

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor
(a), o texto completo desta tese será
disponibilizado a partir de

04/05/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

KEILA CRISTINA MIRANDA

**ANÁLISE DE METILAÇÃO EM DIFERENTES REGIÕES DE
GENES SUPRESSORES DE TUMOR NO CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL**

2020

KEILA CRISTINA MIRANDA

**ANÁLISE DE METILAÇÃO EM DIFERENTES REGIÕES DE GENES
SUPRESSORES DE TUMOR NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS BUCAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Diagnóstico Bucal.

Orientadora: Profa. Tit. Janete Dias Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Albuquerque Marchi

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Miranda, Keila Cristina

ANÁLISE DE METILAÇÃO EM DIFERENTES REGIÕES DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL / Keila Cristina Miranda. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientador: Janete Dias Almeida

Coorientador: Fabio Albuquerque Marchi

1. Metilação do DNA. 2. Epigenética. 3. Ilhas CpG. 4. Câncer bucal. I. Almeida, Janete Dias , orient. II. Marchi, Fabio Albuquerque, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Janete Dias Almeida (Orientador)

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Fernanda Viviane Mariano Brum Corrêa

Universidade Estadual de Campinas - Unicamp
Faculdade de Ciências Médicas
Campus de Campinas

São José dos Campos, 04 de Maio de 2020.

AGRADECIMENTOS

Ao término desta jornada, expresso profunda gratidão por tudo o que aconteceu ao longo dos últimos dois anos. Houve momentos de alegria, tristeza, euforia, incertezas, pequenos surtos e, muitas vezes, sentimento de incapacidade. No entanto, Deus me presenteou com anjos que tornaram essa missão muito mais branda e possível de ser realizada. Por este motivo, primeiramente, agradeço a Ele por ter me guiado até aqui e posto pessoas insubstituíveis em meu caminho;

Agradeço também à minha família por entender os momentos que eu precisei estar ausente e por apoiar todas as aventuras que eu escolho me envolver. Principalmente, aos meus pais, Salvador e Vitória, pelo apoio e amor;

À minha irmã Josi, minhas sobrinhas Raíssa e Maria Vitória e meu cunhado Geraldo por acreditarem nos meus sonhos e estarem presentes nos momentos mais importantes para mim;

À minha orientadora, Professora Janete, agradeço pelos momentos de sabedoria, pela positividade, pelos conselhos, pelos repetidos “Respira!” e, principalmente, por ter me dado este desafio e a oportunidade de conhecer todas essas pessoas incríveis. Sei que Deus agiu em minha vida por meio de você;

Ao meu co-orientador, Dr. Fabio Marchi, muito obrigada por sua prestatividade, apoio e ensinamentos. Todas as dificuldades encontradas foram muito mais leves de serem superadas com seu suporte, você foi nosso principal anjo nesse projeto;

Aos colaboradores do AC Camargo Cancer Center pela parceria, agradeço principalmente à professora Dra. Sílvia Regina Rogatto, Dr. Luiz Paulo Kowalski e Msc. Caroline Beltrami, pelo material, suporte técnico e

disponibilidade em desenvolver este estudo;

Aos colaboradores do Hospital de Amor de Barretos que foram muito receptivos e prestativos, principalmente ao Dr. Rui Manoel Reis, Dra. Lidia Rebolho e Msc. André Lengert;

A Msc. Bruna Sorroche, também do Hospital de Amor, agradeço por sua prestatividade, pelo sorriso que não sai do seu rosto, por sua disponibilidade em me ensinar todos os experimentos e por tirar todas as minhas dúvidas. Muita gratidão por toda sua ajuda;

Às minhas amigas Cecília, Mayane e Verônica por me apoiarem em minhas decisões, me aconselharem e sempre estarem comigo nessa caminhada. Gratidão pela amizade de vocês;

À minha colega de profissão, agora uma irmã, Hanna, por me ajudar a manter o foco, enxergar as coisas por um lado positivo, por me incentivar a não desistir dos nossos sonhos e por me inspirar a cada dia;

Às minhas irmãs de mestrado, Nayara e Bruna, por compartilharem os medos, problemas e soluções, por deixarem meus dias mais leves, por me fazerem rir e por me ensinarem a ser melhor;

À minha outra irmã de mestrado, que foi um presente na minha vida, minha querida Mariana, obrigada por compartilhar seus sonhos comigo, seus medos, suas dúvidas. Obrigada por ser luz e ter um coração tão puro, você será sempre minha inspiração de profissional e ser humano;

Ao meu amigo de créditos e preparo de aulas, Anderson, muito obrigada por sua calma, paciência e parceria ao longos destes dois anos;

Aos meus amigos da salinha da pós-graduação Jaqueline, Noala, Renata, Cheyenne, Suelen e Juliane, muito obrigada pelos momentos e ensinamentos compartilhados;

Aos meus queridos professores da Histologia, Prof. Miguel, Profa. Marianne e Profa. Luana, muito obrigada por terem me ensinado tanto no

período de estágio docência e terem me dado a oportunidade de dar a primeira aula para uma turma de graduação. Especialmente ao Prof. Miguel, também agradeço pelas aulas de Genética, pelas conversas e principalmente pelo apoio ao longo dessa jornada;

À Profa. Regina El Dib meu agradecimento por ter sido um exemplo de ternura e profissional ao longo da disciplina de Bioquímica, obrigada por exalar humildade e paixão pelo que faz;

Aos professores da disciplina de Patologia Geral, Profa. Ana Lia Anbinder, Prof. Luiz Eduardo Blummer e Profa. Mônica Fernandes Gomes agradeço por todo o carinho e empenho em me ensinar e me tornar uma profissional melhor;

Meu agradecimento aos meus alunos do Prevest (2019) que me deram a oportunidade de evoluir em vários aspectos profissionais e pessoais, me ensinaram a ser professora e plantaram no meu coração o amor por essa profissão tão linda;

A todas as pessoas que conheci ao longo destes dois anos, aos amigos do laboratório de Microbiologia e Imunologia, do Lana, do Lapp e aos demais discentes e docentes, obrigada por tudo que me ensinaram;

Agradeço grandemente aos pacientes que colaboraram com suas amostras para este estudo e a todos os profissionais envolvidos direta e indiretamente;

Agradeço à Capes pela bolsa ao longo dos 24 meses e à Fapesp pelo financiamento da pesquisa;

Aos funcionários da pós-graduação, Carol, Bruno e Sandra, sempre muito prestativos, meu muito obrigada; estendo meu agradecimento também ao Sr. Carlos Guedes pela ajuda com todos os trâmites do Comitê de Ética em Pesquisa e relatórios da Fapesp;

Agradeço aos membros da banca do exame de qualificação e defesa

pelas contribuições, vocês foram escolhidos com muito carinho;

Por fim agradeço ao Programa de Biopatologia Bucal e ao ICT-SJC/Unesp pela oportunidade e pela evolução pessoal e profissional ao longo destes dois anos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Aspectos éticos	24
3.2 Histórico do projeto	24
3.3 Análise <i>in silico</i> a partir de pacientes obtidos em colaboração com o ACCCC.....	26
3.4 Validação dos alvos	28
3.4.1 Análise <i>in silico</i> a partir de dados obtidos no TCGA (HM450K e RNA-Seq)	28
3.4.2 Análise experimental dos genes alvos selecionados.....	28
3.4.2.1 Casuística	28
3.4.2.2 Desenho dos <i>primers</i>	30
3.4.2.3 Conversão do DNA por bissulfito de sódio	32
3.4.2.4 Amplificação do DNA por PCR e eletroforese	34
3.4.2.5 Pirosequenciamento	34
3.5 Processamento de dados e análise estatística.....	38
4 RESULTADO	40
4.1 Rastreamento global <i>in silico</i>	40

4.1.1 Casuística	40
4.1.2 Análise do perfil de metilação dos 24 genes alvo no CCEB e tecido adjacente.....	41
4.1.2.1 Validação <i>in silico</i> do perfil de metilação dos 24 genes alvo no CCEB a partir de dados obtidos no TCGA (HM450K e RNA-Seq)	45
4.1.3 Comparação entre o perfil de metilação de tumores de pacientes fumantes e não-fumantes	48
4.1.4 Comparação entre o perfil de metilação do tecido tumoral e adjacente.....	49
4.1.4.1 Validação <i>in silico</i> do sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB comparado ao tecido adjacente a partir de dados obtidos no TCGA (HM450K e RNA-Seq).....	54
4.2 Sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB quando comparado ao tecido adjacente selecionados para validação experimental.....	56
4.3 Validação experimental por pirosequenciamento.....	58
4.3.1 Casuística	58
4.3.2 Análise geral do perfil de metilação dos sítios CpGs	59
4.3.3 Correlação entre as PDMs e os dados clínico-patológicos dos pacientes	65
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXO.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das regiões <i>upstream</i> , sítio de início da transcrição e <i>downstream</i> de um gene	19
Figura 2 - Localização do sítio CpG em relação à ilha CpG	20
Figura 3 - Fluxograma de todas as etapas executadas no presente estudo e o número de amostras utilizadas	25
Figura 4 - Coluna <i>Zymo-Spin</i> TM IC e tubo contendo DNA eluído.....	33
Figura 5 – Purificação das amostras de DNA obtidas da reação de PCR.....	35
Figura 6 – <i>Workstation</i> utilizada para lavagens das amostras e transferência para placa de sequenciamento	36
Figura 7 – Pirosequenciador utilizado para quantificar os níveis de metilação..	37
Figura 8 - Cartucho contendo enzimas, substratos e dNTPs utilizados no pirosequenciamento.....	38
Figura 9 - Média dos valores β obtidos na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon no CCEB e no tecido adjacente	43
Figura 10 - Média dos valores β obtidos no corpo gênico e/ou 3'UTR no CCEB e no tecido adjacente	44

Figura 11 - Médias de valores β obtidas no estudo interno (HM540K) e externo (TCGA) para os genes que apresentaram pelo menos três sítios CpGs hipermetilados na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon	46
Figura 12 - Médias de valores β obtidas para os genes que apresentaram no mínimo três sítios hipermetilados em região 5'UTR, 1º éxon e 3'UTR	47
Figura 13 - PDMs distribuídas por gene e <i>status</i> de metilação nos tecidos tumorais e adjacentes.....	51
Figura 14 - Sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB quando comparado ao tecido adjacente, conforme região gênica e localização em relação à ilha CpG.....	52
Figura 15 - Sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB quando comparado ao tecido adjacente, conforme região gênica e localização em relação à ilha CpG.....	53
Figura 16 - Eletroforese mostrando o resultado dos testes efetuados como os <i>primers</i> para as regiões dos genes <i>APC</i> , <i>BRCA1</i> , <i>FHIT</i> , <i>HOXA1</i> e <i>WIF1</i>	57
Figura 17 - Pirogramas obtidos na investigação do nível de metilação dos sítios CpGs dos genes <i>BRCA1</i> , <i>HOXA1</i> e <i>FHIT</i>	61
Figura 18 - Dendograma representando o padrão de metilação obtido para cada sítio CpG nas amostras de CCEB e tecido adjacente na análise por pirosequenciamento.....	63
Figura 19 - Comparação entre os níveis de metilação obtidos para os pacientes que apresentaram recidiva locorregional em um período de cinco anos	66

Figura 20 - Análise de poder do teste para o nível de metilação do sítio CpG do gene <i>HOXA1</i> entre o tecido tumoral e o tecido adjacente.....	67
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínico-patológicos dos pacientes participantes do estudo de metilação global utilizando a plataforma HM450K.....	41
Tabela 2 - Comparação entre os níveis de metilação entre tumores de pacientes tabagistas e não-tabagistas	49
Tabela 3 - Comparação entre os dados internos de metilação e os dados externos de metilação e expressão disponíveis no TCGA.....	55
Tabela 4 - Dados clínico-patológicos dos pacientes incluídos na validação experimental	59
Tabela 5 - Comparação entre os níveis de metilação obtidos no estudo interno, no TCGA e no pirosequenciamento para os três sítios CpGs diferencialmente metilados nas análises exploratórias	62
Tabela 6 - Porcentagem de metilação obtida no pirosequenciamento por sítio CpG de acordo com o gene e o tecido investigado	64
Tabela 7 - Diferenças de metilação entre o CCEB e o tecido adjacente obtidas nos estudos interno, TCGA e pirosequenciamento	65

Miranda KC. Análise da metilação em diferentes regiões de genes supressores de tumor no carcinoma de células escamosas bucal [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) apresenta alterações epigenéticas, como a metilação de DNA, na região promotora de genes supressores de tumor (GST), mas pouco se sabe em relação a outras regiões gênicas. Este estudo teve como objetivo investigar o perfil de metilação de diferentes regiões de um grupo de GSTs, validar dados significativos por meio de análises *in silico* e experimental, e correlacionar estes achados aos dados clínico-patológicos dos pacientes. Na plataforma HumanMethylation450 Beadchip, foram utilizadas 53 amostras de CCEB e 53 de tecidos não-neoplásicos adjacentes ao tumor (TA). O nível de metilação destes tecidos foram comparados considerando $\Delta\beta \leq -0,10$ ou $\geq 0,10$, $p < 0,01$ e $FDR < 0,01$. Os resultados obtidos foram validados no TCGA e por pirosequenciamento utilizando 15 amostras independentes de CCEB e 15 TA. Os genes *BRCA1*, *FHIT*, *MGMT*, *RASSF1* e *RUNX3* apresentaram sítios hipermetilados na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon, enquanto *CDH13*, *DAPK1*, *HOXA1*, *PDLIM4*, *RARB*, *TIMP3*, *TP73* e *VHL* mostraram hipermetilação no corpo gênico e/ou 3'UTR. Foram identificados sítios diferencialmente metilados entre o CCEB e TA para os genes *BRCA1*, *FHIT* e *HOXA1*. Na validação experimental, apenas o sítio CpG na região 3'UTR do gene *HOXA1* mostrou diferença significativa ($p < 0,01$) entre o CCEB e TA, 55,5% e 36,9% respectivamente, estando sua metilação e maior expressão ($FC = 10,58$) positivamente correlacionada à carga tabágica ($p = 0,04$) e recidiva ($p = 0,03$). A análise *in silico* utilizada mostrou-se efetiva na identificação dos alvos e comparação entre os grupos. A metilação de diferentes regiões de genes supressores de tumor é um evento frequente no CCEB, entretanto pouca diferença é encontrada entre o perfil de metilação tumoral e as margens da lesão. A metilação do sítio CpG na região 3'UTR do *HOXA1* em CCEB está correlacionada a expressão aberrante deste gene e maiores episódios de recorrência.

Palavras-chave: Metilação do DNA. Epigenética. Ilhas CpG. Câncer bucal.

Miranda KC. Oral squamous cell carcinoma methylation analysis in different regions of tumor suppressor genes [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) presents epigenetic changes, such as DNA methylation, in tumor suppressor genes (GST) promoter regions, but little is known about other gene regions. This study aimed to investigate the methylation profile of different regions of a group of GSTs, to validate significant data through *in silico* and experimental analyzes, and to correlate these findings with the patients' clinical-pathological data. In the HumanMethylation450 Beadchip platform, 53 samples of CCEB and 53 of non-neoplastic tissues adjacent to the tumor (AT) were used. The methylation level of these tissues was compared considering $\Delta\beta \leq -0.10$ or ≥ 0.10 , $p < 0.01$ and $FDR < 0.01$. The results obtained were validated at TCGA and by pyrosequencing using 15 independent samples of CCEB and 15 TA. The BRCA1, FHIT, MGMT, RASSF1 and RUNX3 genes showed hypermethylated sites in the promoter region, 5'UTR and / or 1st exon, while CDH13, DAPK1, HOXA1, PDLIM4, RARB, TIMP3, TP73 and VHL showed hypermethylation in the gene body and / or 3'UTR. Differently methylated sites were identified between the OSCC and AT for the BRCA1, FHIT and HOXA1 genes. In experimental validation, only the CpG site in the 3'UTR region of the HOXA1 gene showed a significant difference ($p < 0.01$) between OSCC and AT, 55.5% and 36.9% respectively, with its methylation and greater expression (FC = 10.58) positively correlated with smoking burden ($p = 0.04$) and recurrence ($p = 0.03$). The *in silico* analysis used was effective in identifying the targets and comparing the groups. Methylation of different regions of GST is a frequent event in the OSCC, however little difference is found between the tumor methylation profile and the lesion margins. Methylation of the CpG site in the 3'UTR region of HOXA1 in CCEB is correlated with the aberrant expression of this gene and with greater recurrence episodes.

Keywords: DNA methylation. Epigenetic. CpG islands. Oral cancer.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca é mais comum entre homens do que em mulheres, principalmente a partir da quinta década de vida (World Health Organization - WHO, 2020). No Brasil, este é o quinto tipo de câncer mais incidente entre os homens e o décimo-terceiro entre as mulheres. A região sudeste, principalmente os estados de São Paulo e Paraná, tem a maior incidência de câncer bucal do país, onde é o quarto tumor mais frequente no sexo masculino (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2020).

O câncer de boca refere-se a um conjunto de tumores epiteliais que acometem os lábios e outros sítios da região intrabucal (INCA, 2020). Os tumores epiteliais malignos classificados histopatologicamente como carcinoma de células escamosas (CCE) representam cerca de 90% dos cânceres de boca (van der Waal et al., 2011).

O CCE labial está relacionado à exposição à radiação solar; já o carcinoma de células escamosas bucal (CCEB), isto é, que acometem a língua, gengiva, assoalho, mucosa jugal e palato duro, geralmente, estão relacionados ao consumo excessivo de tabaco e álcool (WHO, 2020). Hashibe et al. (2009) afirmaram que o tabagismo triplica o risco de desenvolvimento do câncer bucal e quando associado ao consumo de álcool, eleva o risco em 15 vezes.

Além do cigarro tradicional, outros produtos derivados do tabaco também estão relacionados ao câncer de boca, tais como cigarro de palha, de Bali, de cravo ou *kreteks*, fumo de rolo, tabaco mascado, charutos, cachimbos e narguilé. Quanto maior o consumo de cigarros fumados, maior o risco de câncer (INCA, 2020).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o excesso de gordura corporal, baixo consumo de frutas e vegetais, exposição ao amianto, poeira de

madeira, couro e cimento, formaldeído, sílica, fuligem, solventes orgânicos e agrotóxicos também configuram fatores de risco para o câncer bucal.

Atualmente, o papel do vírus do Papiloma Humano (HPV) no desenvolvimento do câncer intrabucal é controverso e pouco elucidado, entretanto sugere-se que a mucosa bucal represente apenas um reservatório de infecção, não havendo envolvimento primário do vírus no processo de desenvolvimento do CCEB (Candotto et al., 2017).

Apesar do fácil acesso à região bucal, grande parte dos pacientes são diagnosticados em estágios avançados da doença (III e IV) e, assim, cerca de 60% deles vão a óbito nos cinco anos pós-diagnóstico. Entretanto, se diagnosticado em estágio inicial, o tratamento, apesar de invasivo, pode apresentar grande efetividade (WHO, 2020).

O tratamento dos pacientes com CCEB ainda é baseado na localização do tumor, classificação TNM (Tumor, Linfonodo, Metástase) e no estadiamento clínico (EC), o que muitas vezes não traz informações precisas sobre o prognóstico do paciente (Baj et al., 2019; Majumdar et al., 2017). Além disso, devido à localização do tumor, o tratamento, mesmo que cirúrgico, leva à significativa perda de estrutura e função, principalmente no que se refere à mastigação e fala (Shaw et al., 2007).

A alta mortalidade do CCEB está relacionada principalmente às taxas de recidivas locorregionais, em alguns casos, mesmo com o tecido adjacente ao tumor se apresentando histologicamente negativo para células tumorais. No entanto, não existem diretrizes amplamente estabelecidas para identificação das margens cirúrgicas removidas durante a excisão do tumor (Baj et al., 2019).

O processo de transformação das células normais do epitélio escamoso estratificado da mucosa bucal em lesões pré-malignas e, posteriormente, em lesões malignas, ainda é pouco elucidado. Todavia, sabe-se que este processo é multifatorial e abrange um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas,

hereditárias ou adquiridas, que levam a um desequilíbrio na função de oncogenes e genes supressores de tumor (Thomson, 2012).

As células cancerosas são capazes de induzir e sustentar sinais estimuladores de crescimento por meio de oncogenes, além de contornar mecanismos que regulam negativamente a proliferação celular, que, muitas vezes, dependem ativamente da ação de genes supressores de tumor (Hanahan, Weinberg, 2011).

Os fatores epigenéticos que também podem levar à carcinogênese são alterações hereditárias que ocorrem na expressão gênica e não são codificadas na sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA) (De Oliveira et al., 2015; Supic et al., 2009). Sabe-se que marcadores epigenéticos são altamente específicos de acordo com o tipo celular e podem ainda sofrer alterações ao longo do tempo (Barrero et al., 2010).

A metilação de DNA é um mecanismo epigenético que modula a expressão gênica, responsável, portanto, pela diferenciação celular, desenvolvimento e, até mesmo, a carcinogênese (Flanagan et al., 2009; Supic et al., 2009; Zhang et al., 2015).

Esse processo é realizado por um grupo de enzimas chamadas DNA metiltransferases (DNMTs), sendo as principais divididas em três tipos: DNMT1, encarregada de manter os padrões de metilação de DNA após a divisão celular, e DNMT3a e DNMT3b, que atuam na regulação das *de novo* metiltransferases (Jones, 2012).

Segundo Jones (2012), essas três enzimas são essenciais na manutenção dos padrões de metilação, principalmente, durante o desenvolvimento. Uma célula totalmente diferenciada tem um padrão específico de metilação e, portanto, expressa genes específicos (De Oliveira et al., 2015; Teodoridis et al., 2005).

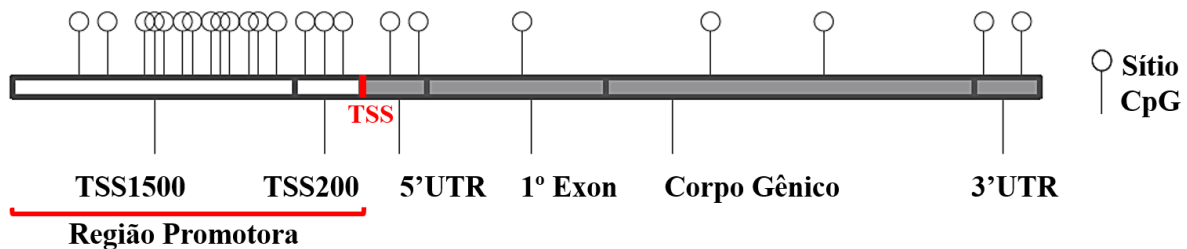
A metilação de DNA consiste na adição de um grupo metil (CH₃), proveniente da proteína S-adenosilmetionina, em um nucleotídeo, geralmente à

citossina adjacente a uma guanina (5'- CG - 3'), chamado de sítio CpG. Este processo ocorre por meio do giro da citossina a 180° para fora da fita de DNA, agregação de CH₃ e retorno ao seu lugar na fita, formando então uma 5-hidroximetilcitossina (5 mC) (De Oliveira et al., 2015). Essa alteração permite que proteínas sejam agregadas à fita de DNA e impeçam o acoplamento de fatores de transcrição, inibindo o processo de formação do ácido ribonucleico (RNA) (Rasmussen, Helin, 2016).

Embora a maior parte dos sítios CpGs estejam metilados em mamíferos, existem regiões chamadas de ilhas CpGs que se encontram desmetiladas (Chen et al., 2007). Essas regiões correspondem a uma porção do DNA com mais de 50% de sítios CpGs no mesmo filamento e geralmente são encontradas próximas aos sítios de início de transcrição (TSS - *Transcription Start Site*) dos genes (Towle, Garnis, 2012).

Nos últimos anos, a maioria dos estudos focou apenas na metilação em ilhas CpGs localizadas em regiões promotoras (Zhang et al., 2015). Entretanto, o avanço nas técnicas de estudos de metilomas tem demonstrado que a posição onde ocorre a adição do grupo metil apresenta diferentes funções biológicas (Jones, 2012). Por exemplo, a metilação na região promotora de ilhas CpG bloqueia o início da transcrição. De outro modo, sugere-se que a metilação no corpo gênico não tenha essa capacidade, podendo até mesmo estimular o processo de transcrição (Jones, 2012). Estas regiões gênicas podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1 - Representação das regiões *upstream*, sítio de início da transcrição e *downstream* de um gene



Legenda: TSS1500: 200 - 1500 bases à montante (*upstream*) do TSS (*Transcription Start Site* - TSS); TSS200: 0 - 200 bases à montante (*upstream*) do sítio de início da transcrição; 5'UTR: dentro da região 5' não traduzida, entre o TSS e o códon de iniciação da tradução ATG; Corpo gênico: entre ATG e o códon de parada; independentemente da presença de íntrons, éxons, TSS ou promotores; 3'UTR: entre o códon de parada e a Cauda Poli-A.

Fonte: Adaptado de Illumina®, 2012.

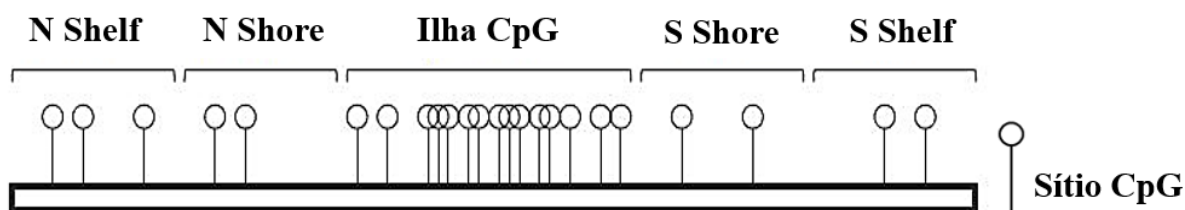
As ilhas CpG correspondem de 1 a 2% do genoma e frequentemente estão localizadas na região promotora (Sandoval et al., 2011) e exônica no corpo gênico (Law, Jacobsen, 2010).

As regiões periféricas que flanqueiam as ilhas CpGs, à aproximadamente 2 kb (kilobases), são chamadas de *shore*; 2 a 4 kb são conhecidas como *shelf* e, outras mais distantes, *open sea* (Irizarry et al., 2009).

Existem evidências de que a metilação nas regiões flanqueando as ilhas CpGs também influenciam a expressão gênica, mas ainda é um mecanismo pouco elucidado e mais dinâmico (Irizarry et al., 2009). Segundo Doi et al. (2014), *shores* também possuem um perfil de metilação específico de acordo com o tecido e no câncer está associado à repressão gênica.

Essas regiões, em relação à ilha CpG, podem ser vistas na Figura 2.

Figura 2 - Localização do sítio CpG em relação à ilha CpG



Legenda: N: montante (*north*) (5') da ilha CpG; *Shelf*: 2 - 4 kb da ilha CpG; *Shore*: 0 - 2 kb da ilha CpG; S: jusante (*south*) (3') da ilha CpG. Essa imagem mostra como, geralmente, são localizadas as ilhas CpGs em um gene e como são chamadas as regiões que flanqueiam a ilha.

Fonte: Adaptado de Illumina®, 2012.

As enzimas *ten-eleven translocation* (TET) são capazes de converter a 5-hidroximetilcitosina em citosina, por meio de diversas vias. A TET desempenha uma função de extrema importância na regulação dos padrões de metilação juntamente às DNMTs (Rasmussen, Helin, 2016).

Existem cerca de 28 milhões de sítios CpGs no genoma humano. Analisar a metilação de cada um desses sítios pode fornecer informações sobre o papel da metilação na manutenção da saúde e desenvolvimento de doenças (Stirzaker et al., 2014).

Os padrões de metilação e desmetilação estão hermeticamente regulados em células dentro da normalidade. Entretanto, em neoplasias, esses padrões se alteram. Sabe-se que fatores ambientais externos causam alterações epigenéticas levando ao desenvolvimento de malignidades (Wang et al., 2017).

Em algumas neoplasias malignas, há hipermetilação das ilhas CpG em regiões promotoras e isso impede o acoplamento de fatores de transcrição, o que resulta no impedimento da transcrição de genes, incluindo os supressores de tumor (Basu et al., 2017).

Segundo Rideout et al. (1990), a metilação no corpo gênico também possui um papel fundamental na carcinogênese, estando relacionado ao desenvolvimento

do câncer em células somáticas e contribuindo para mutações em células germinativas.

Atualmente, há diversos indícios de que o padrão de metilação de DNA pode ser utilizado como um biomarcador para diferenciar células cancerosas de células normais (Jin, Liu, 2018). Hayashi et al. (2015) propuseram que a análise molecular oferece várias vantagens sobre a microscopia óptica para a detecção de células cancerosas no tecido adjacente ao tumor, visto que alterações moleculares específicas podem ser mais sensíveis do que a detecção de alterações morfológicas celulares.

O perfil de metilação de genes supressores de tumor responsáveis pelo ciclo e adesão celular, apoptose, dano, reparo de DNA e transcrição gênica tem sido amplamente estudado em CCEB (Basu et al., 2017; Gao, Teschendorff, 2017; Towle et al., 2013) e no tecido adjacente ao tumor (Lin et al., 2015; Sinha et al. 2009; Strzelczyk et al., 2014). Entretanto, o efeito da metilação em diferentes regiões gênicas permanece incerta ou controversa neste tipo de carcinogênese.

Diversas tecnologias foram desenvolvidas a fim de analisar a metilação de DNA em escala genômica, principalmente em regiões ricas em sítios CpGs (Stirzaker et al., 2014). Dentre essas tecnologias, existe a plataforma Infinium® HumanMethylation450 Bechips (HM450K). Segundo Stirzaker et al. (2014), esta plataforma apresenta um bom custo benefício, não depende de enzimas de restrição e pode ser utilizada para analisar uma variedade de tipos celulares, em tecidos frescos ou parafinados.

Assim, este estudo propôs identificar o perfil de metilação de um grupo de genes supressores tumorais em CCEB por meio de estratégia de rastreamento computacional e molecular com plataforma de alto desempenho, e validar experimentalmente os alvos diferencialmente metilados entre o tecido tumoral e o tecido adjacente de pacientes tabagistas e não-tabagistas.

6 CONCLUSÃO

O método de rastreamento *in silico* utilizado na plataforma HM450K e no TCGA mostrou-se efetivo na seleção dos alvos e comparação entre os diferentes grupos. Os estudos *in silico* também demonstraram que os genes supressores de tumor geralmente apresentam-se hipermetilados em regiões gênicas distintas, podendo impactar de maneira contrária no nível de transcritos. Portanto, são necessários mais estudos avaliando o efeito da metilação em diferentes regiões gênicas para melhor entendimento da implicação deste mecanismo.

Os genes *BRCA1*, *FHIT*, *MGMT*, *RASSF1* e *RUNX3* mostraram-se comumente hipermetilados na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon, enquanto os genes *CDH13*, *DAPK1*, *HOXA1*, *PDLIM4*, *RARB*, *TIMP3*, *TP73* e *VHL* apresentaram maior hipermetilação no corpo gênico e/ou 3'UTR.

Não foram observadas diferenças significantes entre os níveis de metilação de pacientes tabagistas e não-tabagistas com CCEB nas análises exploratórias. Todavia, na validação experimental, a carga tabágica dos pacientes fumantes estava positivamente correlacionada ao maior nível de metilação do gene *HOXA1* na região 3'UTR, o que parece resultar em um aumento de expressão deste gene. Isto reflete a complexidade do processo de desenvolvimento e manutenção do câncer, e a necessidade do uso de metodologias quantitativas para avaliar pequenas diferenças nos níveis de metilação.

O tecido adjacente ao CCEB apresenta alterações nos níveis de metilação, refletindo um padrão muito similar ao da lesão. O sítio CpG na região 3'UTR do gene *HOXA1* parece ser um CpG *hot site*, ou seja, capaz de controlar e induzir maior expressão gênica, podendo este ser alvo de propostas terapêuticas com o intuito de impedir a expressão aberrante deste gene no CCEB, diminuindo assim o desenvolvimento de células-tronco do câncer e episódios de recorrência.

REFERÊNCIAS*

Al-Moghrabi N, Al-Showimi M, Al-Yousef N, Al-Shahrani B, Karakas B, Alghofaili L, et al. Methylation of NBR2 and MGMT genes in white blood cells are transmitted from mothers to daughters. *Clin Epigenetics*. 2018 Jul 26;10(1):99. doi: 10.1186/s13148-018-0529-5. PubMed PMID: 30049288.

Alexandrov LB, Ju YS, Haase K, Van Loo P, Martincorena I, Nik-Zainal S, Totoki Y, et al. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*. 2016 Nov 4;354(6312):618-22. PubMed PMID: 27811275.

Baj A, Fusco N, Bolzoni A, Carioli D, Mazzucato C, Favversani A, et al. A novel integrated platform for the identification of surgical margins in oral squamous cell carcinoma: results from a prospective single-institution series. *BMC Cancer*. 2019 May 17;19(1):467. doi: 10.1186/s12885-019-5634-0. PubMed PMID: 31101023.

Barrero MJ, Boue S, Belmonte JCI. Epigenetic Mechanisms that Regulate Cell Identity. *Cell Stem Cell*. 2010 Nov 5;7(5):565-70. doi:10.1016/j.stem.2010.10.009. PubMed PMID: 21040898.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press, Lyon 2005. 163-5. ISBN-10: 9283224388.

Basu B, Chakraborty J, Chandra A, Katarkar A, Baldevbhai JRK, Dhar Chowdhury D, et al. Genome-wide DNA methylation profile identified a unique set of differentially methylated immune genes in oral squamous cell carcinoma patients in India. *Clin. Epigenetics*. 2017 Feb 3;9(1):1–15. doi: 10.1186/s13148-017-0314-x. PubMed PMID: 28174608.

Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011 Oct;98(4):288-95. doi: 10.1016/j.ygeno.2011.07.007. PubMed PMID:21839163.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 2019]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bitu CC, Destro MF, Carrera M, da Silva SD, Graner E, Kowalski LP, et al. HOXA1 is overexpressed in oral squamous cell carcinomas and its expression is correlated with poor prognosis. *BMC Cancer*. 2012 Apr 12;12:146. doi: 10.1186/1471-2407-12-146. PMCID: PMC3351375.

Botezatu A, Iancu IV, Plesa A, Manda D, Popa O, Bostan M, et al. Methylation of tumour suppressor genes associated with thyroid cancer. *Cancer Biomark*. 2019;25(1):53-65. doi: 10.3233/CBM-182265. PubMed PMID: 31006665.

Brianese RC, Nakamura KDM, Almeida FGDSR, Ramalho RF, Barros BDF, Ferreira ENE, et al. NBR2 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: a comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Feb;167(3):803-14. doi: 10.1007/s10549-017-4552-6. PubMed PMID: 29116469

Chang H, Shin B, Kim A, Kim H, Kim B. DNA methylation analysis for the diagnosis of thyroid nodules - a pilot study with reference to BRAF(V) (600E) mutation and cytopathology results. *Cytopathology*. 2016 Apr;27(2):122–30. doi:10.1111/cyt.12248. PubMed PMID: 25988212.

Chang KW, Kao SY, Tzeng RJ, Liu CJ, Cheng AJ, Yang SC, et al. Multiple molecular alterations of FHIT in betel-associated oral carcinoma. *J Pathol*. 2002 Mar;196(3):300-6. doi: 10.1002/path.1047. PubMed PMID: 11857493.

Chen K, Sawhney R, Khan M, Benninger M, Hou Z, Sethi S, et al. Methylation of multiple genes as diagnostic and therapeutic markers in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg*. 2007 Nov;133(11):1131–8. doi: 10.1001/archotol.133.11.1131. PubMed PMID: 18025318.

Chen F, Huang T, Ren Y, Wei J, Lou Z, Wang X, et al. Clinical significance of CDH13 promoter methylation as a biomarker for bladder cancer: a meta-analysis. *BMC Urol*. 2016 Aug 30;16(1):52. doi: 10.1186/s12894-016-0171-5. PubMed PMID: 27578166.

Chuang LSH, Ito Y. RUNX3 is multifunctional in carcinogenesis of multiple solid tumors. *Oncogene*. 2010 May 6;29(18):2605–15. doi: 10.1038/onc.2010.88. PubMed PMID: 20348954.

Dedeurwaerder S, Defrance M, Bizet M, Calonne E, Bontempi G, Fuks F. A comprehensive overview of Infinium HumanMethylation450 data processing. *Brief Bioinform*. 2014;15(6):929-41. 94.

De Oliveira SR, Da Silva IC, Mariz BA, Pereira AM, De Oliveira NF. DNA methylation analysis of cancer-related genes in oral epithelial cells of healthy smokers. *Arch Oral Biol.* 2015 Jun;60(6):825–33. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.02.022. PubMed PMID: 25791328.

Deng X, Hou C, Wang H, Liang T, Zhu L. Hypermethylation of WIF1 and its inhibitory role in the tumor growth of endometrial adenocarcinoma. *Mol Med Rep.* 2017 Nov;16(5):7497–503. doi: 10.3892/mmr.2017.7564. PubMed PMID: 28944908.

Ding J, Sun D, Xie P. Elevated microRNA-145 inhibits the development of oral squamous cell carcinoma through inactivating ERK/MAPK signaling pathway by down-regulating HOXA1. *Biosci Rep.* 2019 Jun 25;39(6). pii: BSR20182214. doi: 10.1042/BSR20182214. Print 2019 Jun 28. PubMed PMID: 31138758.

Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet.* 2009 Dec;41(12):1350-3. doi: 10.1038/ng.471. PubMed PMID: 19881528.

Dou M, Zhou X, Fan Z, Ding X, Li L, Wang S, et al. Clinical Significance of retinoic acid receptor beta promoter methylation in prostate cancer: a meta-analysis. *Cell Physiol Biochem.* 2018;2497–505. doi: 10.1159/000488268. PubMed PMID: 29554659.

Dvojakovska S, Popovic-Monevska D, Grcev A, Pancevski G, Benedetti A, Popovski V, et al. Promotor hypermethylated genes: Prospective diagnostic biomarkers in oral cancerogenesis. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018 Oct;46(10):1737-1740. doi: 10.1016/j.jcms.2018.07.019. PubMed PMID: 30100382.

Eljabo N, Nikolic N, Carkic J, Jelovac D, Lazarevic M, Tanic N, Milasin J. Genetic and epigenetic alterations in the tumour, tumour margins, and normal buccal mucosa of patients with oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018 Aug;47(8):976-982. doi: 10.1016/j.ijom.2018.01.020. PubMed PMID: 29449053.

Evans DGR, van Veen EM, Byers HJ, Wallace AJ, Ellingford JM, Beaman G, et al. Dominantly Inherited 5' UTR Variant Causing Methylation-Associated Silencing of BRCA1 as a Cause of Breast and Ovarian Cancer. *Am J Hum Genet.* 2018 Aug 2;103(2):213-220. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.07.002. PubMed PMID: 30075112.

Fang S, Gao H, Tong Y, Yang J, Tang R, Niu Y, et al. Long noncoding RNA-HOTAIR affects chemoresistance by regulating HOXA1 methylation in small cell lung cancer cells. *Lab Invest.* 2016 Jan;96(1):60–8. doi: 10.1038/labinvest.2015.123. PubMed PMID: 26707824.

Ferlazzo N, Currò M, Zinellu A, Caccamo D, Isola G, Ventura V, et al. Influence of MTHFR Genetic Background on p16 and MGMT Methylation in Oral Squamous Cell Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 29;18(4). pii: E724. doi: 10.3390/ijms18040724. PubMed PMID: 28353639; PubMed Central PMCID: PMC5412310.

Flanagan J, Munoz-Alegre M, Henderson S, Tang T, Sun P, Johnson N, et al. Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. *Hum Mol Genet.* 2009 Apr 1;18(7):1332–42. doi: 10.1093/hmg/ddp033. PubMed PMID: 19153073.

Gao S, Eiberg H, Krogdahl A, Liu CJ, Sorensen JA. Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2005 Feb; 34(2):116-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2004.00275.x. PubMed PMID: 15641992

Gao Y, Teschendorff A. Epigenetic and genetic deregulation in cancer target distinct signaling pathway domains. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 25;45(2):583–96. doi: 10.1093/nar/gkw1100. PubMed PMID: 27899617.

Guo M, Chen Y, Chen Q, Guo X, Yuan Z, Kang L, Jiang Y. Epigenetic changes associated with increased estrogen receptor alpha mRNA transcript abundance during reproductive maturation in chicken ovaries. *Anim Reprod Sci.* 2020 Mar;214:106287. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106287. Epub 2020 Jan 18. PubMed PMID: 32087914.

Harahap WA, Sudji IR, Nindrea RD. NBR2 Promoter Methylation and Clinicopathological Characteristics in Sporadic Breast Cancer Patients in Indonesia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018 Sep 26;19(9):2643-9. PubMed PMID: 30256562.

Haragannavar VC, Tegginamani AS, Raju S, Kudva S, Peter CD, Shruthi DK. Assessment of fragile histidine triad expression in ameloblastoma, odontogenic keratocyst and dentigerous cyst. *Indian J Pathol Microbiol*. 2019 Jan-Mar;62(1):3-6. doi: 10.4103/IJPM.IJPM.403.18. PubMed PMID: 3070685.

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Feb;18(2):541-50. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0347. Epub 2009 Feb 3. PubMed PMID: 19190158.

Hassan NM, Hamada J, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M, et al. Aberrant expression of HOX genes in oral dysplasia and squamous cell carcinoma tissues. *Oncol Res*. 2006;16(5):217-24. PubMed PMID: 17294802.

Hayashi M, Wu G, Roh JL, Chang X, Li X, Ahn J, et al. Correlation of gene methylation in surgical margin imprints with locoregional recurrence in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2015 Jun 15;121(12):1957-65. doi: 10.1002/cncr.29303. Epub 2015 Mar 13. PubMed PMID: 25773145.

Hussein AA, Helder MN, de Visscher JG, Leemans CR, Braakhuis BJ, de Vet HCW, Forouzanfar T. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review. *Eur J Cancer*. 2017 Sep;82:115-27. doi: 10.1016/j.ejca.2017.05.026. PubMed PMID: 28654785.

Illumina®. Infinium® HumanMethylation450 Beadchip. The ideal solution for affordable, large size sample-size genome wide methylation studies. Data Sheet: Epigenetics; 2012.

Imgenberg-Kreuz J, Sandling JK, Almlöf JC, Nordlund J, Signer L, Norheim KB, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in multiple tissues in primary Sjogren's syndrome reveals regulatory effects at interferon-induced genes. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(11):2029-36.

Instituto Nacional de Câncer - INCA [Internet]. Rio de Janeiro: INCA [cited 2020 Mar 02]. Estimativa 2020. Incidência de câncer no Brasil. Available from: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.

Irimie AI, Ciocan C, Gulei D, Mehterov N, Atanasov AG, Dudea D, Berindan-Neagoe I. Current Insights into Oral Cancer Epigenetics. *Int. J. Mol. Sci.* 2018 Feb 27; 19(3): 670. doi:10.3390/ijms19030670. PubMed PMID: 29495520.

Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF- β superfamily signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003 Feb;13(1):43–7. doi: 10.1016/S0959-437X(03)00007-8. PubMed PMID: 12573434.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet.* 2009 Feb;41(2):178-86. doi: 10.1038/ng.298. PubMed PMID: 19151715.

Jayaprakash C, Radhakrishnan R, Ray S, Satyamoorthy K. Promoter methylation of MGMT in oral carcinoma: A population-based study and meta-analysis. *Arch Oral Biol.* 2017 Aug;80:197-208. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.04.006. PubMed PMID: 28458179.

Jelinek J, Gharibyan V, Estecio MR, Kondo K, He R, Chung W, et al. Aberrant DNA methylation is associated with disease progression, resistance to imatinib and shortened survival in chronic myelogenous leukemia. *PLoS One.* 2011;6(7):e22110. doi: 10.1371/journal.pone.0022110. PubMed PMID: 21760961.

Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. *Genes Dis.* 2018 Jan 31;5(1):1–8. doi: 10.1016/j.gendis.2018.01.002.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998;19(2):187–191.

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews.* 2012 May 29, (13):484-92. doi: 10.1038/nrg3230. PubMed PMID: 22641018.

Khor GH, Froemming GRA, Zain RB, Thomas Abraham M, Omar E, Tan SK, et al. DNA methylation profiling revealed promoter hypermethylation-induced silencing of p16, DDAH2 and DUSP1 in primary oral squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci.* 2013 Oct;10(12):1727–39. doi: 10.7150/ijms.6884. PubMed PMID: 24155659

Kudo Y, Tsunematsu T, Takata T. Oncogenic role of RUNX3 in head and neck cancer. *J. Cell. Biochem.* 2011 Feb;112(2):387–93. doi:10.1002/jcb.22967. PubMed PMID: 21268058.

Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* 2010 Mar;11(3):204–20. doi:10.1038/nrg2719. PubMed PMID: 20142834.

Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics.* 2012 Mar 15;28(6): 882–3. doi: 10.1093/bioinformatics/bts034. PubMed PMID: 22257669.

Li Q, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi X, Lee C, et al. Causal Relationship between the Loss of RUNX3 Expression and Gastric Cancer. *Cell.* 2002 Apr 5;109(1):113-24. PubMed PMID: 11955451.

Lim AM, Candiloro IL, Wong N, Collins M, Do H, Takano EA, et al. Quantitative methodology is critical for assessing DNA methylation and impacts on correlation with patient outcome. *Clin Epigenetics.* 2014 Dec 9;6(1):22. doi: 10.1186/1868-7083-6-22. PubMed MID: 25859283.

Lim KH, Park ES, Kim DH, Cho KC, Kim KP, Park YK, et al. Suppression of interferon-mediated anti-HBV response by single CpG methylation in the 5'-UTR of TRIM22. *Gut.* 2018 Jan;67(1):166-178. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312742. Epub 2017 Mar 23. PubMed PMID: 28341749.

Lin HY, Hung SK, Lee MS, Chiou WY, Huang TT, Tseng CE, et al. DNA methylome analysis identifies epigenetic silencing of FHIT as a determining factor for radiosensitivity in oral cancer: an outcome-predicting and treatment-implicating study. *Oncotarget.* 2015 Jan 20;6(2):915-34. doi: 10.18632/oncotarget.282. PubMed PMID: 25460508.

Liu H, Liu X, Dong G, Zhou J, Liu Y, Gao Y, et al. P16 Methylation as an Early Predictor for Cancer Development From Oral Epithelial Dysplasia: A Double-blind Multicentre Prospective Study. *E Bio Medicine.* 2015 Mar 23;2(5):432–7. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.03.015. PubMed PMID: 2613758.

Majumdar B, Patil S, Sarode SC, Sarode GS, Rao RS. Clinico-pathological prognosticators in oral squamous cell carcinoma: An update. *Translational Research in Oral Oncology* 2 (2017): Doi: 2057178X17738912.

Maleva KI, Jakimovska M, Popovska-Jankovic K, Kubelka-Sabit K, Karagjozov M, Plaseska-Karanfilska D. TIMP3 Promoter Methylation Represents an Epigenetic Marker of BRCA1ness Breast Cancer Tumours. *Pathol Oncol Res.* 2018 Oct;24(4):937-40. doi: 10.1007/s12253-018-0398-4. Epub 2018 Mar 9. PubMed PMID: 29524167.

McGuire MH, Herbrich SM, Dasari SK, Wu SY, Wang Y, Rupaimoole R, et al. Pan-cancer genomic analysis links 3'UTR DNA methylation with increased gene expression in T cells. *EBioMedicine.* 2019 May;43:127-37. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.04.045. PubMed MID: 31056473.

Mielcarek-Kuchta D, Paluszczak J, Seget M, Kiwerska K, Biczysko W, Szyfter K, et al. Prognostic factors in oral and oropharyngeal cancer based on ultrastructural analysis and DNA methylation of the tumor and surgical margin. *Tumour Biol.* 2014 Aug;35(8):7441–9. doi: 10.1007/s13277-014-1958-1. PubMed PMID: 24782031.

Mohanta S, Sekhar Khora S, Suresh A. Cancer Stem Cell based molecular predictors of tumor recurrence in Oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol.* 2019 Mar;99:92-106. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.01.002. Epub 2019 Jan 4. PubMed PMID: 30641296.

National Cancer Institute - NIH [Internet]. Bethesda (Maryland): NIH [cited 2020 Mar 14]. Genome Data Commons Data Portal. Available from: <https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000012048>.

Noorlag R, van Kempen PM, Moelans CB, de Jong R, Blok LE, Koole R, et al. Promoter hypermethylation using 24-gene array in early head and neck cancer: better outcome in oral than in oropharyngeal cancer. *Epigenetics.* 2014 Sep;9(9):1220-7. doi: 10.4161/epi.29785. PubMed MID: 25147921.

Paluszczak J, Sarbak J, Kostrzevska-Poczekaj M, Kiwerska K, Jarmuż-Szymczak M, et al. The negative regulators of Wnt pathway—DACH1, DKK1, and WIF1 are methylated in oral and oropharyngeal cancer and WIF1 methylation predicts shorter survival. *Tumour Biol.* 2015 Apr;36(4):2855–61. doi: 10.1007/s13277-014-2913-x. PubMed PMID: 25487617.

Pannone G, Bufo P, Santoro A, Franco R, Aquino G, Longo F, et al. WNT pathway in oral cancer: epigenetic inactivation of WNT-inhibitors. *Oncol Rep.* 2010 Oct;24(4):1035-41. doi: 10.3892/or.2010.1035. PubMed PMID: 20811686.

Park J, Kim H-J, Rim Kim K, Kyoung Lee S, Kim H, Park K-K, et al. Loss of RUNX3 expression inhibits bone invasion of oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Feb 7;8(6):9079–92. doi: 10.18632/oncotarget.14071. PubMed PMID: 28030842.

Patai ÁV, Barták BK, Péterfia B, Micsik T, Horváth R, Sumánszki C, et al. Comprehensive DNA Methylation and Mutation Analyses Reveal a Methylation Signature in Colorectal Sessile Serrated Adenomas. *Pathol Oncol Res*. 2017 Jul;23(3):589-94. doi: 10.1007/s12253-016-0154-6. PubMed PMID:27896617.

Prachayakul V, Kanchanapermpoon J, Thuwajit C, Boonyaarunnate T, Pongpaibul A, Chobson P, et al. DNA Methylation Markers Improve the Sensitivity of Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography-Based Brushing Cytology in Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *Technol Cancer Res Treat*. 2017 Dec;16(6):1252–8. doi: 10.1177/1533034617748090. PubMed PMID: 29484968.

Pu W, Geng X, Chen S, Tan L, Tan Y, Wang A, Lu Z, Guo S, Chen X, Wang J. Aberrant methylation of CDH13 can be a diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma. *J Cancer*. 2016 Nov 25;7(15):2280-2289. eCollection 2016. PubMed PMID: 27994665; PubMed Central PMCID: PMC5166538.

Ramachandran I, Ganapathy V, Gillies E, Fonseca I, Sureban SM, Houchen CW, et al. Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell Death Dis*. 2014 May 22;5(5):1246-312. doi: 10.1038/cddis.2014.219. PubMed PMID: 24853424.

Rasmussen K, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev*. 2016 Apr 1;30(7):733–50. doi: 10.1101/gad.276568.115. PubMed PMID: 27036965.

Rasmussen SL, Krarup HB, Sunesen KG, Pedersen IS, Madsen PH, Ussing OT. Hypermethylated DNA as a biomarker for colorectal cancer: A systematic review. *Colorectal. Dis*. 2016 Jun;18(6):549–61. doi: 10.1111/codi.13336. PubMed PMID: 26998585.

RefSeq. NCBI Reference Sequence DataBase. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [Internet]. Bethesda (Maryland): RefSeq.[cited 2019 Nov 02]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>.

Ribeiro IP, Marques F, Barroso L, Miguéis J, Caramelo F, Santos A, et al. Genetic and epigenetic characterization of the tumors in a patient with a tongue primary tumor, a recurrence and a pharyngoesophageal second primary tumor. *Mol Cytogenet.* 2017 Apr 11;10:13. doi: 10.1186/s13039-017-0310-z. eCollection 2017. PubMed PMID: 28413448.

Ribeiro IP, Rodrigues JM, Mascarenhas A, Kosyakova N, Caramelo F, Liehr T, et al. Cytogenetic , genomic , and epigenetic characterization of the HSC-3 tongue cell line with lymph node metastasis. *J Oral Sci.* 2018 Mar 24;60(1):70–81. doi: 10.1300/J377v26n02. PubMed PMID: 29479029.

Ribeiro IP, Caramelo F, Esteves L, Oliveira C, Marques F, Barroso L, et al. Genomic and epigenetic signatures associated with survival rate in oral squamous cell carcinoma patients. *J Cancer.* 2018;9(11):1885–1895. Published 2018 Apr 27. doi:10.7150/jca.23239.

Rideout WMIII, Coetzee GA, Olumi AF e Jones PA. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science.* 1990 Sep 14; 249(4974):1288-90. doi: 10.1126/science.1697983. PubMed PMID: 1697983.

Rivera C, González-Arriagada WA, Loyola-Brambilla M, de Almeida OP, Coletta RD, Venegas B. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in Chilean population. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Aug 15;7(9):5968-77. eCollection 2014. PubMed PMID: 25337241.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Peters TJ, Buckley MJ, et al. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8:6. 96. Martin TC, Yet I, Tsai PC, Bell JT. coMET: visualisation of regional epigenome-wide association scan results and DNA co-methylation patterns. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:131. 97.

Rigi-Ladiz MA, Kordi-Tamandani DM, Torkamanzehi A. Analysis of hypermethylation and expression profiles of APC and ATM genes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Epigenetics.* 2011 Nov 1;3:6. doi: 10.1186/1868-7083-3-6. PubMed PMID: 22414247.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research.* 2015 Apr 20;43(7):e47. doi: 10.1093/nar/gkv007. PubMed PMID: 25605792.

Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*. 2011 Jun;6(6):692-702. doi: 10.4161/epi.6.6.16196. PubMed PMID: 21593595.

Schalkwyk LC, Pidsley, Ruth, Wong YCC. A data-driven approach to preprocessing illumina 450K methylation array data. *BMC Genomics*. 2013 May 1;14:293. doi: 10.1186/1471-2164-14-293.

Sharma R, Panda N, Khullar M. Hypermethylation of carcinogen metabolism genes, CYP1A1, CYP2A13 and GSTM1 genes in head and neck cancer. *Oral Dis*. 2010 Oct;16(7):668–73. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01676.x. PubMed PMID: 20846153.

Shaw RJ, Hall GL, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Field JK, et al. Quantitative methylation analysis of resection margins and lymph nodes in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2007;45(8):617-22.

Sinha P, Bahadur S, Thakar A, Matta A, Macha M, Ralhan R, et al. Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue. *Head Neck*. 2009;31(11):1423-30.

Stephen JK, Chen KM, Raitanen M, Grénman S, Worsham MJ. DNA hypermethylation profiles in squamous cell carcinoma of the vulva. *Int. J. Gynecol. Pathol*. 2009 Jan;28(1):63–75. doi: 10.1097/PGP.0b013e31817d9c61. PubMed PMID: 19047905.

Stephen JK, Chen KM, Merritt J, Chitale D, Divine G, Worsham MJ. Methylation markers differentiate thyroid cancer from benign nodules. *J Endocrinol Invest*. 2018 Feb;41(2):163-70. doi: 10.1007/s40618-017-0702-2. Epub 2017 Jun 13. PubMed PMID: 28612287.

Stirzaker C, Taberlay PC, Statham AL, Clark SJ. Mining cancer methylomes: prospects and challenges. *Trends Genet*. 2014 Feb;30(2):75-84. doi: 10.1016/j.tig.2013.11.004. PubMed PMID: 24368016.

Strzelczyk JK, Krakowczyk Ł, Owczarek AJ. Methylation status of SFRP1, SFRP2, RASSF1A, RAR β and DAPK1 genes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol*. 2019;98:265–72. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.12.001

Su CW, Chang YC, Chien MH, Hsieh YH, Chen MK, Lin CW, Yang SF. Loss of TIMP3 by promoter methylation of Sp1 binding site promotes oral cancer metastasis. *Cell Death Dis.* 2019 Oct 17;10(11):793. doi: 10.1038/s41419-019-2016-0. PubMed PMID: 31624299; PubMed Central PMCID: PMC6797751.

Subramaniam MM, Chan JY, Yeoh KG, Quek T, Ito K, Salto-Tellez M. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis *Biochim Biophys Acta.* 2009 Dec;1796(2):315-31. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.07.004. PubMed PMID: 19682550.

Supic G, Kozomara R, Branković-Magić M, Jović N, Magić Z. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2009 Dec;45(12):1051–7. doi:10.1016/j.oraloncology.2009.07.007. PubMed PMID: 19665921.

Supic G, Kozomara R, Jovic N, Zeljic K, Magic Z. Prognostic significance of tumor-related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2011 Aug;47(8):702–8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.05.014. PubMed PMID: 21697000.

Teodoridis J, Hall J, Marsh S, Kannall H, Smyth C, Curto J, et al. CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer. *Cancer Res.* 2005 Oct;65(19):8961–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1187. PubMed PMID: 16204069.

Teschendorff AE, Lee SH, Jones A, Fiegl H, Kalwa M, Wagner W, et al. HOTAIR and its surrogate DNA methylation signature indicate carboplatin resistance in ovarian cancer. *Genome Med.* 2015 Oct 24;7:108. doi: 10.1186/s13073-015-0233-4. PubMed PMID: 26497652.

The Cancer Genome Atlas - TCGA [Internet]. Bethesda (Mayland):TCGA [cited 2019 Mar 02] Genomic Data Commons Data Portal. Available from: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>

Thomson PJ. Oral carcinogenesis. Oral Precancer diagnosis and management of potentially malignant disorders. Chichester, UK: Wiley-Blackwell; 2012:31-47. ISBN: 978-1-444-33574-3.

Towle R, Garnis C. Methylation-mediated molecular dysregulation in clinical oral malignancy. *J. Oncol.* 2012;2012:170172. doi: 10.1155/2012/170172. PubMed PMID: 22645611.

Towle R, Truong D, Hogg K, Robinson W, Poh C, Garnis C. Global analysis of DNA methylation changes during progression of oral cancer. *Oral Oncol*. 2013 Nov;49(11):1033-42. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.08.005. PubMed PMID: 24035722.

Tsantoulis P, Kastrinakis N, Tourvas A, Laskaris G, Gorgoulis V. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol*. 2007 Jul;43(6):523-34. doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.11.010. PubMed PMID: 17258495.

Uesugi H, Uzawa K, Kawasaki K, Shimada K, Moriya T, Tada A, et L. Status of reduced expression and hypermethylation of the APC tumor suppressor gene in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*. 2005 Apr;15(4):597-602. PubMed PMID: 15754020.

Vanaja DK, Ballman KV, Morlan BW, Cheville JC, Neumann RM, Lieber MM, et al. PDLIM4 repression by hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 15;12(4):1128-36. PubMed PMID: 16489065.

Van der Waal I, de Bree R, Brakenhoff R, Coebergh JW. Early diagnosis in primary oral cancer: is it possible? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 May 1;16(3):e300-5. doi: 10.4317/medoral.16.e300. PubMed PMID: 21441877.

Vu TL, Nguyen TT, Doan VTH, Vo LTT. Methylation Profiles of NBR2, RASSF1A and GSTP1 in Vietnamese Women with Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018 Jul 27;19(7):1887-93. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.7.1887. PubMed PMID: 30049201.

Wang T, Hsia S, Shih Y, Shieh T. Association of smoking, alcohol use, and betel quid chewing with epigenetic aberrations in cancers. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 6. doi: 10.3390/ijms18061210. PubMed PMID: 28587272.

World Cancer Research Fund International - WCRFI [Internet]. London (United Kingdom): WCRFI [cited 2020 Feb 01]. Worldwide cancer data, global cancer statistics for the most common cancers. 2019. Available from: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>.

Wen G, Wang H, Zhong Z. Associations of RASSF1A, RAR β , and CDH1 promoter hypermethylation with oral cancer risk: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Mar;97(11):e9971. doi: 10.1097/MD.00000000000009971. PMID: 29538221; PMCID: PMC5882397.

World Health Organization - WHO [Internet]. Geneva (Switzerland): WHO. [cited 2020 May 12]. Cancer. Available from: <http://www.who.int/cancer/en/>

Wong TS, Tang KC, Kwong DLW, Sham JST, Wei WI, Kwong YL, et al. Differential gene methylation in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Oncol*. 2003 Apr;22(4):869–74. PubMed PMID: 12632081.

Ye M, Huang T, Li J, Zhou C, Yang P, Ni C, et al. Role of CDH13 promoter methylation in the carcinogenesis, progression, and prognosis of colorectal cancer: A systematic meta-analysis under PRISMA guidelines. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Jan;96(4):e5956. doi: 10.1097/MD.0000000000005956. PubMed PMID: 28121942.

Yeh KT, Chang JG, Lin TH, Wang YF, Tien N, Chang JY, et al. Epigenetic changes of tumor suppressor genes, P15, P16, VHL and P53 in oral cancer. *Oncol Rep*. 2003 May-Jun;10(3):659-63. PubMed PMID: 12684640.

Zhao Z, Liu W, Liu J, Wang J, Luo B. The effect of EBV on WIF1, NLK, and APC gene methylation and expression in gastric carcinoma and nasopharyngeal cancer. *J Med Virol*. 2017 Oct;89(10):1844–51. doi: 10.1002/jmv.24863. PubMed PMID: 28543390.

Zhang W, Spector TD, Deloukas P, Bell JT, Engelhardt BE. Predicting genome-wide DNA methylation using methylation marks, genomic position, and DNA regulatory elements. *Genome Biol*. 2015 Jan 24;16:14. doi: 10.1186/s13059-015-0581-9. PubMed PMID: 25616342.

Zhou S, Chen L, Mashrah M, Zhu Y, He Z, Hu Y, et al. Expression and promoter methylation of Wnt inhibitory factor-1 in the development of oral submucous fibrosis. *Oncol Rep*. 2015 Nov;34(5):2636–42. doi: 10.3892/or.2015.4264. PubMed PMID: 17912431.

Zhou S, Shen Y, Zheng M, Wang L, Che R, Hu W, Li P. DNA methylation of METTL7A gene body regulates its transcriptional level in thyroid cancer. *Oncotarget*. 2017 May 23;8(21):34652-60. doi: 10.18632/oncotarget.16147. PMID: 28416772; PMCID: PMC5470999.