MG, Hokanson JE, Bowler RP, Crapo JD, DeMeo DL. Smoking-associated site-specific differential methylation in buccal mucosa in the *COPD* gene study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015; **53**: 246-54.
32. Godderis L, Schouteden C, Tabish A, Poels K, Hoet P, et al. Global methylation and hydroxymethylation in DNA from blood and saliva in healthy volunteers. *Biomed Res Int* 2015;

845041.

33. Kroeze LI, van der Reijden BA, Jansen JH. 5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1855**: 144-54.
34. Laird A, Thomson JP, Harrison DJ, Meehan RR. 5-hydroxymethylcytosine profiling as an indicator of cellular state. *Epigenomics* 2013; **5**: 655-69.
35. Klaassen I, Copper MP, Brakenhoff RH, Smeets SJ, Snow GB, Braakhuis BJ. Exfoliated oral cell messenger RNA: suitability for biomarker studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; **6**: 469-72.
36. Bezerra, SFO, Costa LA, Freitas PAN, De Oliveira NFP. Age-related changes in DNA methylation status of *hTERT* gene promoter of oral epithelial cells. *Brazilian Arch Biol Technol* 2015; **58**: 82-89.
37. Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* 2015; **14**: 924-932.
38. Xiong J, Jiang HP, Peng CY, Deng QY, Lan MD, et al. DNA hydroxymethylation age of human blood determined by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/mass spectrometry. *Clinical Epigenetics* 2015; **7**: 72.
39. Truong TP, Sakata-Yanagimoto M, Yamada M, Nagae G, Enami T, et al. Age-dependent decrease of DNA hydroxymethylation in human T cells. *J Clin Exp Hematop* 2015; **55**: 1.
40. Tammen SA, Dolnikowski GG, Ausman LM, Liu Z, Sauer J, Friso S, Choi SW. Aging and alcohol interact to alter hepatic DNA hydroxymethylation. *Alcohol Clin Exp Res* 2014; **38**: 2178-85.
41. Grönniger E, Weber B, Heil O, Peters N, Stäb F, Wenck H, et al. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *PLoS Genet* 2015; **6**: e1000971.
42. Dwivedi T, Zhang H. Lithium-induced neuroprotection is associated with epigenetic modification of specific *BDNF* gene promoter and altered expression of apoptotic-regulatory proteins. *Front Neurosci* 2015; **8**: 457.
43. Donetti E, Gualerzi A, Bedoni M, Volpari T, Sciarabba M, Tartaglia G, Sforza C. Desmoglein 3 and keratin 10 expressions are reduced by chronic exposure to cigarette smoke in human keratinised oral mucosa explants. *Arch Oral Biol* 2010; **10**: 815-823.
44. Gualerzi A, Sciarabba M, Tartaglia G, Sforza C, Donetti E. Acute effects of cigarette smoke on three-dimensional cultures of normal human oral mucosa. *Inhal Toxicol* 2012; **24**: 382-389.
45. Paiva F, Duarte-Pereira S, Costa VL, Ramalho-Carvalho J, Patrício P, Ribeiro FR, Lobo F, Oliveira J, Jerónimo C, Henrique R. Functional and epigenetic characterization of the *KRT19* gene in renal cell neoplasms. *DNA Cell Biol* 2011; **30**: 85-90.
46. Yamauchi K, Fujioka Y, Kogashiwa Y, Kohno N. Quantitative expression study of four cytokeratins and p63 in squamous cell carcinoma of the tongue: suitability for sentinel node navigation surgery using one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol* 2011; **64**: 875-879.
47. Jiang R, Gu X, Moore-Medlin TN, Nathan CA, Hutt-Fletcher LM. Oral dysplasia and squamous cell carcinoma: correlation between increased expression of CD21, Epstein-Barr virus and CK19. *Oral Oncol* 2012; **48**: 836-841.

48. García-Muñoz A, Bologna-Molina R, Aldape-Barrios B, Licéaga-Escalera C, Montoya-Pérez LA, Rodríguez MA. Identification of proteins with increased levels in ameloblastic carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2014; **72**: 1183-1196.
49. Adams D. Keratinization of the oral epithelium. *Ann R Coll Surg Engl* 1976; **58**: 351-358.
50. Kamath KP, Vidya M. Cytokeratin 19 expression patterns of dentigerous cysts and odontogenic keratocysts. *Ann Med Health Sci Res* 2015; **5**: 119-123.
51. Feng Y, Kang X, Li C, Nie M. Expression of cytokeratin 19 and connexin 43 in 4-nitroquinoline-l-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2013; **31**: 237-241.
52. Nie M, Zhong L, Zeng G, Li B. The changes of cytokeratin 19 during oral carcinogenesis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2002; **37**: 187-190.
53. Khanom R, Sakamoto K, Pal SK, Shimada Y, Morita K, Omura K, Miki Y, Yamaguchi A. Expression of basal cell keratin 15 and keratin 19 in oral squamous neoplasms represents diverse pathophysiologies. *Histol Histopathol* 2012; **27**: 949-959.
54. Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther* 2015; **6**: 1284-8.
55. Minor J, Wang X, Zhang F, Song J, Jimeno A, Wang XJ, Lu X, Gross N, Kulesz-Martin M, Wang D, Lu SL. Methylation of *microRNA-9* is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2012; **48**: 73-8.
56. Heller G, Weinzierl M, Noll C, Babinsky V, Ziegler B, Altenberger C, Minichsdorfer C, Lang G, Döme B, End-Pfützenreuter A, Arns BM, Grin Y, Klepetko W, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. Genome-wide miRNA expression profiling identifies *miR-9-3* and *miR-193a* as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 1619-29.
57. Tsai KW, Liao YL, Wu CW, Hu LY, Li SC, Chan WC, Ho MR, Lai CH, Kao HW, Fang WL, Huang KH, Lin WC. Aberrant hypermethylation of *miR-9* genes in gastric cancer. *Epigenetics* 2011; **6**: 1189-97.
58. Zhang H, Qi M, Li S, Qi T, Mei H, Huang K, Zheng L, Tong Q. *microRNA-9* targets matrix metalloproteinase 14 to inhibit invasion, metastasis, and angiogenesis of neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 2012; **11**: 1454-66.
59. Wiklund ED, Gao S, Hulf T, Sibbritt T, Nair S, Costea DE, Villadsen SB, Bakholdt V, Bramsen JB, Sørensen JA, Krogdahl A, Clark SJ, Kjems J. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2011; **6**: e27840.
60. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007; **67**: 1424-9.
61. Wangsri S, Subbalekha K, Kitkumthorn N, Mutirangura A. Patterns and possible roles of LINE-1 methylation changes in smoke-exposed epithelia. *PLoS One* 2012; **9**: e45292.
62. Thompson RF, Atzmon G, Gheorghe C, Liang HQ, Lowes C, Grealley JM, Barzilai N. Tissue-specific dysregulation of DNA methylation in aging. *Aging Cell* 2010; **9**: 506-518.