



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



MIKAELLY BATISTA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO SOLAR SOBRE O PERFIL DE METILAÇÃO E
HIDROXIMETILAÇÃO GLOBAL DE DNA E EM SÍTIOS ESPECÍFICOS NO
PROMOTOR DOS GENES *MIR-9-1*, *MIR-9-3* E *MTHFR* EM AMOSTRAS DE PELE
HUMANA**

João Pessoa – PB

2016

MIKAELLY BATISTA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO SOLAR SOBRE O PERFIL DE METILAÇÃO E
HIDROXIMETILAÇÃO GLOBAL DE DNA E EM SÍTIOS ESPECÍFICOS NO
PROMOTOR DOS GENES *MIR-9-1*, *MIR-9-3* E *MTHFR* EM AMOSTRAS DE PELE
HUMANA**

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

S586i Silva, Mikaelly Batista da.
Influência da exposição solar sobre o perfil de metilação e hidroximetilação global de DNA e em sítios específicos no promotor dos genes miR-9-1, miR-9-3 e MTHFR em amostras de pele humana / Mikaelly Batista da Silva.- João Pessoa, 2016.
58f. : il.
Orientadora: Naila Francis Paulo de Oliveira
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
1. Biologia celular e molecular. 2. Epigenética. 3. Metilação.
4. Hidroximetilação. 5. Radiação solar. 6. MTHFR.
7. MicroRNAs.

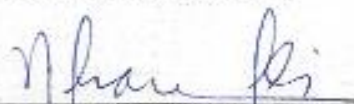
UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)

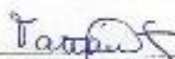
MIKAELLY BATISTA DA SILVA

Dissertação de Mestrado avaliada em 17/03/2016

BANCA EXAMINADORA



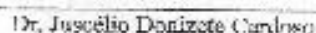
Prof.ª Dr.ª Naila Francis Paiva de Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Orientadora



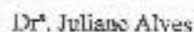
Prof.ª Dr.ª Tatiane Santi-Gudella
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna



Prof.ª Dr.ª Nathália de Alencar Cunha Tavares
Hospital Universitário Lauro Wanderley
Faculdade Maurício de Nassau
Examinadora Externa



Dr. Juscélio Donizete Cardoso
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Suplente Interno



Dr.º Juliano Alves
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal da Paraíba
Suplente Externo

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Marilúcia Sátiro da Silva e Edmilson Batista da Silva, sou eternamente grata pelos incentivos e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

A vitória desta conquista dedico com todo meu amor, unicamente, a vocês!!!

Se você é...

Se você é um vencedor,
terá alguns falsos amigos
e alguns amigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco,
as pessoas podem enganá-lo
Seja honesto e franco assim mesmo.

O que você levou anos para construir
Alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz,
As pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você,
mas isso pode nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você que, no final de tudo
Será você... e Deus.

E não você... e as pessoas!

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Senhor Jesus Cristo, pela força e coragem de sempre lutar e vencer as batalhas da vida.

Em especial...

À professora Naila Francis pela orientação e todo aprendizado, meu muito obrigado por ter aceitado me orientar e ter me auxiliado sempre que necessitei.

Aos meus pais que estiveram sempre comigo nesta caminhada, à minha irmã, meu cunhado e ao meu sobrinho, obrigado pelo apoio de sempre!

Ao meu avô que está me apoiando e torcendo lá de cima pela minha vitória. A minha vó, as minhas tias e primas.

As colegas do laboratório, Isabelle, Rayssa e Haline, agradeço a vocês por todo apoio, conselhos e aprendizado.

À amiga Ludimila que sempre me ajudou e compartilhou suas experiências e saberes, me ensinando e me aconselhando sempre, obrigado por tudo!

Ao meu amigo Djailton, agradeço pelo apoio e ajuda de sempre, obrigado!

Aos colegas da turma do mestrado agradeço pelos momentos de alegria, aprendizado e amizade.

Aos professores do mestrado por todo conhecimento adquirido.

Aos professores da banca examinadora pela contribuição e aperfeiçoamento desse trabalho, gentileza e disponibilidade.

A secretária Ludmilla Maul e a coordenadora do programa Tatiane Santi-Gadelha, por todo apoio e competência.

A Universidade Federal da Paraíba e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela presença nesses dois anos de mestrado e pelo apoio financeiro.

RESUMO

A epigenética é o estudo das alterações hereditárias na expressão gênica sem mudanças na sequência primária do DNA. No nosso estudo investigamos a influência da exposição solar sobre o perfil de metilação e hidroximetilação global de DNA e em sítios específicos nos genes *miR-9-1*, *miR-9-3* e *MTHFR* em amostras de pele humana. Para isso, biópsias foram obtidas por punch circular de área exposta e não exposta ao sol do braço de 24 cadáveres de ambos os sexos, com idade entre 16-89 anos sem histórico de doenças de pele oriundos do Serviço de Verificação de Óbitos da Paraíba (SVO). O DNA foi extraído e a análise de metilação e hidroximetilação global do DNA foi realizada através de Elisa indireto. A análise de metilação nos sítios específicos dos genes *miR-9-1*, *miR-9-3* e *MTHFR* foi realizada por meio de PCR específica para metilação (MSP) seguida de eletroforese. As análises estatísticas foram realizadas pelo software BioEstat 5.0 ao nível de significância de 5%. Não encontramos diferenças significativas nos níveis de metilação e hidroximetilação global de DNA entre as áreas exposta e não exposta da pele, tipo de pele ou idade. No entanto, foram detectadas diferenças em relação ao gênero, onde as mulheres apresentaram nível de metilação global mais alto em comparação aos homens. O nível de metilação global de DNA foi maior do que o nível de hidroximetilação, sendo estes, correlacionados no tecido da pele. Para sítios específicos, não foi detectada nenhuma diferença entre as áreas. Análises adicionais mostraram não haver diferenças significativas no perfil de metilação quando consideradas a idade, gênero e o tipo de pele. Conclui-se que a exposição ao sol não induz mudanças no perfil de metilação e hidroximetilação global do DNA ou em sítios específicos dos genes *miR-9-1*, *miR-9-3* e *MTHFR* para os tipos de pele estudado.

Palavras-chave: epigenética, metilação, hidroximetilação, radiação solar, *MTHFR*, microRNAs, pele

ABSTRACT

Epigenetics is the study heritable changes of in gene expression without modifications in the primary sequence of DNA. In our study we investigated the influence of sun exposure on global DNA methylation and hydroxymethylation status and at specific sites of the *miR-9-1*, *miR9-3* and *MTHFR* genes in skin samples of subjects with no history of skin diseases. Skin biopsies were obtained by punch on sun-exposed and sun-protected arm areas from 24 corpses aged 16-89 years old from the Brazilian Service of Death Investigation. Genomic DNA was extracted from skin samples that were ranked according to Fitzpatrick's criteria as light, moderate and dark brown. Global DNA methylation and hydroxymethylation and DNA methylation at specific sites analyses were performed using an ELISA and MSP, respectively. No significant differences in global DNA methylation and hydroxymethylation levels were found between the skin areas, skin type or age. However, gender-related differences were detected, where women showed higher methylation levels in comparison to those in men. Global DNA methylation levels were higher than hydroxymethylation levels, and the levels of these DNA modifications correlated in skin tissue. For specific sites, it was detected no differences among areas. Additional analyses showed no differences in the methylation status when age, gender and skin type were considered. We conclude that sun exposure does not induce changes in the global DNA methylation and hydroxymethylation status or at specific sites in the *miR-9-1*, *miR-9-3* and *MTHFR* genes for skin types studied.

Keywords: epigenetic, methylation, hydroxymethylation, sun exposure, *MTHFR*, microRNA, skin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-mC – 5-Metilcitosina

5-hmC– 5-Hidroximetilcitosina

CDH1 – *Caderina 1*

CpG – Citosina/ligação fosfodiester/guanina

DNMT – DNA metiltransferase

MBP – Proteínas de ligação ao grupamento metil

miRNA – microRNA

MMP – Metaloprotease de matriz

mRNA – RNA mensageiro

MSP – PCR específica para metilação

MTHFR- Gene que codifica a enzima metilenotetrahidrofolato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pré-miRNA – microRNA precursor

pri-miRNA – RNA primário

PRIMER- Oligonucleotídeo Iniciador

RISC – Complexo de silenciamento induzido por RNA

SE – Área exposta ao sol

SP – Área protegida do sol

SVO – Serviço de verificação de óbitos

TET2 – *Tet metilcitosina dioxigenase 2*

UV – Ultravioleta

UVA – Ultravioleta A

UVB – Ultravioleta B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação da 5-metilcitosina (5-mC).....	14
Figura 2. Aquisição de radical metil pelas fitas-filhas.....	15
Figura 3. Mecanismo pelo qual a metilação do DNA inibe a transcrição gênica.....	16
Figura 4. Modelo proposto para a geração da 5-hidroximetilcitosina através da desmetilação passiva do DNA mediado pelas enzimas TET.....	17
Figura 5. Estrutura morfológica da pele, mostrando suas camadas e seus respectivos componentes.	18
Figura 6. Classificação do tipo de pele segundo os critérios de Fitzpatrick.....	19
Figura 7. Biogênese de miRNA e os mecanismos de silenciamento gênico através da degradação do RNAm e da repressão da tradução.....	22
Figura 8. Localização dos genes da família <i>miR-9</i>).....	23
Figura 9. Localização do gene <i>MTHFR</i>	24
Figura 10. Via metabólica do folato.....	25
Fig 1- Global DNA methylation and hydroxymethylation level in skin tissue.	45
Fig 2- DNA methylation analysis of <i>miR-9</i> -, <i>miR-9-3</i> and <i>MTHFR</i> promoter of skin tissue.	46

LISTA DE TABELAS

Table 1. Primers sequences and MSP analysis conditions for <i>miR-9-1</i> , <i>miR-9-3</i> and <i>MTHFR</i> genes.....	44
Table2. Demographic and skin type data in studied population.....	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Metilação e Hidroximetilação de DNA.....	14
2.2 Pele e Radiação Solar	18
2.3 Fotoenvelhecimento e Câncer	20
2.4 MicroRNAs (miRNAs).....	21
2.5 Gene <i>MTHFR</i>	24
2.6 Justificativa.....	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos	27
4. RESULTADOS	28
4.1 ARTIGO.....	29
Introduction.....	31
Material and methods.....	32
Results.....	34
Discussion.....	36
Conclusion.....	40
References.....	41
5. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO 01	56
ANEXO 02	57

1. INTRODUÇÃO

O termo epigenética foi introduzido pela primeira vez, em 1940, por um biólogo chamado Conrad Hal Waddington, que estudando o desenvolvimento embrionário de *Drosophila* designou o conceito epigenético como sendo o estudo das interações entre os genes e o seu ambiente resultando na origem de diferentes fenótipos por meio de mudanças programadas durante o desenvolvimento (MURREL et al., 2005; WADDINGTON, 2012). No entanto, a epigenética é definida, atualmente, como o estudo de alterações hereditárias na expressão gênica sem a existência de mudanças na sequência primária do DNA, incluindo os mecanismos de metilação e hidroximetilação do DNA, metilação, fosforilação e acetilação nas caudas N-terminais das proteínas histonas, incorporação de histonas variantes nos nucleossomos, remodelamento de nucleossomos e RNAs não codificantes (BERGER et al., 2009; SHARMA et al., 2010).

O perfil epigenético melhor caracterizado e estudado atualmente é a metilação do DNA, pois são mais frequentes que mutações e são responsáveis por equilibrar a plasticidade com estabilidade, visto que pode existir-se em tecidos específicos, variar potencialmente com a idade e com as exposições ambientais (FARRÉ et al., 2015). Sabe-se que a epigenética representa a interface entre o genoma e o ambiente, e dessa forma, novas pesquisas vêm a cada dia tentando elucidar como a exposição à radiação solar pode influenciar o nosso epigenoma.

A pele humana em constante exposição à radiação UV pode apresentar lesões diretamente no DNA genômico nuclear e mitocondrial, assim como através da geração de espécies reativas de oxigênio, gerando consequentemente vários efeitos deletérios, tais como: eritema, fotoenvelhecimento, imunossupressão e câncer (CADET et al., 2005).

Estudos recentes têm reforçado que o descontrole aberrante do perfil epigenético em promotores de genes representam um dos principais mecanismos associados com a inativação de genes e, frequentemente, ocorre em genes supressores de tumores contribuindo para a iniciação e progressão do câncer (FUKUSHIGE et al, 2009; USHIJIMA et al, 2010; SHAH et al., 2014). Uma pesquisa realizada com roedores mostrou que a exposição à radiação ultravioleta é capaz de induzir alterações epigenéticas podendo acarretar o desenvolvimento de câncer de pele (YANG et al., 2014).

As células, para manterem a sua integridade genômica possuem além dos mecanismos de reparos, um grupo de pequenos RNAs endógenos e não-codificantes conhecidos como

microRNAs, e que atuam regulando negativamente a expressão gênica em nível pós-transcricional através da degradação de mRNAs ou bloqueando a tradução (BAER et al., 2013; DEEBA et al., 2013). A desregulação epigenética de microRNAs vêm sendo considerada uma das principais apostas de pesquisas recentes, pois tem assumido um papel importante no silenciamento de genes envolvidos na proliferação celular, diferenciação, apoptose e carcinogênese (BUSHATI et al., 2007; MEOLA et al., 2009).

O perfil de metilação de diversos genes envolvidos em lesões de pele provocadas pela exposição à radiação solar já foram demonstrados em vários estudos, dentre eles, o de Sathyanarayana et al., (2007) que investigaram o padrão de metilação de regiões promotoras de genes que atuam como supressores tumorais no carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas da pele, e descobriram altas frequências de metilação em vários genes: *CDH1*, *CDH3*, *LAMA3*, *LAMC2* e *RASSF1A*.

Um gene que tem sido ultimamente explorado quanto ao seu perfil epigenético em diferentes enfermidades, é o *MTHFR*, que codifica uma importante enzima que regula a disponibilidade de folato ativo, este por sua vez, é uma vitamina B que desempenha um papel fundamental na remetilação de homocisteína em metionina, na qual, atua na formação de um dos principais doadores do grupo metil, a S-adenosilmetionina (JONGBLOET et al., 2008). No entanto, ainda são escassos trabalhos que visam investigar a influência de fatores externos sobre o perfil de metilação do gene *MTHFR*.

Baseado nesses fatos o estudo da influência da exposição solar sobre o perfil de modificações no DNA é bastante interessante e pode revelar novos marcadores moleculares associados a alterações causadas pela radiação solar, que por sua vez, é a principal causa do envelhecimento precoce e cancer de pele (QUAN et al., 2009; YAN et al., 2011; AMARO-ORTIZ et al., 2015). Esses dados podem ser utilizados para elucidar sobre como a rede complexa de regulação epigenética influencia as células e promove malignidade e/ou fotoenvelhecimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metilação e Hidroximetilação de DNA

A metilação de DNA constitui um importante mecanismo epigenético regulador da integridade e expressão gênica, cuja modificação é herdável, reversível e não altera o código genético. Tal mecanismo consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH_3) é transferido da S-adenosilmetionina (SAM-CH_3) para o carbono 5 de uma citosina (5-mC) que geralmente precede uma guanina denominado de dinucleotídeo CpG, sendo catalisada pela ação de uma família de enzimas específicas que recebem o nome de DNA-metiltransferases (DNMTs) (Figura 1) (MEERAN et al., 2010; OLIVEIRA, 2010; COSTA & PACHECO, 2013).

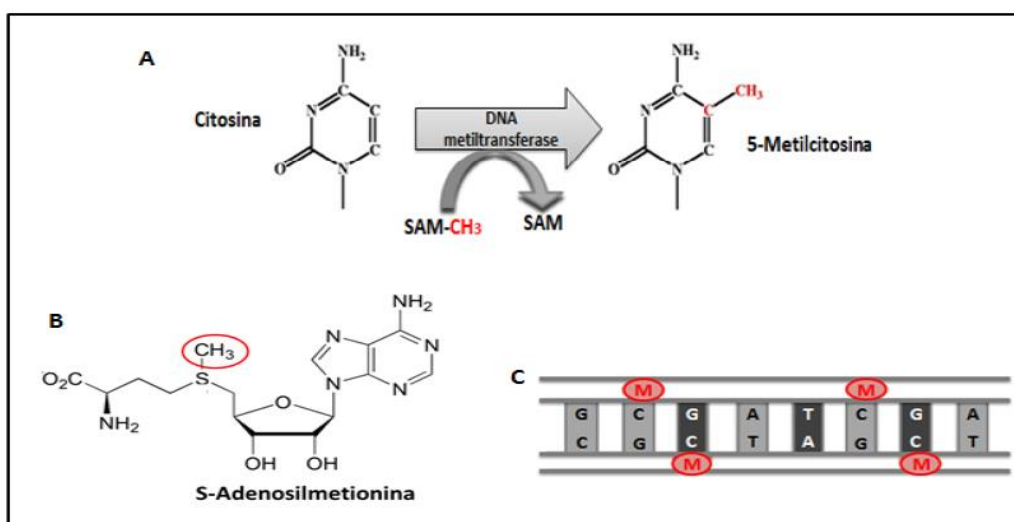


Figura 1. Formação da 5-metilcitosina (5-mC). **(A)** Ação da DNA metiltransferase sobre a citosina, gerando 5-mC. **(B)** S-adenosilmetionina, molécula responsável por doar o grupamento metil. **(C)** Dinucleotídeos CpG metilados. Fonte: Adaptado de Turek-Plewa e Jagodziński, 2005; Meeram et al, 2010.

Em células diferenciadas a metilação ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG e tem uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma, sendo ela randômica ou sítio específica (FEINBERG et al., 2004). Sítios potenciais de metilação, os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões conhecidas como ilhas CpG que são regiões do DNA maior que 200 pares de base contendo aproximadamente 50% de bases C e G. A presença esperada de dinucleotídeos CpG é de aproximadamente 60% e apresentam-se mais frequentes em regiões promotoras de certos genes sendo prevalentes nos genes

housekeeping e reguladores do desenvolvimento (LI et al., 2002; HERMANN & BAYLIN, 2003; SMITH & MEISSNER, 2013).

O processo de metilação ocorre devido à ação das enzimas DNA-metiltransferases que estão agrupadas em três classes: As DNMT1, nas quais, são responsáveis por manter o padrão de metilação nas novas fitas de DNA que são formadas durante a replicação (Figura 2), e que são conhecidas como metilases de manutenção. As DNMT2 e DNMT3A e DNMT3B, que desempenham a maioria dos processos de metilação *de novo*, que ocorrem em sítios sem nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia (BESTOR, 2000; JIM et al., 2011).

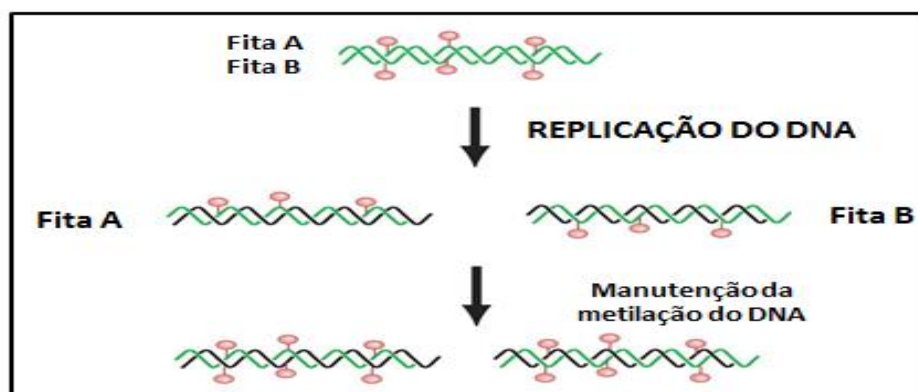


Figura 2. Aquisição de radical metil pelas fitas-filhas de DNA (DNMT1). Fonte: Allis et al., (2006).

As ações destas enzimas requerem um substrato que atue como doador de radical metil e estes são obtidos da dieta, como o folato, a metionina, a colina e a vitamina B12 (WATERLAND et al., 2003; WATERLAND, 2006).

A metilação normal do DNA, em mamíferos, controla várias funções do genoma como: o controle da replicação, estabilização e manutenção da expressão gênica, regulação da diferenciação celular, inativação do cromossomo X em fêmeas, dos genes que sofrem *imprinting* e de sequências repetitivas de DNA, sendo essencial durante a morfogênese para que ocorra desenvolvimento normal (SUTER et al., 2004; BAYLIN & JONES, 2011; JONES, 2012; ADALSTEINSSON & FERGUSON-SMITH, 2014). Os padrões de metilação do DNA estão relacionados à estrutura da cromatina. DNA desmetilado está tipicamente associado a uma conformação ativa da cromatina enquanto que o DNA metilado está associado a uma cromatina inativa, assim, ilhas CpG em promotores encontram-se normalmente não metiladas na eucromatina, mas apresentam nível elevado de metilação na heterocromatina

(EILERTSEN et al., 2008; SCHINKE et al., 2010). No entanto, um estudo mostrou que durante a desregulação epigenética a metilação de ilhas CpG é alterada, afetando a expressão de genes codificadores de proteínas e também a expressão de vários microRNAs (BAYLIN & JONES, 2011).

A transcrição gênica pode ser fortemente inibida pela adição de radical metil que atua bloqueando a ligação de fatores de transcrição. A ausência de ligação de fatores de transcrição aos seus sítios específicos pode resultar na ausência ou diminuição da transcrição gênica. Proteínas que apresentam afinidade pelo grupo metil (MBPs- Methyl Binding Protein), ligam-se às regiões CpGs localizadas nos promotores e impedem o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios (ATTWOOD et al., 2002) (Figura 3).

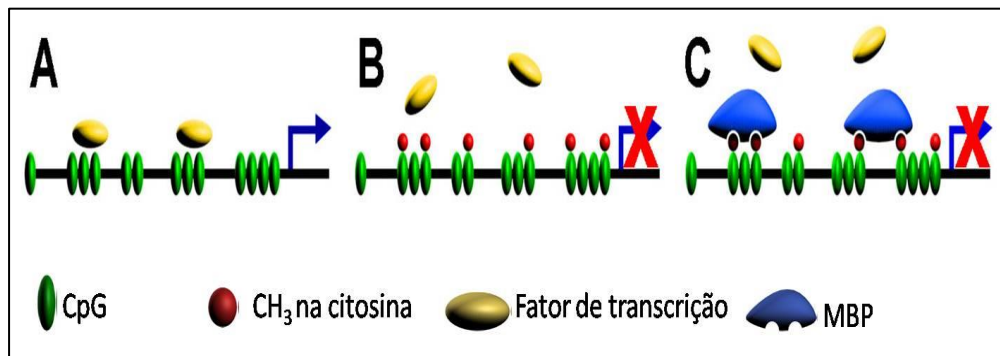


Figura 3. Mecanismo pelo qual a metilação do DNA inibe a transcrição gênica. **(A)** Região promotora desmetilada permitindo a ligação dos fatores de transcrição. **(B)** Metilação impedindo a ligação dos fatores de transcrição. **(C)** Proteínas que se ligam à metilcitosina em ilhas CpG bloqueiam a ligação dos fatores de transcrição. Fonte: Atwood et al., 2002.

Além da metilação, estudos descrevem a descoberta da base 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) como participante na regulação epigenética, influenciando a regulação da transcrição de genes a curto e longo prazos a partir da manutenção de estados não metilados em regiões promotoras de genes, sendo considerada uma das moléculas-chave envolvidas no processo de desmetilação do DNA (HUANG et al., 2010; DAHL et al., 2011).

A 5-hidroximetilcitosina é gerada pela oxidação de 5-metilcitosina através da ação das enzimas *Ten-Eleven Translocation* (TET) que promovem o processo de desmetilação ativa dos dinucleotídeos CpG, parecendo ser esse processo necessário para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvimento ou em respostas às perturbações ambientais. (Figura 4). As TET 1 e TET 2 possuem expressão diferenciada em tecidos específicos, porém, apresentam-se altamente expressas em células embrionárias e são responsáveis pela regulação de genes envolvidos com a pluripotência e

com o potencial de diferenciação das linhagens embrionárias e extraembrionária (TAHILIANI et al., 2009; ITO et al., 2010; WALTER, 2011).

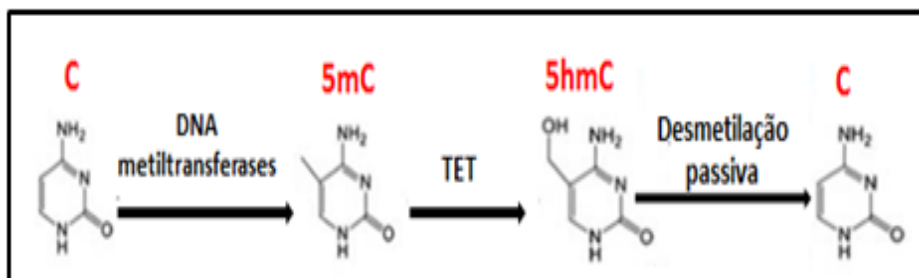


Figura 4. Modelo proposto para a geração da 5-hidroximetilcitosina através da desmetilação passiva do DNA mediado pelas enzimas TET. Fonte: Adaptado de Wu & Zhang, 2011.

A desmetilação ainda pode ocorrer de maneira passiva, quando não há envolvimento de desmetilases e ocorre quando a manutenção das marcas de metilação não ocorre devido à inibição da atividade das metiltransferases durante o ciclo celular (ZHU, 2009; ARIOKA et al., 2012). Assim, o nível e o padrão de 5-mC são dependentes dos processos de metilação e desmetilação e a ação das enzimas envolvidas nesses processos é altamente regulada pelas células.

A 5-hidroximetilcitosina é uma forma recém-descoberta da citosina modificada que tem sido considerada como uma importante modificação epigenética, porém, pesquisas que buscam investigar sobre a influência de fatores ambientais sobre o perfil hidroximetilação global do DNA são pouco exploradas. A exposição ao arsênio foi estudada e os resultados obtidos indicaram que ocorrem alterações nos níveis de hidroximetilação (TELLEZ-PLAZA et al., 2014).

Vários grupos de pesquisa reportaram recentemente uma redução marcada nos níveis de 5-hmC em diversos tipos de câncer, dentre eles: mama, fígado, pulmão, pâncreas, cólon, próstata, cérebro e leucemia mieloide (GAMBICHLER et al., 2013). Lian et al., (2012) detectaram que, durante a progressão do melanoma ocorre redução de 5-hmC acompanhada de uma redução nos níveis de TET2, proteínas relacionadas a sua formação. A 5-hidroximetilcitosina atua como um marcador útil para diferenciar entre os melanomas malignos e benignos (UCHIYAMA et al., 2014).

2.2 Pele e Radiação Solar

A pele humana é o maior órgão do corpo que atua como uma interface com o meio externo recobrendo toda a superfície corporal, representando 16% do peso total de uma pessoa. Devido as suas características físicas, químicas e biológicas, a pele é responsável por diversas atividades, tais como proteção imunológica, termorregulação, percepção sensorial, secreção e proteção contra radiação solar (SAMPAIO e RIVITTI, 2001; RICHELLE et al., 2006).

É constituída por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 5). A epiderme é a camada mais externa da pele, formada por uma camada córnea rica em queratina e diversas camadas celulares justapostas e organizadas em uma estrutura multilamelar. É constituída de queratinócitos (cerca de 85%), melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, células essas, que se renovam continuamente provomendo um constante processo de descamação da epiderme (MILSTONE, 2004). A derme representa a porção interna da pele, cuja estrutura é rica em elementos de matriz extracelular, como as fibras de colágeno e elastina, apresentando também vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas. Basicamente, a derme é responsável por todo o tipo de sustentação da pele, em termos físicos e nutricionais, representando cerca de 90% da espessura cutânea. A hipoderme é a camada mais interna e que praticamente é constituída pelo tecido adiposo e conjuntivo frouxo que serve para unir, de maneira pouco firme, a derme aos outros órgãos do corpo (SAMPAIO e RIVITTI, 2001; COSTIN E HEARING, 2007; BOUWSTRA et al., 2008;).

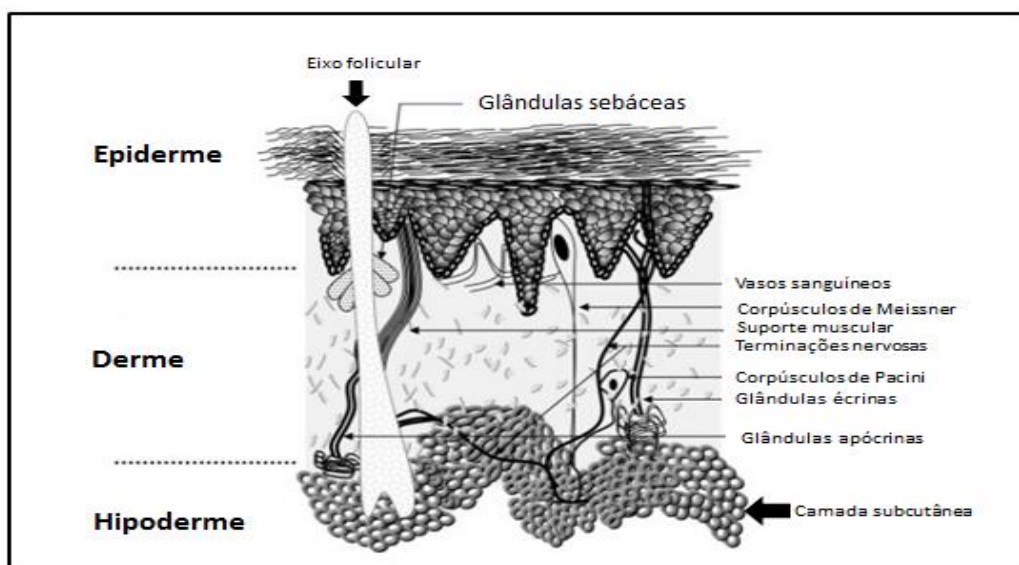


Figura 5. Estrutura morfológica da pele, mostrando suas camadas e seus respectivos componentes.
Fonte: Adaptado de Robins, 1991.

A pele humana desenvolveu dois principais mecanismos de defesa para se proteger contra os efeitos nocivos dos raios ultravioleta (UV): o espessamento da epiderme e a estimulação da síntese de melanina. No entanto, quando as células da camada córnea são expostas a altos níveis de radiação solar ocorre danos nos queratinócitos e a pele, conseqüentemente, fica menos protegida e mais vulnerável as duas formas principais de carcinomas epidérmicos: carcinomas de células basais e de células escamosas. (BRENNER e HEARING, 2008; D'ORAZIO et al., 2013).

A coloração da pele é resultante da espessura das camadas celulares e da quantidade de pigmentos, como a melanina, que além de ser modulada geneticamente, a sua produção também é influenciada por fatores como idade, ocorrência de resposta inflamatória, variações hormonais e influências ambientais como exposição à radiação solar (COSTIN E HEARING, 2007; BRENNER E HEARING, 2008; RIGAL et al., 2010).

Com base na coloração da pele e sua reação à exposição solar, a Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD) adotou uma escala para classificação dos tipos de pele (Figura 6), criada em 1976 pelo dermatologista e diretor do departamento de Dermatologia da Escola de Medicina de Harvard: Thomas B. Fitzpatrick (1988).



Figura 6. Classificação adotada no Brasil dos tipos de peles segundo os critérios de Fitzpatrick (1988). Fonte: Adaptado de www.laserdocs.co.uk.

A pele apresenta muitas vantagens para o estudo de alterações induzidas pelo envelhecimento e por danos no DNA, já que possui fenótipo dependente da idade e quando alterada é caracterizada por mudanças na rede vascular, redução da epiderme, baixos níveis de colágenos específicos e está diretamente exposta a muitos fatores ambientais, dentre o mais preocupante atualmente está a radiação solar (GILHAR et al., 2004; BAUMANN, 2007).

A exposição aguda da pele à radiação ultravioleta causa queimaduras, alteração da pigmentação, inflamação, imunossupressão e danos no tecido conjuntivo da derme (AMBACH et al., 1993; BRASH et al., 2001; DAMIAN et al., 2011). A exposição crônica por muitos anos altera a arquitetura normal da pele causando o envelhecimento prematuro (fotoenvelhecimento) (FISHER et al., 2002) e câncer de pele, pois quando a radiação solar UV é absorvida pelas células da pele ocorre alterações na estrutura química do DNA e causa estresse oxidativo (BIESALSKI et al., 2003; ICHIHASHI et al., 2003; YAAR et al., 2007; PFEIFER et al., 2012).

A maior parte da energia irradiada pelo sol está na região do espectro Ultravioleta (UV) (comprimento de 100-400 nm) em comparação ao espectro da luz visível (comprimento de 400-700 nm). A menor parte destes comprimentos de onda é absorvida pelo oxigênio atmosférico e a camada de ozônio. Os raios ultravioleta B (UVB) (comprimento de 280-320 nm) são absorvidos eficientemente, embora incompletamente pela camada de ozônio, enquanto que os raios ultravioleta A (UVA) (comprimento de 320-400 nm) é absorvido menos eficientemente e assim pode ser mais facilmente transmitido para a atmosfera terrestre (CRUTZEN, 1992). Durante muitos anos a diminuição da camada de ozônio tem sido observada como resultante da atividade humana, principalmente devido à emissão de compostos contendo halogênio resultando em um aumento da dose de UVB sobre a Terra e conseqüentemente na pele (CRUTZEN, 1992; DE FABO, 2000).

2.3 Fotoenvelhecimento e Câncer

O fotoenvelhecimento ou envelhecimento prematuro é caracterizado por mudanças na aparência e estrutura da pele decorrente de danos acumulados durante exposição à radiação solar (KIM et al., 2015). Diversas alterações patológicas são notáveis no fotoenvelhecimento como: espessamento da pele, rugas, pigmentação e secura (KIM et al., 2013; HWANG et al., 2014). As conseqüências mais graves da radiação solar estão associadas com o risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias, dentre as quais se destaca o câncer de pele. O

melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo que acomete frequentemente pessoas com idade acima de 40 anos, no entanto, pessoas jovens também têm possibilidades de desenvolver. É decorrente de danos nos melanócitos devido à exposição crônica à radiação solar, sendo os casos mais frequentes (86,3%) em pessoas brancas (FERRARI JÚNIOR et al., 2008; CHENG et al., 2015).

Além de mutações genéticas desordens epigenéticas são frequentes no desenvolvimento de doenças relacionadas ao envelhecimento e câncer, nas quais, atualmente tem sido fortemente enfatizadas pelo crescente número de trabalhos relatando falhas tanto nos processos de metilação de DNA, quanto de modificações de histonas em diversos tipos tumorais (RODRÍGUEZ-PAREDES & ESTELLER, 2011; OLIVEIRA, 2012).

2.4 MicroRNAs (miRNAs)

MicroRNAs compreendem uma classe de pequenos RNAs não-codificantes com aproximadamente 19 a 24 nucleotídeos que são essenciais reguladores de uma variedade de processos celulares, tais como: homeostase celular, proliferação, diferenciação, apoptose e carcinogênese (SAND et al., 2009; WIDMER et al., 2014; AYALA-ORTEGA et al., 2016). Desempenham um papel chave na regulação da expressão de genes em nível pós-transcricional, acarretando a degradação ou reprimindo a tradução de RNAs mensageiros (mRNAs) (FRIEDMAN et al., 2009; SATO et al., 2011).

A biogênese dos microRNAs consiste em um processo complexo que inclui várias etapas e encontra-se esquematizada na figura 7. Inicialmente, os microRNAs são transcritos pela RNA polimerase II (pol II), em seguida são processados formando longos transcritos primários (pri-miRNAs) contendo em uma extremidade o cap 5' e na outra uma extensa cauda poli (A). Ainda no núcleo, os transcritos primários são processados pela ação de uma enzima RNase III endonuclease (DROSHA) juntamente com seu cofator DGCR8, liberando então, microRNAs precursores (pre-miRNA) em forma de grampo com cerca de 60-75 nucleotídeos (HUPPI, K. et al., 2007; MACK, 2011; ARÃO et al., 2012). Estes por sua vez estão prontos para serem exportados do núcleo através de um complexo chamado Exportina-5/Ran-GTP. No citoplasma, o pre-miRNA é clivado por outra RNase III, a DICER, gerando um microRNA duplex maduro com aproximadamente 19-24 nucleotídeos. Apenas uma das fitas do miRNA maduro é retida pelo complexo multiproteico de indução de silenciamento de RNA (RISC), no qual uma vez associados, o complexo pode regular negativamente a

expressão de mRNAs por meio da degradação e repressão da tradução (ARÃO, 2012; FUZIWARA & KIMURA, 2014). Quando ocorre pareamento perfeito entre as ribonucleases associadas ao complexo miRNA-RISC com o mRNA, este é então degradado, mecanismo que é comum em plantas (LLAVE et al., 2002). No entanto, nos animais o silenciamento de mRNAs através do pareamento imperfeito da região 3' UTR com o complexo miRNA-RISC é mais frequente. Tal mecanismo inibe a tradução e possibilita que vários mRNAs diferentes sejam regulados por único miRNA e ainda, que diferentes miRNAs controlem de forma cooperativa a expressão de um único mRNA alvo (BARTEL & CHEN, 2004; FUZIWARA, 2010).

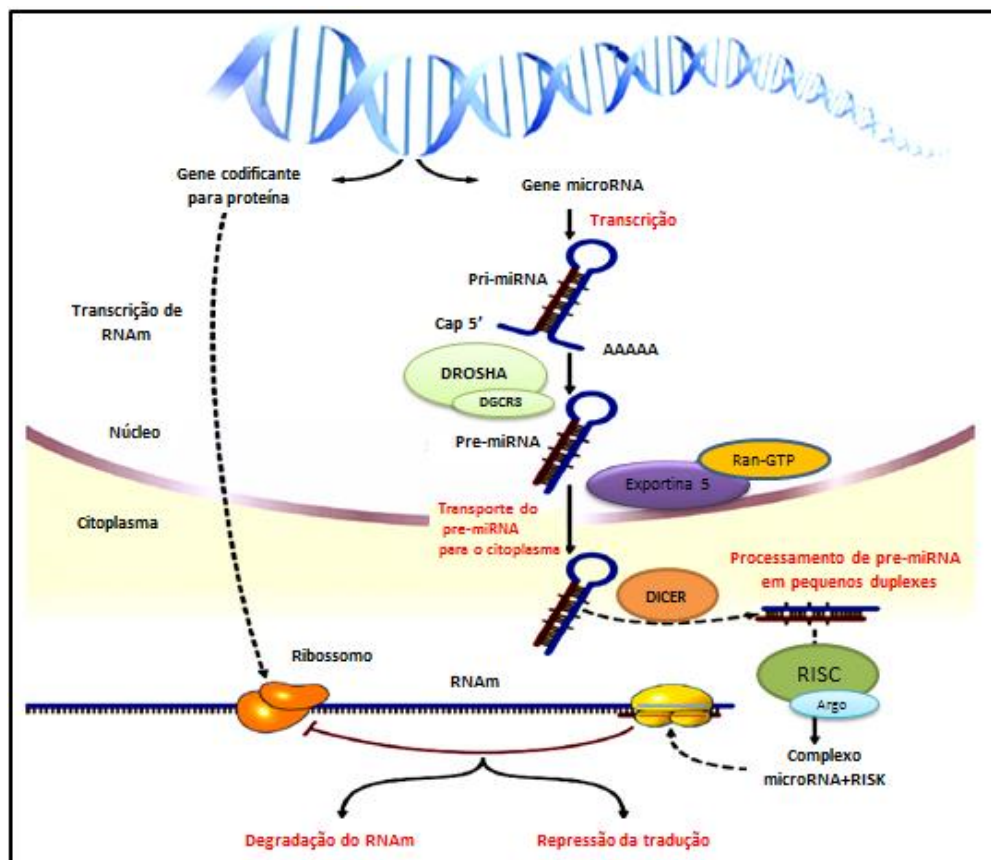


Figura 7. Biogênese de miRNA e os mecanismos de silenciamento gênico através da degradação do RNAm e da repressão da tradução. Fonte: Adaptado de Chen, 2005; Sand et al., 2009.

Atualmente cerca de 1000 microRNAs humanos são conhecidos, e sabe-se que estes dependendo do tipo celular podem desempenhar funções oncogênicas ou atuarem como supressores tumorais reprimindo seus genes-alvo. Estima-se que estes regulam a expressão de mais de 50% dos genes humanos, configurando assim uma complexa rede regulatória pouco esclarecida, mas que vem sendo ultimamente bastante explorada em pesquisas (TSAI et al., 2011; WIDMER et al., 2014).

Estudos recentes têm demonstrado que mecanismos epigenéticos, incluindo a metilação do DNA e modificações em histonas, não só regulam a expressão de genes codificadores de proteínas, mas também dos miRNAs (WATANABE et al., 2015; VIBOR et al., 2016). E como previsto, a desregulação da expressão desses microRNAs estão altamente associados a doenças, dentre elas: o câncer e doenças relacionadas ao envelhecimento (SATO et al., 2011). Uma classe de microRNAs bastante estudada é o *miR-9*, o qual possui três *loci* independentes no DNA, o *miR-9-1* localizado no cromossomo 1, o *miR-9-2* localizado no cromossomo 5 e o *miR-9-3* localizado no cromossomo 15 (Figura 8).

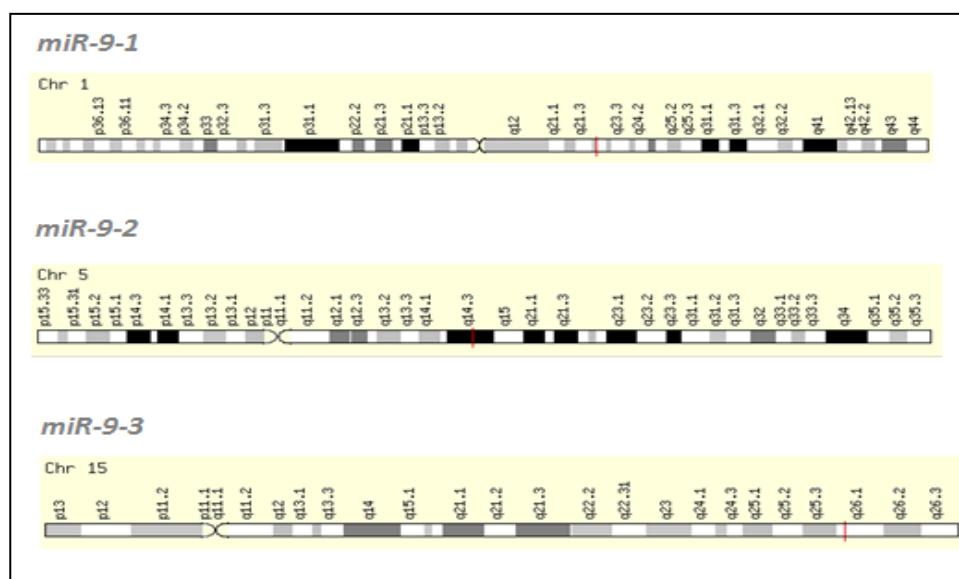


Figura 8. Localização dos genes da família *miR-9*: *miR-9-1*(cromossomo 1); *miR-9-2* (cromossomo 5) e *miR-9-3* (cromossomo 15). Fonte: www.genecards.org

O papel dos *miR-9* nos diferentes tipos de cânceres ainda é controverso, podendo atuarem como um supressor tumoral ou como promotor do desenvolvimento tumoral, dependendo do estágio e da especificidade maligna de cada tumor (TSAI et al., 2011; TANNOUS, 2014). Ma e colaboradores (2010), mostraram em seus estudos que no câncer de mama metastático, o *miR-9* apresenta-se superexpresso pela ativação de proteínas da família MYC e atua na indução de metástase e transição epitélio-mesenquimal através da ligação no mRNA-alvo da E-caderina (*CDH1*). Em adição, estudos mostram que o silenciamento de *miR-9* pela hipermetilação das ilhas CpG nas regiões promotoras é encontrada em diversos cânceres, incluindo câncer de mama e melanoma (LUJAMBIO et al., 2008; LIU et al., 2012; TANNOUS, 2014).

2.5 Gene *MTHFR*

O gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) está localizado no braço curto do cromossomo 1 (Figura 9), é responsável por codificar uma enzima chave no metabolismo do folato, chamada de metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) (GOYETTE, 1995). O folato é uma forma solúvel da vitamina B que é catalisado pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase para a síntese do 5-metilenotetrahidrofolato que é a forma predominante de folato sérico e doador de carbono para a metilação da homocisteína em metionina, sendo esta reação extremamente fundamental para a síntese de S-adenosilmetionina (SAM), um dos mais importantes doadores de metil para o DNA (Figura 10) (BALAGHI e WAGNER, 1993; ROSENBLATT et al., 1995; IZMIRLI, 2013). Portanto, quando a expressão do gene *MTHFR* é reduzida, os níveis de metionina diminuem enquanto os níveis de homocisteína aumentam, culminando respectivamente na desregulação da via de metilação, e com o desenvolvimento de doenças como a homocistinúria (SIBANI et al., 2000; LY et al., 2012).

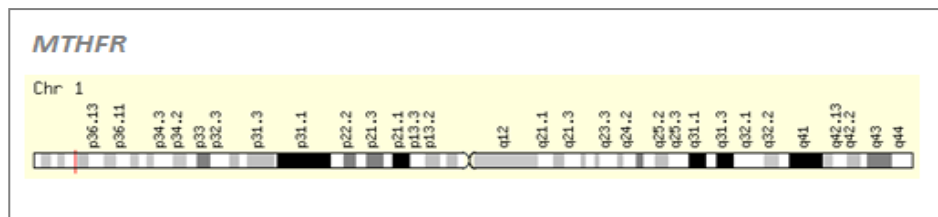


Figura 9. Localização do gene *MTHFR* (cromossomo 1). Fonte: www.genecards.org

Estudos mostram que a desregulação epigenética do gene *MTHFR* é comum em vários tipos de câncer. Um estudo feito por Paz et al. (2002) mostrou que existe uma associação positiva entre o perfil de metilação aberrante e o alelo variante T do gene *MTHFR* nos cânceres colorretal, de mama e de pulmão. A análise de metilação da região promotora do gene *MTHFR* em lesões cervicais, mostrou que os genes apresentam-se hipermetilados (BOTEZATU et al., 2013). Segundo Laing et al., (2010) com base em seus resultados mostram que os níveis aberrantes de metilação de DNA em carcinoma de células escamosas podem estar relacionados com o polimorfismo do gene *MTHFR*.

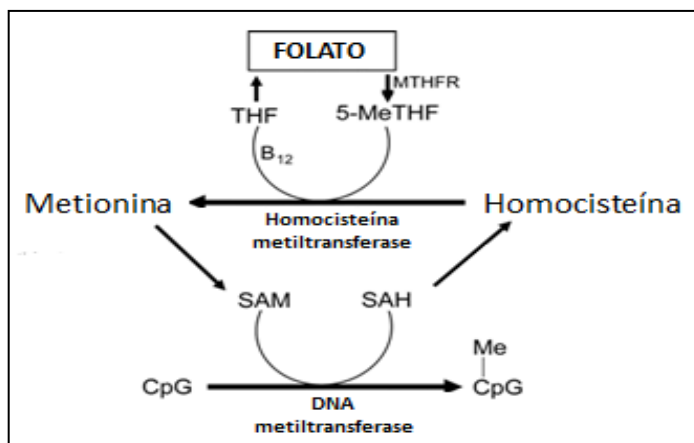


Figura 10. Via metabólica do folato. Fonte: Dhillon et al., 2007.

2.6 Justificativa

Atualmente, estudos que abordam as modificações epigenéticas têm emergido como um importante campo de pesquisa e tem revelado como o meio ambiente pode afetar nossos genes e alterar drasticamente a expressão gênica, resultando em doenças inflamatórias e tumorais, ou mesmo no envelhecimento (ATTWOOD et al., 2002).

Já está bem estabelecido como a radiação UV do sol pode causar mutações no DNA e aumentar o risco para o desenvolvimento de câncer de pele (PFEIFER et al., 2009). Entretanto, pouco se sabe sobre a capacidade da radiação UV em causar alterações epigenéticas na pele, e esse pode ser outro mecanismo pelo qual a exposição crônica ao sol leva a tumorigênese.

A maioria das evidências em amostras não tumorais de que a radiação ultravioleta pode causar alterações epigenéticas são oriundas de trabalhos experimentais com roedores ou linhagem celulares (MITTAL et al., 2003; NANDAKUMAR et al., 2011; CHEN et al., 2012).

Os estudos utilizando amostras de pele obtidas de humanos apresentam resultados controversos. Um desses estudos mostrou hipermetilação no gene que codifica a caderina 1 (*CDH1*) em regiões expostas ao sol (SATHYANARAYANA et al., 2007). Outro estudo revelou tendência à hipometilação no promotor do gene *KRT75* (*queratin 75*), em amostras de pele expostas ao sol e em adição, mostrou ainda que, essas alterações eram mais acentuadas em indivíduos mais velhos (GRONNIGER et al., 2010). Entretanto, Da Silva Melo et al., (2015) não detectaram influência da exposição solar sobre o perfil de

metilação dos genes *MMP9*, *miR-137*, *KRT14* e *KRT19* em amostras de pele humana. Outro estudo, realizado por Vandiver et al., (2015) comparou epiderme e derme de pele exposta e protegida do sol de indivíduos jovens (com menos de 35 anos de idade) e idosos (mais de 60 anos de idade), e obtiveram como resultados que a hipometilação é mais frequente em amostras de epiderme expostas ao sol de indivíduos idosos, e associaram o grau de hipometilação com medidas clínicas de fotoenvelhecimento. Eles também observaram que as mesmas regiões gênicas estudadas são igualmente hipometiladas em amostras de carcinoma de células escamosas, o segundo tipo de câncer de pele mais comum. Entretanto, Lahtz et al., (2013) revelaram que a exposição de queratinócitos à radiação UVB não apresentou nenhum efeito reconhecível em padrões de metilação global de DNA, e, sugeriram que as alterações na metilação do DNA, tal como observado em tumores da pele, não são consequências imediatas da exposição a radiação UVB solar.

Um estudo realizado em uma população de adultos saudáveis na Austrália mostrou que a exposição à radiação UV solar pode reduzir os níveis de metilação de DNA em linfócitos circulantes e que esta associação não é influenciada ou mediada pela vitamina D (NAIR SHALLIKER et al., 2014).

Sabe-se que a 5-hmC atua como um marcador útil para diferenciar entre os melanomas malignos e benignos (UCHIYAMA et al., 2014), e que os genes *miR-9* e *MTHFR* já foram relacionados à tumorigênese em alguns tipos de câncer. Contudo, até o momento nada se sabe sobre a influência da exposição solar sobre o perfil de metilação de DNA em nenhum gene da família de microRNAs e no gene *MTHFR* nem sobre o perfil de hidroximetilação global em células da pele. Uma vez que essas marcas epigenéticas já foram associadas ao câncer, o estudo de alterações nesses alvos em células não tumorais expostas a agentes cancerígenos, como a radiação UV, pode auxiliar no entendimento de como a rede complexa de regulação epigenética influencia as células e promove malignidade e/ou fotoenvelhecimento.

Baseado nesses fatos o presente estudo investigou a influência da exposição solar sobre o perfil de modificações no DNA ainda não investigadas em pele humana, na tentativa de encontrar marcadores relacionados a alterações associadas à exposição solar.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a influência da exposição solar sobre o perfil epigenético de células de pele humana.

3.2 Específicos

- ❖ Investigar se a exposição solar tem influência sobre o perfil de metilação e hidroximetilação global de DNA;
- ❖ Investigar se a exposição solar tem influência sobre o perfil de metilação em sítios específicos nos genes *miR-9-1*, *miR-9-3* e *MTHFR*;
- ❖ Investigar se fatores intrínsecos, como idade, gênero e tipo de pele tem influência sobre o perfil de metilação e hidroximetilação global do DNA e em sítios específicos dos genes *miR-9-1*, *miR-9-3* e *MTHFR*.

4. RESULTADOS

ARTIGO SUBMETIDO NO PERIÓDICO INTERNATIONAL JOURNAL OF DERMATOLOGY

Preview (IJD-2016-0090)

From: IntJDerm@gmail.com

To: naila_francis@yahoo.com.br

CC:

Subject: International Journal of Dermatology - Manuscript ID IJD-2016-0090

Body: 18-Jan-2016

Dear Prof. de Oliveira:

Thank you for submitting your manuscript entitled "GLOBAL DNA METHYLATION AND HYDROXYMETHYLATION STATUS AND AT SITE-SPECIFIC OF THE MIR-9-1, MIR-9-3 AND MTHFR GENES IN SUN-EXPOSED SKIN TISSUE" to the International Journal of Dermatology for consideration for publication.

Your manuscript has been successfully submitted and assigned an ID of IJD-2016-0090.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/ijd> and edit your user information as appropriate.

Please use your Author Center to check on the status of your manuscript at any time by logging in at <https://mc.manuscriptcentral.com/ijd>.

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Thank you for submitting your manuscript to the International Journal of Dermatology. Please feel free to contact me if you have any questions.

Sincerely,

Ms. Patty Winkels
Editorial Manager
International Journal of Dermatology

Date Sent: 18-Jan-2016

4.1 ARTIGO

GLOBAL DNA METHYLATION AND HYDROXYMETHYLATION STATUS AND AT SITE-SPECIFIC OF THE *MIR-9-1*, *MIR-9-3* AND *MTHFR* GENES IN SUN-EXPOSED SKIN TISSUE

DNA methylation and hydroxymethylation and sun exposure

MIKAELLY BATISTA DA SILVA¹, ALANNE RAYSSA DA SILVA MELO¹, LUDIMILA DE ARAÚJO COSTA¹, HALINE BARROSO¹, NAILA FRANCIS PAULO DE OLIVEIRA^{1,2}

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

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

Introduction: Epigenetic changes represent the interface between the genome and the environment, and they are heritable, reversible, and more frequent than mutations and do not alter the primary sequence of the DNA. **Purpose:** to investigate the influence of sun exposure on global DNA methylation and hydroxymethylation status and at specific sites of the *miR-9-1*, *miR9-3* and *MTHFR* genes in skin samples of subjects with no history of skin diseases. **Materials and Methods:** skin biopsies were obtained by punch on sun-exposed and sun-protected arm areas from 24 corpses aged 16-89 years old from the Brazilian Service of Death Investigation. Genomic DNA was extracted from skin samples that were ranked according to Fitzpatrick's criteria as light, moderate and dark brown. Global DNA methylation and hydroxymethylation and DNA methylation at specific sites analyses were performed using an ELISA and MSP, respectively. **Results:** no significant differences in global DNA methylation and hydroxymethylation levels were found between the skin areas, skin type or age. However, gender-related differences were detected, where women showed higher methylation levels in comparison to those in men. Global DNA methylation levels were higher than hydroxymethylation levels, and the levels of these DNA modifications correlated in skin tissue. For specific sites, it was detected no differences among areas. Additional analyses showed no differences in the methylation status when age, gender and skin type were considered; however, the methylation status of the *miR-9-1* gene seems to be gender related. **Conclusion:** sun exposure does not induce changes in the global DNA methylation and hydroxymethylation status or at specific sites in the *miR-9-1*, *miR-9-3* and *MTHFR* genes for skin types studied.

Keywords: epigenetic, methylation, hydroxymethylation, sun exposure, *MTHFR*, microRNA, skin

Introduction

Continuous exposure to ultraviolet (UV) radiation leads to lesions in the nuclear and mitochondrial genomic DNA in human skin cells, as well as to the generation of reactive oxygen species, thereby generating various deleterious effects, such as erythema, photoaging, immunosuppression and cancer.¹ Given that skin cancer is associated with epigenetic changes, a current concern of the scientific community is how exposure to solar radiation can affect our epigenome.² However, studies that address the effects of solar radiation on our epigenome remain scarce and controversial

Epigenetic changes represent the interface between the genome and the environment, and they are heritable, reversible, and do not alter the primary sequence of the DNA.³ DNA methylation is one of the most common epigenetic modifications, and it is characterised by being able to balance stability with plasticity, tissue-specificity, and potentially varying with age and environmental exposures.^{4,5} It consists of a covalent modification of DNA in which a methyl group (CH₃) is transferred from S-adenosylmethionine (SAM) to a cytosine that precedes a guanine (CpG dinucleotide). It is catalyzed by a family of specific enzymes called DNA methyltransferases (DNMTs). Recent studies have reported that aberrant methylation profiles of gene promoters represent a major mechanism associated with gene inactivation, contributing to the initiation and progression of various diseases, including skin cancer.^{6,7}

In addition to DNA methylation, other epigenetic mechanisms are responsible for the integrity and regulation of gene expression such as: DNA hydroxymethylation; methylation, phosphorylation and acetylation of the N-terminal tails of histone proteins and non-coding RNAs.^{6,8} 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) is generated by oxidation of 5-methylcytosine (5-mC) through the action of TET enzymes (Ten-Eleven translocation). 5-hmC is responsible for regulating gene transcription in the short and long term for the maintenance of unmethylated DNA in gene promoters, and they are considered one of the key molecules involved in the process of DNA demethylation.^{9,10}

Cells have developed a system that involves a group of small non-coding endogenous RNAs (known as microRNAs) to negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level by degrading or blocking mRNA translation.¹¹ It is estimated that these molecules regulate the expression of more than 50% of human genes, and it was estimated that approximately 10% of miRNAs are epigenetically regulated by DNA methylation.^{12,13} It was reported that microRNAs can act as oncogenes or tumour suppressors depending on the cell type in which they are expressed.¹⁴ Epigenetic regulation of microRNAs has been

considered a major bet of current research due to their important roles in the silencing of genes involved in cell proliferation, differentiation, apoptosis and carcinogenesis.^{15,16}

In particular, the family of microRNAs called *miR-9*, presents three independent *loci* in DNA including *miR-9-1* located on chromosome 1q22, *miR-9-2* located on chromosome 5q14.3 and *miR-9-3* located on chromosome 15q26. They are an interesting family because their association with skin cancer has been demonstrated.¹⁷

The methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene is located on chromosome 1 and encodes the methylenetetrahydrofolate reductase enzyme involved in folate metabolism. *MTHFR* is essential for metabolic pathways generating S-adenosylmethionine (SAM), which is the most important methyl donor for DNA.¹⁸ Most of the studies focusing on *MTHFR* have considered polymorphisms, and some of them have shown an association with DNA methylation changes.¹⁹

The mechanisms governing how external factors affect the methylation profiles of the *miR* and *MTHFR* genes are poorly explored. However, studies have shown that a variety of environmental factors, including solar radiation, can influence microRNA expression, suggesting that they are valuable novel biomarkers for exposure.^{20,21} For *MTHFR* gene, it was shown that exposure to arsenic can change their methylation profile.²²

In this context, the aim of this study was to investigate the influence of sun exposure on global DNA methylation and hydroxymethylation and at specific sites of the *miR-9-1*, *miR-9-3* and *MTFHR* genes in subjects with no history of skin disease. The basis of the study was that changes in epigenetic profiles could be used as markers of changes related to sun exposure.

Materials and methods

Ethics statement and subject population

The study was performed in accordance with the Ethics Committee in Research of the Federal University of Paraiba (protocol number 430/2011) and with the Helsinki Declaration of 1975. Twenty-four corpses of both genders of individuals ranging from 16–89 years of age at the time of their death were included. The corpses were obtained from the Brazilian Service of Death Investigation. Written informed consent for participation was obtained from all families. The demographic data and general health were obtained via records and did not include individuals with smoking habits or a medical history of skin diseases. Skin samples were collected and ranked according to Fitzpatrick's criteria.²³ by two observers and

confirmed by skin type declaration in the record of each individual.

Sample collection and genomic DNA extraction

Biopsies were collected from the 24 corpses by punch (5-mm diameter) from the outer forearm (sun-exposed area) and inner arm (sun-protected area) of each corpse, up to 10 hours after death. Immediately after removal, the biopsies (epidermis and dermis) were stored in a tube containing 800 μ L of RNAholder (Bioagency, São Paulo, SP, Brazil) and frozen at -20°C until DNA extraction. Afterwards, the genomic DNA of skin biopsies was purified using the TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) following the manufacturer's recommendation and using a tissue homogeniser. DNA quantification was performed using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific). The samples were then frozen at -20°C until further analysis.

Global DNA methylation and hydroxymethylation quantification

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 the respective capture monoclonal antibodies [5-mC- 1:125 (Merck Millipore) and 5-hmC- 1:2000 (Epigentek)]. Coating, Wash, Stop and Blocking Solutions and detection antibodies were provided by the Protein Detector Kit™ ELISA (KPL Inc.) and used according to the manufacturer's recommendations. The optical density was read at 405 nm using a microplate reader Multiskan GO™ Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). The relative percentage of global DNA methylation and hydroxymethylation was derived by subtracting the optical density of the positive controls for both modifications studied, methylated or hydroxymethylated DNA (5-Methylcytosine & 5-hydroxymethylcytosine DNA Standard Set-Zymo Research) on the optical density of each sample.²⁴ All analyses were performed in duplicate and the average was reported.

DNA methylation analysis of the promoters of the *miR-9-1*, *miR-9-3* and *MTHFR* genes

DNA methylation analysis of specific sites was performed using methylation-specific PCR (MSP). Bisulfite modification of genomic DNA (500 ng) was performed with the CpGenome™ Turbo Bisulfite Modification Kit (Merck Millipore), according to the manufacturer's instructions. Each MSP reaction incorporated 100 ng of bisulfite-modified DNA, 1 µL (10 µM) of each primer and 1 × Go Taq 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.^{25,26} (Table 1). Methylated DNA (Methylated Control DNA, Sigma Aldrich) and unmethylated (CpGenome Universal Unmethylated DNA, Merck Millipore) were modified, as previously described, and amplified by PCR as control reactions with primers for the methylated and unmethylated condition, respectively. All reactions were performed in duplicate, and amplified PCR samples (10 µL) were loaded in 6% polyacrylamide gels and subjected to electrophoresis. DNA bands were detected after silver staining.

Statistical analysis

To evaluate the differences in DNA methylation among sun-exposed and sun-protected skin areas, a paired non-parametric McNemar test was used for specific methylation and a paired t-test was used for global methylation and hydroxymethylation. Differences between methylation and hydroxymethylation levels in the skin were analysed with a t-test, and a Pearson correlation test was used for correlation analysis. Additional tests to evaluate the influence on age, gender and skin type were performed using t-tests and ANOVA. All analyses were performed using Bioestat 5.0 software (Pará- Brazil) at a 5% level of significance.

Results

Demographic and skin type data are shown in Table 2.

Global DNA methylation and hydroxymethylation

Quantification of 5-mC and 5-hmC levels showed no significant difference between the sun-exposed and sun-protected skin areas (5-mC = 16.9 % and 17.3%; 5-hmC = 11.4% and 11.3%; $p > 0.05$). However, 5-mC levels were higher in comparison to 5-hmC levels ($p < 0.0001$) in skin cells. In addition, a significant correlation was found between %methylation and %hydroxymethylation ($p < 0.0001$) (Fig. 1A). Females presented a higher methylation level (18.4%) in comparison to that of men (15.1%) ($p = 0.03$), while no differences were observed for DNA hydroxymethylation ($p > 0.05$) (Fig. 1B). In relation to age and skin type, no differences were observed for both DNA methylation and hydroxymethylation ($p > 0.05$) (Figs. 1C and D).

DNA methylation at specific sites

miR-9-1- no significant differences were observed between areas because out of a total of 17 samples, only six (35.3%) showed differences between sun-exposed and sun-protected areas [2 methylated in SE (11.8%) and 4 methylated in SP (23.5%)], and most (64.7%) had the same condition for both areas [7 methylated (41.2%) and 4 unmethylated (23.5%); $p = 0.68$] (Fig. 2A and D).

miR-9-3- no significant differences were observed between areas because out of a total of 21 samples, only five (23.8%) showed differences between sun-exposed and sun-protected areas [1 methylated in SE (4.8%) and 4 methylated in SP (19%)], and most had the same condition for both areas [16 unmethylated (76.2%) ($p = 0.37$)] (Fig. 2B and E).

MTHFR- no significant differences were found between areas because out of a total of 14 samples, only one (7.2%) showed differences between sun-exposed and sun-protected areas (1 methylated in SP and unmethylated in SE), and most had the same condition for both areas [13 methylated (92.8%) ($p = 1$)] (Fig. 2C and F).

Figure 2G shows the analysis of the three genes, emphasizing the frequency of discordant samples (samples with different profiles in sun-exposed and sun-protected areas) and concordant samples (samples with same profile in sun-exposed and sun-protected areas).

Discussion

Beside UV radiation is crucial for the synthesis of vitamin D in the skin and other physiological aspects of the human life, it has been currently considered one of the most potent carcinogens to which the human population is exposed.²⁷ Furthermore, the intensity of ultraviolet UV sun radiation on Earth's surface has been consistently increasing and correlates with an increased incidence of skin cancer.²⁸ Therefore, the detection of genomic changes in non-tumoural cells may be a powerful marker to predict a malignant state.

Global DNA methylation and hydroxymethylation

In the present study, differences in global DNA methylation levels between sun-exposed and sun-protected skin areas were not observed (Fig. 1A). Furthermore, there were no detectable differences in global methylation levels in relation to age and skin type (Figs. 1C and D). It has also been shown that the human keratinocytes chronically exposed to UV radiation presents a specific methylation pattern.²⁹ In contrast, another study reveals that UVB irradiation of keratinocytes has no recognisable global effect on DNA methylation patterns.³⁰ In samples obtained from human sun-exposed arm areas, the global DNA hypomethylated condition appeared to be more frequent in comparison to that of sun-protected skin areas.^{31,32} Grönniger *et al.*³¹ has already shown on a genome-scale level, that aging and sun exposure of human skin are characterised by distinct epigenetic variations, with aging associated with hypermethylation at specific sites and sun-exposure associated with global hypomethylation, which was more pronounced in the epidermis. However, the types of skin samples used were not reported. In addition, they reported that age-related changes were more pronounced than sun-exposure related changes. More recently, large blocks of hypomethylated genomic material were observed in nonmalignant skin in older and sun-exposed epidermal samples, however, the authors limited the samples to Caucasian donors.³² In the present study, it was not possible to separate dermis and epidermis and, therefore, the levels of global DNA 5-mC and 5-hmc for keratinocytes and fibroblasts were analysed together. In contrast, we analysed samples of individuals that represent the Brazilian population, classified as light, moderate and dark brown (type III, IV and V) according to Fitzpatrick's criteria²³, and the study cited analysed Caucasian sample as type II. This type of skin is more sensitive to the sun and, therefore, more likely to undergo epigenetic changes. The fact we did not find differences in relation to age can be explained by small

sample size of young people which may influence the statistical analysis, and perhaps also the fact that we have not separate dermis and epidermis, since changes reported in the literature were more pronounced in the epidermis.³¹

We detected differences in relation to gender with women showing higher global methylation levels than men (Fig. 1B). Godderis *et al.*³³ did not observe significant differences in global DNA methylation levels in the blood and saliva between males and females, however the sample size was limited (4 males and 10 females).

In relation to hydroxymethylation, to the best of our knowledge, this is the first study to report levels of global DNA hydroxymethylation in sun-exposed and sun-protected skin areas and to reveal that there are no differences between them (Fig. 1A). Studies focussing on the influence of environmental factors on the DNA global hydroxymethylation profile are unexplored, however, a recent study showed that exposure to arsenic is associated with changes in these levels.²² The levels of 5-hmC have previously been shown to be an important hallmark of human melanoma, in which there is a reduction of 5-hmC levels in comparison to that in mature melanocytes.³⁴ In addition, hydroxymethylcytosine is a useful marker to differentiate between malignant melanomas and benign melanocytic *nevi*.³⁵

In the present study, it was shown that DNA global methylation levels are significantly higher in comparison to hydroxymethylation levels ($p < 0.0001$; Fig. 1A). In fact, DNA methylation is the predominant epigenetic modification and as well as 5-mC, the 5-hmC is also tissue-specific³⁶. We also detected a correlation between 5-mC and 5-hmC levels in the skin tissue ($p < 0.0001$; Fig. 1A). Godderis *et al.*³³ observed that global DNA methylation and hydroxymethylation levels were correlated in saliva but not in blood. It was previously proposed that the balance between 5-mC and 5-hmC levels is involved in the balance between cellular pluripotency and lineage commitment.³⁷ The correlation of the two bases support the hypothesis that the 5-hmC acts as an intermediary of active demethylation of 5-mC.

It is known that both global and site-specific DNA methylation profiles are influenced by aging.^{38,39} Currently, global DNA hydroxymethylation is being characterised as a strong and reproducible trademark of chronological age, potentially acting on assessment of health and disease prevention.⁴⁰ Truong *et al.*⁴¹ recently reported that the level of hydroxymethylation in peripheral blood T cells from humans is dependent on age and is associated with a gradual decrease of TET3 expression levels during aging. However, in our study, we detected no influence of age on DNA global methylation and hydroxymethylation levels in skin tissue (Fig. 1D). In relation to skin tissue, it was previously suggested that age-

related changes are more pronounced at specific sites than on the global DNA profile ³¹, and this may also be true for hydroxymethylation levels.

DNA methylation at specific sites

For the *miR-9-1* gene, our data show that the methylated condition for both sun-exposed and sun-protected skin areas was the most frequent (41.2%); however, 23.5% of the samples showed an unmethylated condition. Given the lack of influence of sun exposure on this profile, the differences could be explained by age, skin type or gender. However, it was also observed that age and skin type did not influence this profile, because for the methylated samples (41.2%), in individuals ranging from 30 to 89 years old 17.6% had skin type III, 11.8% skin type IV, and 11.8% skin type V.

However, gender may be a factor that influences the DNA methylation profile of this gene because we observed that the methylated profile included 29.4% women out of a total of 41.2% individuals. However, a study with a larger sample size is required to validate this hypothesis. Our group has previously demonstrated that the methylated profile of *miR-137* in skin samples is also associated with female gender.⁴² In fact, female gender has been demonstrated to be positively associated with DNA methylation for some genes.^{43,44} For unmethylated samples, we observed that aging, gender or skin type did not influence this profile. Other intrinsic factors, such as genetic polymorphisms ^{19,45} or even a combination of several intrinsic factors, could explain the variability in methylated and unmethylated *miR-9-1* profiles among the skin samples of individuals.

For samples with different methylation profiles between areas (35.3%), both methylated (11.8%) and unmethylated (23.5%) profiles were observed in sun-exposed skin areas. This suggests that factors in addition to sun exposure, such as exposure to chemical agents, occupation and habits, may have influenced the methylation profile. However, there is insufficient information to validate this hypothesis.

Cheng & Cho ⁴⁶ suggest that dermatologists are practiced skeptics of the dogma “one genome per individual” because genetic diversity within individuals reveals itself routinely in skin cells. For example, there are mosaic presentation conditions such as *incontinentia pigmenti*, McCune-Albright disease, localized lesions of neurofibromatosis, Darier disease, and even the abundant nevi harbouring BRAF mutations.^{47,-50} We risk to say “one epigenome per individual” is even more pronounced, since the epigenome is influenced by both intrinsic and extrinsic factors and every individual is exposed to different conditions and the

combination of these factors can lead to a variety of epigenome profiles. We suggest this is the basis for the *miR-9-1* epigenetic profile given the presence of four observed methylation profiles (Fig. 2), indicating that other environmental factors in addition to sun exposure can influence the methylation profile of this gene. Our experience in studying the epigenome of skin cells shows that the methylation status of a particular microRNA can be influenced by a variety of factors in addition to sun exposure and gender. This is based on evidence that in addition to the four different *miR-9-1* methylation profiles among the individuals analysed in the present study, there were five different *miR-137* methylation profiles previously observed in a sample of 30 individuals.⁴² Therefore, epigenome profiles can vary both among various cell types and within a particular individual, which then may lead to unique epigenome profiles associated with a particular disease state. This finding reinforces the issue of the significant influence of intrinsic and extrinsic factors on epigenetic profiles, and it should be used as a basis for the individualization of drug therapies.

Our data shows that sunlight exposure does not influence the DNA methylation profiles of the *miR-9-3* and *MTHFR* genes based on the similar frequencies of the unmethylated and methylated conditions for both skin areas for *miR-9-3* and *MTHFR*, respectively (Fig. 2). The high frequencies show that age, gender and skin type also do not influence the methylation profile of these genes.

A comparison of the frequency of concordant and discordant profile between skin areas for the three genes revealed that *miR-9-1* may be the most susceptible to intrinsic or extrinsic factors. Although *miR-9-1* showed no difference between skin type areas, it showed the highest frequency of differences among sun-exposed and sun-protected skin areas (35.3%), and its methylation status was distributed in four profiles suggesting that this gene may be susceptible to intrinsic or extrinsic factors, including gender.

Furthermore, the methylation analysis for the *miR-9-3* and *MTHFR* genes showed that unmethylated and methylated DNA is a common profile of skin cells for these genes, respectively, because it was observed in both areas and in more than 70% of the cases, in contrast to *miR-9-1* (Fig. 2G). In contrast to *miR-9-1* profiles, those of *miR-9-3* and *MTHFR* showed a homogeneity between cells in the dermis and epidermis.

According to controversial data that UV radiation can lead to global methylation changes^{29,30}, this is also true for specific sites since some studies have shown differences among sun-exposed and sun-protected skin areas and others not.^{31,42} Grönniger et al.³¹ has already shown that sun exposure of human skin is associated with hypermethylation at

specific sites which was more pronounced in the epidermis. Another study of our group has shown no influence in the methylation profile of four genes ⁴².

So, inconsistencies can be explained by skin types studied (Grönniger et al.,³¹ although not reveal the type of skin, the study was conducted in Europe, where individuals are mostly caucasians (skin type II), in contrast with our studies (previous ⁴² and present) wich was performed with skin type II, IV and V), population exposure levels (we do not know the dress habits of the studied population), study designs (Grönniger et al.,³¹ separated dermis and epidermis and our group did not; Grönniger et al., performed Array-based methylation analysis and Bisulfite sequencing, in contrast with ELISA and MSP performed by our group) or in fact this changes can be observed in just some genes and even the genes evaluated in this study may present others CpG sites more susceptible to sun radiation.

Conclusion

We conclude that sun exposure does not influence the DNA methylation status at specific sites of the *miR-9-1*, *miR9-3* and *MTHFR* genes, as well as the global DNA methylation and hydroxymethylation levels in individuals with light, moderate or brown skin types. However, it was detected female-related global methylation levels. In addition, global methylation levels were higher in comparison to hydroxymethylation levels, and the 5-mC and 5-hmC levels are correlated in skin tissue.

Acknowledgments

This study was supported by the Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, Brazil. Mikaelly B da Silva, Alanne RS Melo, Haline Barroso and Ludimila A Costa were supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). We thank the Brazilian Service of Death Investigation (João Pessoa/PB) and all of the families of the study population for allowing the collection of skin samples.

Conflict of interest

None

References

1. Cadet J, Sage E, Douki T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research* 2005; **571**: 3-17.
2. Greenberg ES, Chong KK, Huynh KT, *et al.* Epigenetic Biomarkers in Skin Cancer. *Cancer Lett* 2014; **342**: 10-1016.
3. Ushijima T, Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. *Cancer Sci* 2010; **101**:300.
4. Farré P, Jones JM, Meaney JM, *et al.* Concordant and discordant DNA methylation signatures of aging in human blood and brain. *Epigenetics & Chromatin* 2015; **8**:19.
5. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in Cancer. *Carcinogenesis* 2010; **31**:1.
6. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; **28**:1057-68.
7. Schinke C, Mo Y, Yu Y, *et al.* Aberrant DNA methylation in malignant melanoma. *Melanoma Res* 2010; **20**:253-265.
8. Davalos V, Esteller M. MicroRNAs and cancer epigenetics: a macrorevolution. *Curr Opin Oncol* 2010; **22**:35-45.
9. Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes & Development* 2011; **25**:2436-52.
10. Dahl C, Grønbaek K, Guldberg P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clinica Chimica Acta* 2011; **412**:831-836.
11. Baer C, Claus R, Plass C. Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer. *Cancer research* 2013; **73**:473-477.
12. Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, *et al.* DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol* 2007; **6**:1284-8.
13. Tsai KW, Liao YL, Wu CW, *et al.* Aberrant hypermethylation of miR-9 genes in gastric cancer. *Epigenetics* 2011; **6**:1189-1197.
14. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; **23**:175-205.
15. Meola N, Gennarino VA, Banfi S. microRNAs and genetic diseases. *Pathogenetics* 2009; **2**:7.
16. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* 2011; **12**:99-110.
17. Shiiyama R, Fukushima S, Jinnin M, *et al.* Sensitive detection of melanoma metastasis using circulating microRNA expression profiles. *Melanoma Res* 2013; **23**:366-72.
18. Matthews RG, Sheppard C, Goulding C. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *Eur J Pediatr* 1998; **157**:S54–S59.

19. Weiner AS, Boyarskikh UA, Voronina EN, *et al.* Methylenetetrahydro-folate reductase C677T and methionine synthase A2756G polymorphisms influence on leukocyte genomic DNA methylation level. *Gene* 2014; **533**:168-72.
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. Deeba N, Syed MIK, Shabbir M, *et al.* MicroRNAs in Skin Response to UV Radiation. *Curr Drug Targets* 2013; **14**:1128-1134.
22. Tellez-Plaza M, Tang WY, Shang Y, *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**(9): 946-54.
23. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988; **124**:869-71.
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. Khazamipour N, Noruzinia M, Fatehmanesh P, *et al.* *MTHFR* promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role epigenetics in male infertility. *Hum Reprod* 2009; **24**:2361-4.
26. Wang LQ, Kwong YL, Kho CS, *et al.* Epigenetic inactivation of *miR-9* family microRNAs in chronic lymphocytic leukemia--implications on constitutive activation of NF κ B pathway. *Mol Cancer* 2013; **12**:173.
27. Tsilimigaki SI, Messini-Nikolaki N, Kanariou M, *et al.* A study on the effects of seasonal solar radiation on exposed populations. *Mutagenesis* 2003; **18**:139-43.
28. Bharath AK and Turner RJ. Impact of climate change on skin cancer. *J R Soc Med* 2009; **102**: 215-218.
29. Chen IP, Henning S, Faust A, *et al.* UVA-induced epigenetic regulation of P16(INK4a) in human epidermal keratinocytes and skin tumor derived cells. *Photochem Photobiol Sci* 2012; **11**:180-90.
30. Chen IP, Henning S, Faust A, *et al.* UVA-induced epigenetic regulation of P16(INK4a) in human epidermal keratinocytes and skin tumor derived cells. *Photochem Photobiol Sci* 2012; **11**:180-90.
31. Grönninger E, Weber B, Heil O, *et al.* Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *PLoS Genet* 2010; **6**:e1000971.
32. Vandiver AR, Irizarry RA, Hansen KD, *et al.* Age and sun exposure related widespread genomic blocks of hypomethylation in nonmalignant skin. *Genome Biol* 2015; **16**:16:80.
33. Godderis L, Schouteden C, Tabish A, *et al.* Global methylation and hydroxymethylation in DNA from blood and saliva in healthy volunteers. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 845041.
34. Lian CG, Xu Y, Ceol C, *et al.* Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* 2012; **150**(6):1135-46.

35. Uchiyama R, Uhara H, Uchiyama A, *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine as a useful marker to differentiate between malignant melanomas and benign melanocytic nevi. *J Dermatol Sci* 2014; **73**(2):161-3.
36. Kinney SM, Chin HG, Vaisvila R, *et al.* Tissue-specific Distribution and Dynamic Changes of 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian Genomes. *J Biol Chem* 2011; **286**(28): 24685-24693.
37. Ficiz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, *et al.* Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 2011; **473**(7347):398-402.
38. Bezerra SFO, LA Costa, De Freitas PAN, *et al.* Age-related Changes in DNA Methylation Status of hTERT Gene Promoter of Oral Epithelial Cells. *Braz Arch Biol Technol* 2015; **58**:1.
39. Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* 2015; **14**(6): 924-932.
40. Xiong J, Jiang HP, Peng CY, *et al.* DNA hydroxymethylation age of human blood determined by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/mass spectrometry. *Clinical Epigenetics* 2015; **7**:72.
41. Truong TP, Sakata-Yanagimoto M, Yamada M, *et al.* Age-dependent decrease of DNA hydroxymethylation in human T cells. *J Clin Exp Hematop* 2015; **55**:1.
42. Da Silva Melo AR, Barroso H, Uchôa De Araújo D, *et al.* 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**(5):436-43
43. D'Aquila P, Giordano M, Montesanto A, *et al.* Age-and gender-related pattern of methylation in the *MT-RNR1* gene. *Epigenomics* 2015; **7**:707-16.
44. Langevin SM, Stone RA, Bunker CH, *et al.* 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.
45. Arakawa Y, Watanabe M, Inoue N, *et al.* Association of polymorphisms in *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MTHFR* and *MTRR* genes with global DNA methylation levels and prognosis of autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 2012; **170**:194-201.
46. Cheng JB and Cho RJ. Genetics and epigenetics of the skin meet deep sequence. *J Invest Dermatol* 2012; **32**:923-32.
47. Rieger E, Kofler R, Borkenstein M, *et al.* Melanotic macules following Blaschko's lines in McCune-Albright syndrome. *Br J Dermatol* 1994; **130**:215-220.
48. Kehrer-Sawatzki H, Cooper DN. Mosaicism in sporadic neurofibromatosis type 1: variations on a theme common to other hereditary cancer syndromes? *J Med Genet* 2008; **45**: 622-631
49. Harboe TL, Willems P, Jespersgaard C, *et al.* Mosaicism in segmental darier disease: an in-depth molecular analysis quantifying proportions of mutated alleles in various tissues. *Dermatology* 2011; **222**:292-296.
50. Lin J, Goto Y, Murata H, *et al.* Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression. *Br J Cancer* 2011; **104**:464-468.

Table 1. Primers sequences and MSP analysis conditions for *miR-9-1*, *miR-9-3* and *MTHFR* genes.^{25,26}

Gene	Primer (5'-3') F/R	Fragment Size (bp)	Anneling Temperature (°C)	Cycles
<i>miR-9-1</i>	tataagggttcgttcgttttaac (M) acccgtcaccgaaaaaaa (M)	110	55 (40 sec)	35
	ggttttgtttgttttaatgt (U) caacccaaaccttaccttcaac (U)	110	60 (40 sec)	35
<i>miR-9-3</i>	attggctgatttttgattgac (M) cgcttaaaaaacctcgaacg (M)	116	58 (1 min)	35
	gattggttgatttttgattgat (U) caaaacacttaaaaaacctcaaca (U)	116	55 (1 min)	35
<i>MTHFR</i>	tagatttaggtaggtgaagtaggtagac(M) gaaaaactataaaaaacggacgaa(M)	180	58 (40 sec)	40
	ttaggtatgtgaaatagggtagatgt (U) caaaaaactataaaaaaccaacaaa (U)	180	58 (40 sec)	40

*F-Forward, R-Reverse, M-methylated, U-methylated, MSP- Methylation Specific PCR.

Table 2. Demographic and skin type data in studied population.

DNA modification /Gene	n	Age (Mean ± SD)	Gender (Male/Female)	Skin Type (number of individuals for each skin type)
Global DNA methylation and hydroxymethylation	24	57.9±21.6	11/13	09- type III; 10- type IV; 05- type V
<i>miR-9-1</i>	17	57.8±20.9	7/10	06- type III; 07- type IV; 04- type V
<i>miR-9-3</i>	21	56.1±21.3	10/11	08- type III; 09- type IV; 04- type V
<i>MTHFR</i>	14	58.5±21.8	5/9	06- type III; 04- type IV; 04- type V

Type III: light brown, type IV: moderate brown and type V: dark brown. We collected samples of 24 corpses, but some samples are not available for amplification or showed no fragments after PCR amplification, and were excluded from the study.

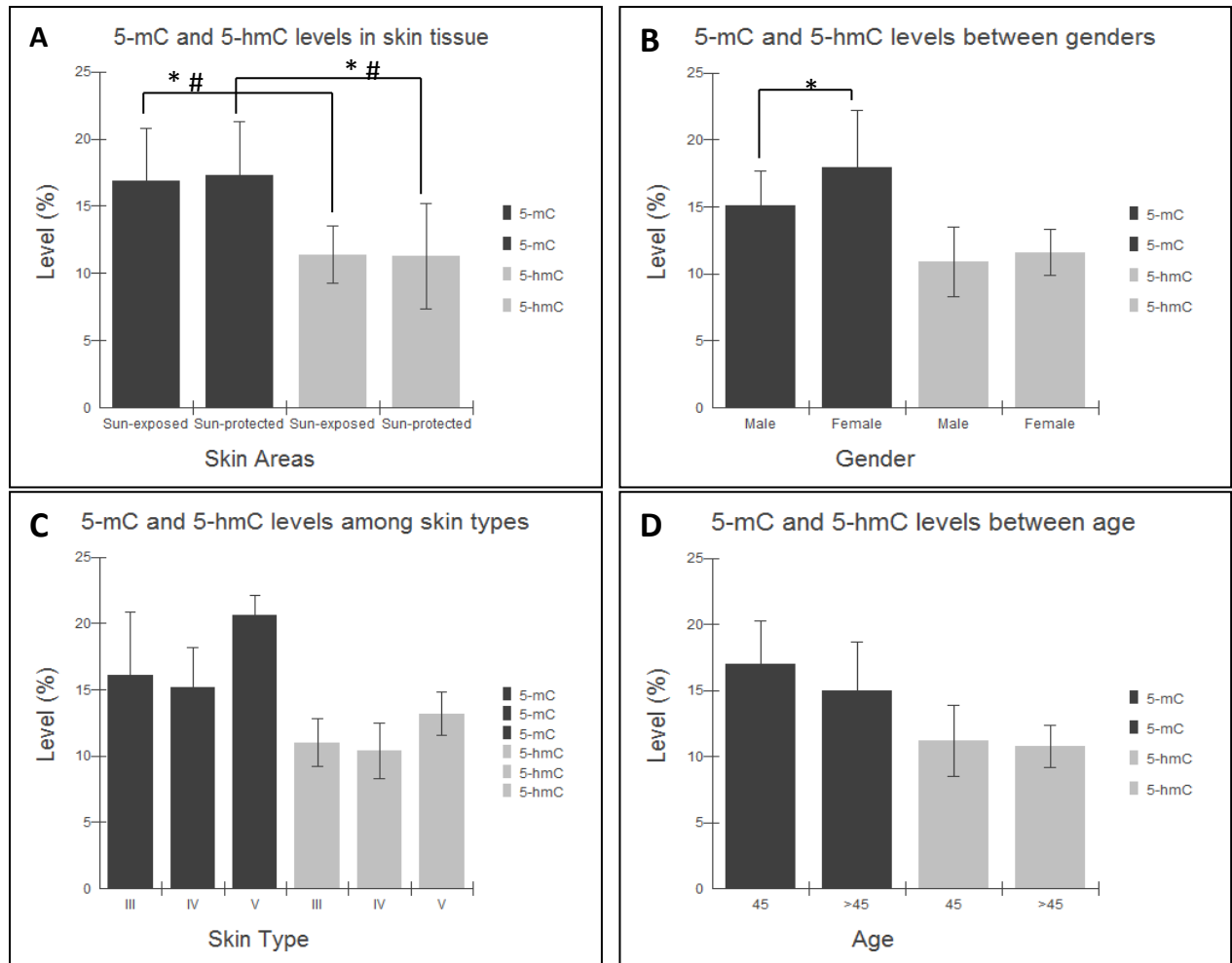


Fig 1- Global DNA methylation and hydroxymethylation level in skin tissue. Data are presented as mean and standard deviation. **(A)** Methylation and hydroxymethylation among sun-exposed and sun-protected skin areas ($p>0.05$; Paired t test). Methylation *versus* hydroxymethylation in the skin ($*p<0.0001$; T test). Correlation of methylation and hydroxymethylation ($\#p<0.0001$; Pearson Correlation). **(B)** Global DNA methylation and hydroxymethylation between genders ($p=0.03$; T test). **(C)** Global DNA methylation and hydroxymethylation among skin types ($p>0.05$; ANOVA). **(D)** Global DNA methylation and hydroxymethylation between age ($p>0.05$; T test). $n=24$, SE - sun-exposed, SP - sun-protected, III-light brown, IV- moderate brown, V-dark brown.

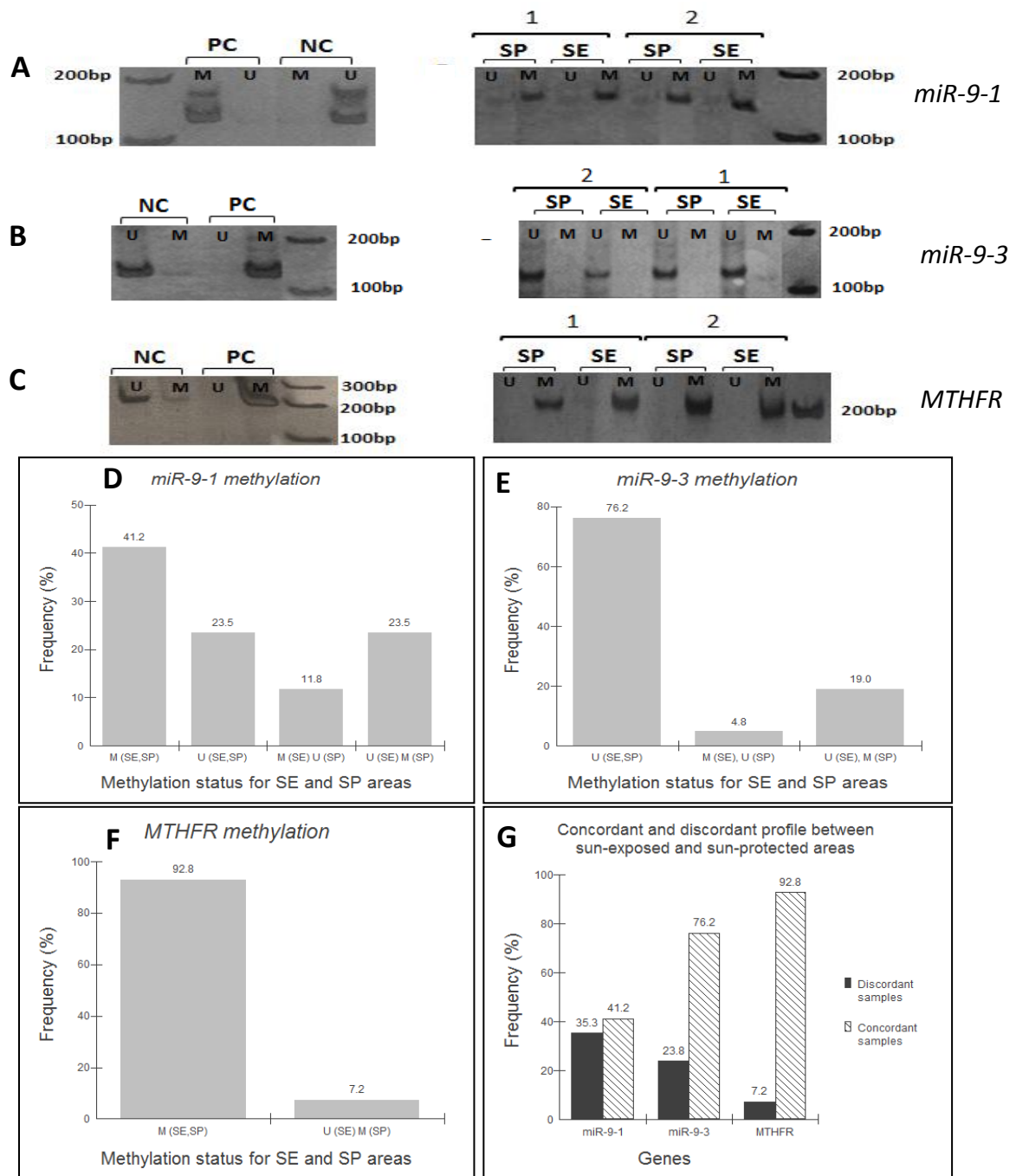


Fig 2- DNA methylation analysis of *miR-9*-, *miR-9-3* and *MTHFR* promoter of skin tissue. **A)** Bands of positive (methylated) and negative (unmethylated) control DNA, showing specific amplification for methylated and unmethylated conditions for *miR-9-1* and bands of two representative samples obtained after polymerase chain reaction (110 bp). **B)** Bands of positive (methylated) and negative (unmethylated) control DNA, showing specific amplification for methylated and unmethylated conditions for *miR-9-3* and bands of two representative samples obtained after polymerase chain reaction (116 bp). **C)** Bands of positive (methylated) and negative (unmethylated) control DNA, showing specific amplification for methylated and unmethylated conditions for *MTHFR* and bands of two representative samples obtained after polymerase chain reaction (180 bp). **D)** Methylation frequency for *miR-9-1* (n=17, p>0.05; McNemar). **E)** Methylation frequency for *miR-9-3* (n=21, p>0.05; McNemar). **F)** Methylation frequency for *MTHFR* (n=14, p>0.05; McNemar). **G)** Methylation frequency of discordant samples (samples with different profile in sun-exposed and sun-protected areas) and concordant samples (samples with the most frequent profile in both sun-exposed and sun-protected areas: methylated for *miR-9-1* and *MTHFR* genes and unmethylated for *miR-9-3* gene). NC- negative control, PC- positive control, M - methylated, U - unmethylated, SE - sun-exposed, SP - sun-protected.

5. CONCLUSÃO

- A exposição solar não teve influência sobre o perfil de metilação e hidroximetilação global do DNA em amostras de pele humana do tipo III, IV e V. Entretanto, o nível de metilação global foi maior em comparação ao nível de hidroximetilação, e esses níveis estão correlacionados na pele.
- A exposição solar não teve influência sobre o perfil de metilação nos genes *miR-9-1*, *miR-9-3* e *MTHFR*, sendo a condição metilada, característica comum dos genes *miR-9-1* e *MTHFR*, enquanto a condição não metilada parece ser típica do gene *miR-9-3* em células da pele.
- Fatores intrínsecos como idade, gênero e tipo de pele não têm influência sobre o perfil de hidroximetilação global e sobre o perfil de metilação nos sítios específicos dos genes *miR-9-1*, *miR-9-3* e *MTHFR*, contudo, o gênero feminino tem influência sobre o perfil de metilação global, visto que, o nível de metilação foi maior no sexo feminino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABDEL-MALEK Z. et al. Contribution of melanogenic proteins to the heterogeneous pigmentation of human melanocytes. **J Cell Sci**, v. 106, n. 4, p. 1323-1331, 1993.
- ADALSTEINSSON, B.T. AND FERGUSON-SMITH, A.C. Epigenetic Control of the Genome - Lessons from Genomic Imprinting. **Genes**, v. 5, p. 635-655, 2014.
- ALLIS, D.; JENUWEIN, T.; REINBERG, D. Epigenetics. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2006.
- AMARO-ORTIZ, A. et al. Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. **Molecules**, v.19, n. 5, p. 6202–6219, 2015.
- AMBACH, W.; BLUMTHALER, M. Biological effectiveness of solar UV radiation in humans. **Experientia**, v. 49, n. 9, p. 747-53, 1993.
- ARÃO, T.C. et al. Increased miRNA-146a and miRNA-155 expressions in oral lichen planus. **Arch Dermatol Res**, v. 304, n. 5, p. 371-5, 2012.
- ARIOKA, Y. et al. Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins. **PloS one**, v. 7, n. 9, 2012.
- ATTWOOD, J.T.; YUNG, R.L.; RICHARDSON, B.C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 2, p. 241-57, 2002.
- AYALA-ORTEGA, E.; ARZATE-MEJÍA, R. et al. Epigenetic silencing of miR-181c by DNA methylation in glioblastoma cell lines. **BMC Cancer**, v. 16, n. 16(1), p.226, 2016.
- BALAGHI, M. AND WAGNER, C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 30, n. 193(3), p. 1184-90, 1993.
- BARTEL, D.P AND CHEN, C.Z. Micromanagers of gene expression: The potentially widespread influence of metazoan miRNAs. **Nat ver genet**, v. 5, n. 5, p. 396-400, 2004.
- BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. **The Journal of Pathology**, v. 211, n. 2, p. 241-51, 2007.
- BAYLIN, S.B.; JONES, P.A. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 10, p. 726-734, 2011.
- BERGER, S.L; KOUZARIDES, T.; SHIEKHATTAR,R.; SHILATIFARD, A. An operational definition of epigenetics. **Genes & development**, v. 23, p. 781-783, 2009.
- BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet**, v. 9, p. 2395-402, 2000.
- BIESALSKI, H. et al. Oxidative and premature skin ageing. **Exp Dermatol**, v. 12, p. 3-15, 2003.
- BOTEZATU, A. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) polymorphisms and promoter methylation in cervical oncogenic lesions and câncer. **J. Cell. Mol. Med**, v. 17, n. 4, 2013.

BOUWSTRA J.A. et al. Water distribution and natural moisturizer factor content in human skin equivalents are regulated by environmental relative humidity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 2, p. 378-88, 2008.

BRASH, D.E. et al. The DNA damage signal for Mdm2 regulation, Trp53 induction, and sunburn cell formation in vivo originates from actively transcribed genes. **J Invest Dermatol**, v. 117, n. 5, p. 1234-40, 2001.

BRENNER, M.; HEARING, V. J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. **Photochem Photobiol**, v. 84, n. 3, p. 539-549, 2008.

BUSHATI, N.; COHEN, S.M. microRNA functions. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p.175-205, 2009.

CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. **Mutation Research**, v. 571, p. 3-17, 2005.

CHEN, C.Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Engl J Med**, v. 353, p.1768-71, 2005.

CHEN, I.P. et al. UVA-induced epigenetic regulation of P16 (INK4a) in human epidermal keratinocytes and skin tumor derived cells. **Photochem Photobiol Sci**, v.11, n. 1, p. 180-90, 2012.

COSTA, E.B.O.; PACHECO, C. Epigenetics: gene expression regulation at transcriptional level and its implications. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 125-136, 2013.

COSTIN, G.E. AND HEARING, V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **The FASEB Journal**, n. 21, 2007.

CRUTZEN, P.J. Ultraviolet on the increase. **Nature**, v. 356, p. 104-105, 1992.

DAHL. C.; GRØNBÆK, K.; GULDBERG, P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 831-836, 2011.

DAMIAN, D.L. et al. An action spectrum for ultraviolet radiation-induced immunosuppression in humans. **Br J Dermatol**, v. 164, n. 3, p. 657-9, 2011.

DA SILVA MELO, A.R. et al. The influence of sun exposure on the DNA methylation status of *MMP9*, *miR-137*, *KRT14* and *KRT19* genes in human skin. **Eur J Dermatol**, v. 25, n.5, p.436-43, 2015.

DEEBA, N. et al. MicroRNAs in Skin Response to UV Radiation. **Curr Drug Targets**, n.14, p. 1128-1134, 2013.

DE FABO, E.C. Ultraviolet-B radiation and stratospheric ozone loss: potential impacts on human health in the arctic. **Int J Circumpolar Health**, v. 59, n. 1, p. 4-8, 2000.

- DHILLON, V.S.; SHAHID, M.; HUSAIN, S.A. Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. **Mol Hum Reprod**, v. 13, n. 4, p. 213-22, 2007.
- D’ORAZIO, J. et al. Review UV Radiation and the Skin. **Int. J. Mol. Sci**, v. 14, p. 12222-12248, 2013.
- EILERTSEN, K.J.; FLOYD, Z.E. AND GIMBLE, J.M. The Epigenetics of Adult (Somatic) Stem Cells. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 18, n. 3, p. 189-206, 2008.
- FARRÉ, P. et al. Concordant and discordant DNA methylation signatures of aging in human blood and brain. **Epigenetics & Chromatin**, v. 8, n. 19, 2015.
- FEINBERG, A.P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews: Cancer**, London, v. 4, p. 143 -153, 2004.
- FERRARI JÚNIOR, N.M. et al. Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 126, n. 1, p. 41–47, 2008.
- FISHER, G.J. et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Arch Dermatol**, v. 138, p.1462-1470, 2002.
- FITZPATRICK, T.B. The validity and practicality of sun reactive skin types I through VI. **Arch Dermatol**, v. 124, p. 869-871, 1988.
- FRIEDMAN, R.C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**, v. 19, p. 92-105, 2009.
- FUKUSHIGE, S.; KONDO, E.; HORII, A. Methyl-CpG targeted recruitment of p300 reactivates tumor suppressor genes in human cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 379, p. 1021-6, 2009.
- FUZIWARA, S.C AND KIMURA, E.T. MicroRNA Deregulation in Anaplastic Thyroid Cancer **International Journal of Endocrinology**, 2014.
- GAMBICHLER, T.; AREIA, M.; SKRYGAN, M. Loss of 5-hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation 2 protein expression in malignant melanoma. **Melanoma Res**, v. 23, n. 3, p. 218-20, 2013.
- GILHAR, A. et al. Ageing of human epidermis: the role of apoptosis, Fas and telomerase. **Br J Dermatol**, v. 150, p. 56-63, 2004.
- GOYETTE, P. et al. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Am. J. Hum. Genet**, v. 56, p. 1052- 1059, 1995.
- GRÖNNIGER, E. et al. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. **PLoS Genet**, v. 6, n. 5, 2010.

HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. Gene silencing in cancer is association with promoter hypermethylation. **The New England Journal of Medicine: Research & Review Art, Waltham**, v. 349, p. 2042-2054, 2003.

HUANG, Y. et al. The Behaviour of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite Sequencing. **America**, v. 5, n.1, 2010.

HUPPI, K. et al. MicroRNAs and Genomic Instability. **Semin Cancer Biol**, v. 17, n. 1, p. 65-73, 2007.

HWANG, E. et al. "Enzyme-modified *Panax ginseng* inhibits UVB-induced skin aging through the regulation of procollagen type I and MMP-1 expression." **Food and Function**, v. 5, n. 2, p. 265-274, 2014.

ICHIHASHI, M. et al. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, p. 21-39, 2003.

ITO, S. et al. Role of Tet proteins in 5-mC to 5-hmC conversion, ES-cell self renewal and inner all mass specification. **Nature**, v. 466, n.7310, p. 1129-33, 2010.

IZMIRLI, M. A literature review of *MTHFR* (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. **Mol Biol Rep**, v. 40, n. 1, p. 625-37, 2013.

JIN, B.; LI, Y. AND ROBERTSON, K.D. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? **Genes Cancer**, v. 2, n. 6, p. 607-617, 2011.

JONES, P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature reviews Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484-492, 2012.

JONGBLOET, P.H. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms resulting in suboptimal oocyte maturation: a discussion of folate status, neural tube defects, schizophrenia, and vasculopathy. **Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction**, v.5, n.5, 2008.

KIM, S.R. et al. Anti-wrinkle and anti-inflammatory effects of active garlic components and the inhibition of MMPs via NF- κ B signaling. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013

KIM, Y.J. et al. Thread Embedding Acupuncture Inhibits Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Photoaging in Hairless Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.9, 2015.

LAHTZ, C. et al. UVB irradiation does not directly induce detectable changes of DNA methylation in human keratinocytes. **F1000Res**, v. 1, n. 2:45, 2013.

LAING, M.E. et al. Aberrant DNA methylation associated with MTHFR C677T genetic polymorphism in cutaneous squamous cell carcinoma in renal transplant patients. **Br J Dermatol**, v. 163, n. 2, p. 345-52, 2010.

LIAN, C. G. et al. Loss of 5-Hydroxymethylcytosine Is an Epigenetic Hallmark of Melanoma. **Cell**, v. 150, p. 1135-1146, 2012.

LIU, S. et al. MicroRNA-9 up-regulates E-cadherin through inhibition of NF- κ B1–Snail1 pathway in melanoma. **J Pathol**, v. 226, n. 1, p. 61-72, 2012.

LLAVE, C. et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. **Science**, v. 297, n. 5589, p. 2053-6, 2002.

LUJAMBIO, A. et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. **PNAS**, v. 105, n. 36, 2008.

LY, A. et al. Folate and DNA Methylation. **Antioxid Redox Signal**, v. 17, n. 2, p. 302-26, 2012.

MACK, G.S. MicroRNA gets down to business. **Nat Biotechnol**, 2011.

MEERAN, S.M.; AHMED, A.; TOLLEFSBOL, O.T. Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. **Clin Epigenet**, v. 1, p. 101–116, 2010.

MEOLA, N.; GENNARINO, V.A.; BANFI, S. microRNAs and genetic diseases. **Pathogenetics**, v. 2, n. 7, 2009.

MILSTONE, L.M. Epidermal desquamation. **J Dermatol Sci**, v. 36, n.3, p.131-40, 2004.

MITTAL, A. et al. Exceptionally high protection of photocarcinogenesis by topical application of epigallocatechin-3-gallate in hydrophilic cream in SKH-1 hairless mouse model: Relationship to inhibition of UVB-induced global DNA hypomethylation. **Neoplasia**, v. 5, p. 555-565, 2003.

MURREL, A.; RAKY, A.N.; BECK, S. From genome to epigenome. **Hum Mol Genet**, v.14, n.1, p. 3-10, 2005.

NAIR-SHALLIKER, V. et al. The association between personal sun exposure, serum vitamin D and global methylation in human lymphocytes in a population of healthy adults in South Australia. **Mutat Res**, v. 765, p. 6-10, 2014.

NANDAKUMAR, V. et al. Aberrant DNA hypermethylation patterns lead to transcriptional silencing of tumor suppressor genes in UVB-exposed skin and UVB-induced skin tumors of mice. **Carcinogenesis**, v. 32, p. 597–604, 2011.

OLIVEIRA, J.C. Epigenetics and human diseases. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n.1, 2012.

OLIVEIRA, N.F.P. Epigenome Changes and the Smoking Habit. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n.4, p. 101-106, 2011.

OLIVEIRA, N.F.P et al. Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia** v. 6, n.4, 2010.

PAZ, M.F. et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. **Cancer Res**, v. 62, p. 4519-4524, 2002.

PFEIFER, G.P.; BESARATINIA, A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. **Photochem Photobiol Sci**, v. 11, n. 1, p. 90-7, 2012.

PHIL, F. et al. Methylation-dependent SOX9 expression mediates invasion in human melanoma cells and is a negative prognostic factor in advanced melanoma. **Genome Biology**, v. 16, n. 42, 2015.

QUAN, T. et al. Matrix-degrading Metalloproteinases in Photoaging. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 14, n. 1, p. 20-24, 2009.

RICHELLE, M. et al. Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 227-238, 2006.

RIGAL, J. et al. The effect of age on skin color and color heterogeneity in four ethnic groups. **Skin Res Technol**, v. 16, n. 2, p. 168-78, 2010.

ROBINS, A.H. **Biological Perspectives on Human Pigmentation**. Cambridge University Press, Cambridge, 1991.

RODRÍGUEZ-PAREDES, M.; ESTELLER, M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. **Nature Medicine**, v. 17, n. 3, p. 330-339, 2011.

ROSENBLATT, D.S. et al. The metabolic and Molecular bases of inherited Disease. **MacGraw-Hill-New York**, p. 3111-3128, 1995.

SAMPAIO, S.; RIVITTI, E. **Dermatologia**. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

SAND, M. et al. MicroRNAs and the skin: Tiny players in the body's largest organ. **Bechara a Journal of Dermatological Science**, v. 53, p. 169-175, 2009.

SATO, F. et al. MicroRNAs and epigenetics. **FEBS Journal**, v. 278, p. 1598-1609, 2011.

SATHYANARAYANA, U.G. et al. Sun exposure related methylation in malignant and non malignant skin lesions. **Cancer Lett**, v. 8, n. 245(1-2), p.112-20, 2007.

SCHINKE, C. et al. Aberrant DNA methylation in malignant melanoma. **Melanoma Res**, v. 20, n. 4, p. 253-265, 2010.

SHARMA, S.; KELLY, T.K.; JONES, P.A. Epigenetics in Cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, 2010.

SHAH, M.A. et al. A global assessment of cancer genomic alterations in epigenetic mechanisms. **Epigenetics & Chromatin**, v.7, n. 29, 2014.

SIBANI S. et al. Characterization of Six Novel Mutations in the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in Patients With Homocystinuria. **Human Mutation**, v. 15, n. 280287, 2000.

SMITH, Z.D.; MEISSNER, A. DNA methylation: roles in mammalian development. **Nat Rev Genet**, v. 3, p. 204-20, 2013.

SUTER, C.M.; MARTIN, D.I.; WARD, R.L. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. **Nat Genet**, v. 36, n. 5, p. 497-501, 2004.

TAHILIANI, M. et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hidroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET 1. **Science**, v.324, n. 5929, p 930-5, 2009.

TANNOUS, M.A. **O papel da proteína SET no perfil de metilação do *miR-9* e no reparo de DNA em células humanas de carcinoma espinocelular oral**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências aplicadas à farmácia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

TELLEZ-PLAZA, M. et al Association of global DNA methylation and global DNA hydroxymethylation with metals and other exposures in human blood DNA samples. **Environ Health Perspect**, v. 122, n. 9, p. 946-54, 2014.

TSAI, K.W. et al. Aberrant hypermethylation of miR-9 genes in gastric cancer. **Epigenetics**, v. 6, n. 10, p.1189-1197, 2011.

TUREK-PLEWA, J. and JAGODZIŃSKI, P. P. The Role of Mammalian DNA Methyltransferases in the Regulation of Gene Expression. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 10, p. 631-647, 2005.

UCHIYAMA, R. et al. 5-Hydroxymethylcytosine as a useful marker to differentiate between malignant melanomas and benign melanocytic nevi. **J Dermatol Sci**, v. 73, n. 2, p. 161-3, 2014.

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

VANDIVER, A.R. et al. Age and sun exposure-related widespread genomic blocks of hypomethylation in nonmalignant skin. **Genome Biol**, v.16, n.80, 2015.

VIBOR, H.; INGA, M.R. et al. The role of microRNA in myelodysplastic syndromes: beyond DNA methylation and histone modification. **Eur J Haematol**, v.16, 2016.

WADDINGTON, C. The Epigenotype. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 10-13, 2012.

WALTER, J. An epigenetic TET a TET With Pluripotency. **Cell**, v.8, n.2, p. 121-122, 2011.

WATANABE, K.; AMANO, Y.; ISHIKAWA, R. et al. Histone methylation-mediated silencing of miR-139 enhances invasion of non-small-cell lung cancer. **Cancer Med**, v.4, n. 10, 1573-82, 2015.

WATERLAND, R.A.; JIRTLE, R.L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. **Mol Cell Biol**, v. 23, p. 5293-300, 2003.

WATERLAND, R.A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation.

J Nutr, v. 136, p. 1706S-710S, 2006.

WIDMER, R.J. et al. The Association between Circulating MicroRNA Levels and Coronary Endothelial Function. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.

WU, H. AND ZHANG, Y. Mechanisms and functions of Tet proteinmediated 5-methylcytosine oxidation. **Genes & Development**, v.25, p. 2436-2452, 2011.

YAAR, M.; GILCHREST, B.; Photoageing: mechanism, prevention and therapy. **Br J Dermatol**, v. 157, p. 874-87, 2007.

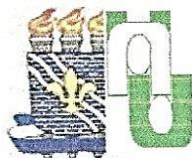
YAN, W. et al. Squamous cell carcinoma – similarities and differences among anatomical sites. **Am J Cancer Res**, v. 1, n. 3, p. 275-300, 2011.

YANG, A.Y. et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in UVB- and DMBA/TPA-induced mouse skin cancer models. **Life Sci**, v.113, n. 1-2, p. 45-54, 2014.

ZHU, J. K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. **Annu Rev Genet**, v. 43, p. 143-66, 2009.

* De acordo com o regulamento do PGBCM/UFPB, baseada nas normas da ABNT

ANEXO 01
CERTIFICADO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA - UFPB
 HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY - HULW
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES
 HUMANOS - CEP**

CERTIDÃO

Comitê de Ética em Pesquisa
 Hospital Universitário Lauro Wanderley
 Universidade Federal da Paraíba

Com base na Resolução nº 196/96 do CNS/MS que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley – CEP/HULW, da Universidade Federal da Paraíba, em sua sessão realizada no dia 27/09/2011, após análise do parecer do relator, resolveu considerar **APROVADO** o projeto de pesquisa intitulado **INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO SOLAR NO PERFIL DE METILAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS DA PELE: ASSOCIAÇÃO COM A EXPRESSÃO PROTEICA**. Protocolo CEP/HULW nº. 430/11, Folha de Rosto nº 457823, Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE Nº 0082.0.462.126-11, da pesquisadora *NAILA FRANCIS PAULO DE OLIVEIRA*.

Informamos que qualquer alteração no Projeto e dificuldades no curso da pesquisa, assim como os eventos adversos deverão ser comunicadas a este Comitê de Ética em Pesquisa através dos pesquisadores.

Ao final da pesquisa, solicitamos enviar ao CEP/HULW, uma cópia desta certidão e da pesquisa, em CD, para emissão da certidão para publicação científica.

João Pessoa, 04 de outubro de 2011.


Iaponira Cortez Costa de Oliveira
 Coordenadora do Comitê de Ética
 em Pesquisa

Prof^a Dr^a Iaponira Cortez Costa de Oliveira
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-HULW

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW - 4º andar. Campus I - Cidade Universitária.
 Bairro: Castelo Branco - João Pessoa - PB. CEP: 58051-900 CNPJ: 24098477/007-05
 Fone: (83) 32167964 — Fone/fax: (083)32167522 E-mail:comitedeetica@hulw.ufpb.br

ANEXO 02

FICHA CLÍNICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA



FICHA Nº _____

1. Identificação:

Idade: _____

Gênero: () masculino () feminino

Profissão: _____

2. Apresentação de algum vício

Tabagismo: () sim () não Frequência: _____

Álcool: () sim () não Frequência: _____

Drogas ilícitas: () sim () não Qual(is): _____

3. Condição de Saúde Geral:

Estado Geral Saúde:

Doença Crônica:

() Hipertensão () Diabetes () Cardiopatia () Insuficiência Renal

() Outras _____

Uso Crônico de Medicamentos () sim () não

Qual(is): _____

4. Avaliação Macroscópica da Pele

Tipo de pele: () I () II () III () IV () V () VI