

Alterações nos padrões de metilação do DNA e o desenvolvimento de Câncer Oral

Changes in DNA Methylation Patterns and the Development of Oral Cancer

Cambios en los patrones de metilación del ADN y el desarrollo de cáncer oral

Thiago dos Santos da Silva¹, Melissa de Freitas Cordeiro Silva²

Resumo:

Introdução: O câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia mais comum do mundo e cerca de metade dos casos relatados representam câncer na cavidade oral, tendo como o Carcinoma Epidermoide Oral (CEO) seu tipo histológico mais recorrente. Embora correlacionado com alterações genéticas, alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, podem atuar como ativador ou supressor de mecanismos relacionados ao desenvolvimento de câncer. **Método:** Foi realizada uma revisão sistemática utilizando o banco de dados da PubMed, no período de 2010 a 2021, foram selecionados artigos originais, em inglês e de triagem clínica, com associação positiva entre alterações de metilação de DNA e desenvolvimento do CEO ou associação positiva entre alteração no padrão de metilação do DNA e tabagismo no desenvolvimento de CEO. **Resultados:** Os artigos selecionados demonstraram que alterações no padrão de hipermetilação dos genes *AGTR1*, *FOXI2*, *PENK*, *EDNRB*, *KIFIA*, *MAP3K14*, *PTEN*, *p16*, *WT1*, *MSH6* e *PAX5* e de hipometilação global de *LINE1* e do gene *TNF* estão associadas ao desenvolvimento de CEO, entretanto nenhum estudo presente nesta revisão demonstrou a correlação entre alteração no padrão de metilação e o tabagismo. **Conclusão:** Alterações no padrão de metilação de DNA e o desenvolvimento de CEO são bastante relatados na literatura, estes estudos propiciam o progresso de novos métodos de diagnóstico e tratamento. Padrões de metilação dos genes *TNF* e *MAP3K14* e o desenvolvimento de CEO precisam ser elucidados. No que diz respeito ao tabagismo, nenhum trabalho encontrou correlação do hábito e alterações no padrão de metilação foi encontrada.

Palavras-Chave: Metilação de DNA, CEO, Câncer Oral.

^{1,2} Centro Universitário UniSales, Vitória (ES), Brasil. E-mails: thiagosantos0369@hotmail.com; mcordeiro@salesiano.br

Endereço para correspondência: Melissa de Freitas Cordeiro Silva. Centro Universitário UniSales, Av. Vitória, 950 - Forte São João, Vitória (ES), Brasil. CEP: 29017-95.

Abstract:

Introduction: Head and neck cancer is the sixth most common neoplasm in the world and about half of the reported cases represent cancer in the oral cavity, with Oral Epidermoid Carcinoma (OEC) being its most recurrent histological type. Although correlated with genetic alterations, epigenetic alterations, such as DNA methylation which can act as activator and suppressor of mechanisms related to cancer development.

Methods: A systematic review was carried out using the PubMed database, from 2010 to 2021. Original articles, in English and clinical screening were selected with a positive association between DNA methylation alterations and OEC development or positive association between DNA methylation pattern alterations and smoking in OEC development. **Results:** The selected articles demonstrated that alterations in the hypermethylation pattern of the genes AGTR1, FOXI2, PENK, EDNRB, KIF1A, MAP3K14, PTEN, p16, WT1, MSH6 and PAX5 and global hypomethylation of LINE1 and the TNF gene are associated with the development of OEC, however, no study present in this review demonstrated a correlation between changes in the methylation pattern and smoking. **Conclusion:** Changes in the DNA methylation pattern and the development of OEC are widely reported in the literature, these studies favor the progress of new methods of diagnosis and treatment. Methylation patterns of the TNF and MAP3K14 genes and the development of OEC need to be elucidated. Regarding smoking, no study found a relationship between the habit and changes in the methylation pattern.

Key words: DNA Methylation, OEC, Oral Cancer.

Resumen:

Introducción: El cáncer de cabeza y cuello es la sexta neoplasia más común en el mundo y aproximadamente la mitad de los casos reportados representan cáncer en la cavidad oral, siendo el carcinoma epidermoide oral (OEC) su tipo histológico más recurrente. Aunque se correlaciona con alteraciones genéticas, alteraciones epigenéticas, como la metilación del ADN puede actuar como activador y supresor de los mecanismos relacionados con el cáncer. **Método:** Se realizó una revisión sistemática utilizando la base de datos PubMed, de 2010 a 2021, se seleccionaron artículos originales en inglés y cribado clínico, con asociación positiva entre alteraciones de la metilación del ADN y CEO o asociación positiva entre en el patrón de metilación del ADN y tabaquismo e CEO.

Resultados: Los artículos seleccionados demostraron que las alteraciones en el patrón de hipermetilación de los genes *AGTR1*, *FOXI2*, *PENK*, *EDNRB*, *KIF1A*, *MAP3K14*, *PTEN*, *p16*, *WT1*, *MSH6* y *PAX5* y de la hipometilación global de LINE1 y el gen TNF están asociadas al desarrollo de CEO. Ningún estudio presente en esta revisión demostró una correlación entre los cambios en el patrón de metilación y el tabaquismo. **Conclusión:**

Los cambios en el patrón de metilación del ADN y CEO son ampliamente reportados en la literatura, estos estudios favorecen el avance de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento. Es necesario dilucidar los patrones de metilación de los genes *TNF* y *MAP3K14* y el desarrollo de los CEO. Cuanto, al tabaquismo, ningún estudio encontró relación entre el hábito y los cambios en el patrón de metilación.

Palabras clave: Metilación del ADN, CEO, Cáncer oral

INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia mais comum do mundo e cerca de metade dos casos relatados representam câncer na cavidade oral, tendo como o Carcinoma Epidermoide Oral (CEO) seu tipo histológico mais recorrente, correspondendo aproximadamente a 90% das alterações tumorais que atingem essa região¹⁻³.

Embora correlacionado com alterações genéticas, o desenvolvimento do câncer é bastante associado a alterações epigenéticas que independem de mutações na sequência do DNA⁴⁻⁷. Dentre as alterações no epigenoma, padrões anormais de metilação do DNA e o desenvolvimento de câncer já foram relatados na literatura^{8,9}.

A metilação do DNA exerce influência em diversos processos no organismo, como a recombinação durante a meiose, controle de replicação, estabilização e manutenção da expressão gênica, entre outros¹⁰. O mecanismo de metilação interfere diretamente na acessibilidade do maquinário transcripcional a cromatina impactando nos processos decorrentes^{11,12}, dessa forma, tanto a hipometilação quanto a hipermetilação estão associadas a instabilidade genômica, visto que a hipometilação já foi associada com a ativação de proto-oncogenes e a hipermetilação está envolvida no mecanismo de repressão de diversos genes considerados supressores de tumor^{13,14}.

Por não ser um evento aleatório, diversos fatores exógenos e endógenos já foram associados a padrões anormais de metilação do DNA¹⁵, e o consequente desenvolvimento de CEO^{16,17}. Dos fatores exógenos, a alimentação, o estresse, exposição química, fármacos e inflamações, podem induzir a ocorrência de alterações no epigenoma¹⁸⁻²¹.

Diversos estudos já associaram as alterações no epigenoma a exposição a fumaça do cigarro²²⁻²⁴. Conforme Lin e colaboradores²⁵ e Zeilinger²⁶, hábitos de vida como consumo de álcool e tabaco, aumentam o risco para o câncer oral, porém como esses fatores influenciam a metilação do DNA na carcinogênese oral não são totalmente esclarecidos²⁷.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão sobre as alterações dos padrões epigenéticos de metilação do DNA no desenvolvimento do câncer oral, bem como sua associação com o tabagismo.

METODOLOGIA

Este trabalho é uma revisão sistemática, para tal, foi utilizado o acervo de publicações veiculadas em periódicos indexados no banco de dados da *National Library of Medicine* (Medline) disponível no site de buscas PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), que como relatado por Bramer e colaboradores²⁸, representa um banco de dados especializado com ferramentas para otimizar a precisão, como o sistema de filtros de busca. E nesta pesquisa que foram aplicados os seguintes filtros de busca: *Classical Article, Clinical Trial, English*. O período estimado mínimo de busca foi de 10 anos (01/01/2011 a 01/01/2021). Instituído um mínimo de 5 artigos para a composição do presente estudo, caso o nº mínimo não fosse alcançado seria adicionado 1 ano de abrangência a busca. Os artigos a serem inclusos deveriam respeitar os seguintes critérios: Artigos originais em inglês, recentes e datados conforme a abrangência final, com associação positiva entre alterações de metilação de DNA e desenvolvimento do CEO ou associação positiva entre alteração no padrão de metilação do DNA e tabagismo no desenvolvimento de CEO. Para a execução da pesquisa foram utilizados dos seguintes termos de busca: *Promoter gene hypermethylation and oral cancer risk, promoter gene hypermethylation and oral cancer development, promoter gene hypermethylation and OSCC risk, global hypomethylation and oral cancer risk, DNA methylation and smoking cancers, DNA methylation changes and oral Cancer, epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma.*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, a busca resultou em 20 artigos, no período de 01/01/2010 a 01/01/2021, todos de triagem clínica, dos quais 5 atenderam os termos de inclusão, que se encontram expostos na tabela 1. Os genes com metilação aberrante que foram correlacionados estatisticamente com o desenvolvimento de CEO estão sintetizados na tabela 2. Os genes encontrados também foram classificados de acordo com a sua função no desenvolvimento do câncer e estão expostos na tabela 3. Quando determinado gene age induzindo a progressão do ciclo celular eles são chamados de proto-oncogenes que devido a alterações na cromatina tornam-se oncogênicos. Em contrapartida, o controle negativo se dá pelos genes supressores tumorais, que, atuam inibindo a expressão de algum fenótipo indesejável²⁹. Alterações epigenéticas e mutações nesses genes podem resultar na perda de mecanismos importantes para o controle do ciclo celular³⁰⁻³² podendo ocasionar um crescimento e desenvolvimento anormal das células quando comparada a células normais³²⁻³⁴, de tal forma que, muitos estudos sugerem que a expressão imprópria desses genes associados diretamente ao ciclo celular, contribuem para o desenvolvimento de diversas neoplasias^{31,32,34,35}.

Tabela 1 – Síntese dos artigos selecionados.

Artigo	Ano da Pesquisa	Local da pesquisa	Tipo de estudo	Genes avaliados	Alteração avaliada
Foy et al. ³⁶	2015	Houston – Texas (EUA)	Triagem Clínica	<i>AGTR1, FOXI2, HOXA9, PENK e ZIC1</i>	Hipermetilação e hipometilação global
Pattani et al. ³⁷	2010	New York, Massachusetts e Florida (EUA) e Porto Rico (PR)	Triagem Clínica	<i>EDNRB e KIF1A</i>	Hipermetilação
Towle et al. ³⁸	2013	Vancouver - CA	Triagem Clínica	<i>DAPK1, RUNX3, SFRP4, CDKN2A, MGMT, TNF, MAP3K14</i>	Hipermetilação, hipometilação de genes específicos
Sushma et al. ³⁹	2016	haidaraabaad – IN	Triagem Clínica	<i>PTEN e P16</i>	Hipermetilação
Ribeiro et al. ⁴⁰	2016	Coimbra - PT	Triagem Clínica	<i>WT1, MSH6, GATA5 e PAX5</i>	Hipermetilação

Fonte: Elaboração própria, 2021.

Tabela 2 - Genes com metilação aberrante associados com o desenvolvimento de CEO nos artigos obtidos.

Artigos	Genes	Alteração Observada
Foy et al., (2015) ³⁶	<i>AGTR1, FOXI2, PENK</i>	Hipermetilação
Pattani et al. (2010) ³⁷	<i>EDNRB, KIF1A</i>	Hipermetilação
Towle et al. (2013) ³⁸	<i>MAP3K14, TNF</i>	Hipermetilação, Hipometilação
Sushma et al. (2016) ³⁹	<i>PTEN, P16</i>	Hipermetilação
Ribeiro et al. (2016) ⁴⁰	<i>MSH6, WT1, PAX5</i>	Hipermetilação

Fonte: Elaboração própria, 2021.

Tabela 3 – Classificação dos genes associados com o desenvolvimento de CEO nos estudos.

Classificação	Genes
Oncogene	<i>AGTR1⁴¹, FOXI2⁴² e MAP3K14⁴³</i>
Supressor Tumoral	<i>PENK⁴⁴, EDNRB⁴⁵, KIF1A⁴⁶, PTEN⁴⁷, P16⁴⁸, MSH6⁴⁹, WT1⁵⁰, PAX5⁵¹ e TNF⁵²</i>

Fonte: Elaboração própria, 2021.

Foy e colaboradores³⁶, investigaram o percentual de metilação de 5 genes, *AGTR1*, *FOXI2*, *PENK*, *ZIC1* e *HOXA9*, em tecidos acometidos pelo câncer da cavidade oral. Seus achados sugerem uma correlação significativa entre a metilação na região promotora dos genes *AGTR1* ($p=0,0004$), *FOXI2* ($p=0,0021$), *PENK* ($p<0,0001$) e CEO. Para os genes *ZIC1* e *HOXA9*, não foram encontradas relação com o desenvolvimento do câncer oral. Esses resultados foram confirmados por Saintigny e colaboradores⁵³, que encontraram que o grau de metilação de *AGTR1* ($p<0,0001$), *FOXI2* ($p=0,0002$) e *PENK* ($p=<0,0001$) foram significativamente maiores em pacientes que desenvolveram câncer oral comparados com os que não desenvolveram.

Foy e colaboradores³⁶, também investigaram o padrão de hipometilação global relacionada com a incidência de CEO, os autores mediram grau de metilação através de sequências repetitivas ao longo do genoma, em específico o *long-interspersed nuclear element-1 (LINE-1)*. Seus achados demonstraram uma associação positiva entre a hipometilação do *LINE-1* e desenvolvimento de CEO.

A hipometilação global é característico em diversos cânceres, dentre estes o de cabeça e pescoço^{54,55}. Misawa e colaboradores⁵⁶, analisaram níveis de hipometilação do *LINE-1* como prognóstico de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço e CEO e conforme seus resultados, a hipometilação do *LINE-1* resulta em um prognóstico desfavorável para o câncer da cavidade oral. Caliri e outros⁵⁷, quantificaram os níveis de metilação do *LINE-1* em fumantes, que demonstraram uma perda significativa de metilação nesses elementos transponíveis ($p=0,03078$). Andreotti e colaboradores⁵⁸, identificaram uma associação entre o hábito de fumar e hipometilação de *LINE-1* com o risco de desenvolvimento de câncer e mortalidade da doença⁵⁹.

De acordo com Prak e outros⁶⁰, elementos repetitivos de DNA correspondem a cerca de 50% do genoma humano e acredita-se que a perda de metilação global observada em diversos tipos de cânceres seja principalmente devido a hipometilação nos elementos móveis⁶¹. Assim, a análise de elementos de repetição do DNA, como o *LINE-1*, pode ser um marcador importante de metilação de DNA^{62,63}, e consequentemente de diversos cânceres, como o CEO^{56,64-66}.

Ao avaliarem padrões de metilação em determinadas regiões do DNA e sua relação com o aparecimento de CEO, Pattani e seus parceiros³⁷, verificaram uma correlação significativa entre a metilação da região promotora e o surgimento de tumores orais para os genes *EDNRB* ($p<0,0001$) e *KIF1A* ($p=0,014$), no entanto, sem nenhuma correlação com o tabagismo ($p=0,372$). Cordeiro-Silva e outros⁶⁷ analisaram metilação de diversos genes relacionado ao câncer oral, dentre os quais, o *EDNRB*, e em seus resultados, a hipermetilação do gene não foi associada ao uso de tabaco.

O aumento da metilação de *EDNRB* em tecidos acometidos pelo CEO é corroborada por Viet e colaboradores⁶⁸, que ao analisar diversos regiões do gene *EDNRB*, relataram uma diferença significativa entre indivíduos acometidos e não acometidos pelo CEO ($p=<0,001$), Morandi e outros⁶⁹ verificaram uma hipermetilação significativa na região promotora do gene *KIFIA* ($p<0,05$), sugerindo-o como possível marcador no prognóstico de tumores da cavidade oral.

Towle e colaboradores³⁸ analisaram o padrão de metilação da região promotora de tecidos CIS (Carcinoma *in situ*)/CEO, displásicos e normais adjacentes de 30 biópsias, a fim de avaliar as alterações no padrão de metilação no desenvolvimento de CEO e evitar a influência de hábitos como o tabagismo, e encontraram uma associação positiva, e independente, entre a hipermetilação do gene *MAP3K14* ($p=0,0029$), bem como a hipometilação do fator de necrose tumoral (*TNF*) (0,0068) no desenvolvimento de CEO. O papel do gene *MAP3K14* na carcinogênese ainda não foi completamente esclarecido⁷⁰. No entanto, alguns estudos já sugeriram que o *MAP3K14* pode atuar na migração de células cancerosas e que alterações no seu padrão de metilação e expressão estão associadas ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer^{38,71,72}, além do mais, a quinase indutora de NF-kB ou *MAP3K14*, devido a sua capacidade de regulação da proliferação celular, pode promover a tumorigênese^{73, 74}.

Boa parte dos cânceres atualmente conhecidos envolvem a ativação da via NF-kB⁷⁵. A ativação dessa via ocorre devido a liberação de citocinas pro-inflamatórias como TNFa e IL1, e através da sinalização cruzada o NF-kB afeta muitas vias de sinalização importantes para a regulação celular⁷⁶. Embora o mecanismo não seja completamente elucidado é sabido que a secreção de citocinas, como a TNFa, pode criar um mecanismo de feedback para a ativação de NF-kB continua e, concomitantemente, a expressão aberrante pode contribuir para o avanço de diversas neoplasias⁷⁷⁻⁷⁹, corroborando com os achados por Towle e colaboradores³⁸.

Malaponte e colaboradores⁸⁰, constataram uma correlação na modulação de NF-kB por TNFa em células tumorais de pacientes com câncer, sendo fortalecido por diversos achados que evidenciam a inflamação em estado crônico, potencializando o risco de desenvolvimento de câncer⁸¹⁻⁸³. Ademais, alguns estudos já evidenciaram o papel importante do TNFa no surgimento de neoplasias, dado que, ele pode atuar estimulando a produção de moléculas relacionadas a danos no DNA, como espécies reativas de oxigênio e ainda alterar os mecanismos de morte e proliferação celular⁸⁴⁻⁸⁶.

Sushma e colaboradores³⁹ relataram uma correlação positiva entre a metilação dos genes *PTEN* e *p16* e o desenvolvimento do CEO ($p=<0,0001$) ($p=0,017$), entretanto sem correlação entre a metilação e o tabagismo. Tanzawa e outros⁸⁷ encontraram correlação

significativa entre o padrão de metilação de *PTEN* e o desenvolvimento do CEO ($p=0,0104$). Quando aplicados para fumantes, a metilação no gene *PTEN* não foi significativo, porém apresentaram uma alta frequência de metilação na região promotora deste gene (31%).

Analizando o padrão de metilação do gene *p16* em fumantes sem câncer oral, Von Zeidler e outros⁸⁸, sugeriram que as alterações epigenéticas podem favorecer o aparecimento do tumor na cavidade oral, sendo, portanto, um provável biomarcador para a detecção precoce de CEO. Shaw e colegas⁸⁹ verificaram que a metilação do gene *p16* foi significativa quando comparado um tecido acometido por CEO e um tecido normal ($p=0,048$).

Ribeiro e colegas⁴⁰, descreveram o padrão de metilação de diversos genes e a sua correlação com o desenvolvimento de CEO, sem avaliar a correlação entre alterações no padrão de metilação e o tabagismo. A metilação do gene *WT1* foi mais frequentemente observado, seguida de *MSH6*, *PAX5* e *GATA5*. A metilação de *WT1* foi estatisticamente correlacionada com os estágios cancerosos T1 e T2 ($p=0,002$) e *GATA5* com os estágios T3 e T4 ($p=0,010$), a metilação de *PAX5* foi estatisticamente associada a acometimentos na língua ($p=0,008$) e quando *MSH6* encontrava-se metilado a amostra possuía 4 vezes mais chances de ser N1 ou N2. Os estágios tumorais T (I-IV) e N (I-IV), referem-se respectivamente ao tamanho do tumor e a sua ramificação, ou não para linfonodos próximos^{90, 91}.

Os autores também encontraram associação positiva entre a metilação no gene *MSH6* e o desenvolvimento de metástases e recidivas ($p=0,008$). Khongsti e colaboradores⁹² verificaram uma diferença significativa entre o padrão de metilação do gene *WT1* no tecido normal e o acometido por CEO ($p<0,001$). Conforme Oji e outros⁹³, este gene possui um papel relevante no crescimento e na diferenciação celular e tem sua super expressão correlacionada com o desenvolvimento de outros canceres, como o Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço⁹⁴.

De acordo com Norhany e colaboradores⁹⁵, o gene *PAX5*, apresenta altos níveis de expressão em tumores orais primários, sugerindo um papel relevante durante o desenvolvimento da carcinogênese oral. Alterações na metilação de *GATA5* foram correlacionadas com a metástase e recidivas durante e/ou depois do tratamento de CEO⁹⁶. Referente ao gene *MSH6*, conforme Buttin e colaboradores⁹⁷ este encontra-se diretamente correlacionado com mecanismos de reparo do DNA e uma possível associação com estágios mais avançados de câncer de língua.

No que diz respeito a influência do tabagismo nas alterações de metilação de DNA e o desenvolvimento de câncer oral, nenhum artigo foi encontrado, seguindo os critérios estabelecidos neste trabalho.

CONCLUSÃO

Os achados deste artigo evidenciam que alterações no padrão de hiper e hipometilação de DNA estão correlacionados com o desenvolvimento de CEO favorecendo a criação de novos métodos de diagnóstico e de tratamento. Referente aos genes *TNF* e *MAP3K14*, há a necessidade de novos estudos a fim de elucidar sua relação com o câncer de boca. Por fim os artigos selecionados não encontraram uma correlação entre o tabagismo e metilação aberrante de DNA.

Declaração de conflito de interesses: Nada a declarar.

REFERENCIAS

1. Chin D, Boyle GM, Porceddu S, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Head and neck cancer: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006 Jul [cited 2021 Nov 28];6(7):1111-8. doi: 10.1586/14737140.6.7.1111. PMID: 16831082.
2. Kademan D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc.* 2007 Jul;82(7):878-87. doi: 10.4065/82.7.878. Erratum in: *Mayo Clin Proc.* 2007 Aug [cited 2021 Nov 28];82(8):1017. PMID: 17605971.
3. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol.* 2010 Jun [cited 2021 Nov 28];46(6):414-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.009. Epub 2010 Apr 18. PMID: 20400366.
4. Dillenburg CS, Martins MAT, Almeida LO, Meurer L, Squarize CH, Martins MD, Castilho RM. Epigenetic Modifications and Accumulation of DNA Double-Strand Breaks in Oral Lichen Planus Lesions Presenting Poor Response to Therapy. *Medicine (Baltimore).* 2015 Jul [cited 2021 Nov 28] ;94(30):e997. doi: 10.1097/MD.0000000000000997. PMID: 26222871; PMCID: PMC4554108.
5. Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene.* 2003 Sep 29 [cited 2021 Nov 28];22(42):6479-83. doi: 10.1038/sj.onc.1206774. PMID: 14528271.
6. Teodoridis JM, Strathdee G, Brown R. Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. *Drug Resist Updat.* 2004 Aug-Oct;7(4-5) [cited 2021 Nov 28] :267-78. doi: 10.1016/j.drup.2004.06.005. PMID: 15533764.

7. Castilho RM, Squarize CH, Almeida LO. Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 12 [cited 2021 Nov 28];18(7):1506. doi: 10.3390/ijms18071506. PMID: 28704968; PMCID: PMC5535996.
8. Morgan AE, Davies TJ, Mc Auley MT. The role of DNA methylation in ageing and cancer. *Proc Nutr Soc.* 2018 Nov [cited 2021 Nov 28];77(4):412-422. doi: 10.1017/S0029665118000150. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29708096.
9. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet.* 2010 [cited 2021 Nov 28];70:27-56. doi: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2. PMID: 20920744.
10. Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet.* 2018 Sep 1 [cited 2021 Nov 28];392(10149):777-786. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31268-6. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30100054.
11. Gaillard SL, Zahurak M, Sharma A, Durham JN, Reiss KA, Sartorius-Mergenthaler S, Downs M, Anders NM, Ahuja N, Rudek MA, Azad N. A phase 1 trial of the oral DNA methyltransferase inhibitor CC-486 and the histone deacetylase inhibitor romidepsin in advanced solid tumors. *Cancer.* 2019 Aug 15 [cited 2021 Nov 28];125(16):2837-2845. doi: 10.1002/cncr.32138. Epub 2019 Apr 23. PMID: 31012962; PMCID: PMC6663621.
12. De OLIVEIRA, Naila Francis Paulo et al. DNA methylation and cancer. *Brazilian Journal of Cancerology.* 2010 [cited 2021 Nov 28];56(4):493–9.
13. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002 Jun;3(6) [cited 2021 Nov 28]:415-28. doi: 10.1038/nrg816. PMID: 12042769.
14. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010 Jan;31(1) [cited 2021 Nov 28]:27-36. doi: 10.1093/carcin/bgp220. Epub 2009 Sep 13. PMID: 19752007; PMCID: PMC2802667.
15. Estécio MR, Issa JP. Dissecting DNA hypermethylation in cancer. *FEBS Lett.* 2011 Jul 7 [cited 2021 Nov 28];585(13):2078-86. doi: 10.1016/j.febslet.2010.12.001. Epub 2010 Dec 10. PMID: 21146531; PMCID: PMC3378045.
16. 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 [cited 2021 Nov 28];19(3):670. doi: 10.3390/ijms19030670. PMID: 29495520; PMCID: PMC5877531.
17. Hema KN, Smitha T, Sheethal HS, Mirnalini SA. Epigenetics in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2017 May-Aug [cited 2021 Nov 28];21(2):252-259. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_150_17. PMID: 28932035; PMCID: PMC5596676.

18. Ramos-Lopez O, Milagro FI, Rieu-Boj JI, Martinez JA. Epigenetic signatures underlying inflammation: an interplay of nutrition, physical activity, metabolic diseases, and environmental factors for personalized nutrition. *Inflamm Res.* 2021 Jan [cited 2021 Nov 28];70(1):29-49. doi: 10.1007/s00011-020-01425-y. Epub 2020 Nov 24. PMID: 33231704; PMCID: PMC7684853.
19. Smith JA, Zhao W, Wang X, Ratliff SM, Mukherjee B, Kardia SLR, Liu Y, Roux AVD, Needham BL. Neighborhood characteristics influence DNA methylation of genes involved in stress response and inflammation: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Epigenetics.* 2017 Aug;12(8) [cited 2021 Nov 28]:662-673. doi: 10.1080/15592294.2017.1341026. Epub 2017 Jul 5. PMID: 28678593; PMCID: PMC5687339.
20. Reamon-Buettner SM, Mutschler V, Borlak J. The next innovation cycle in toxicogenomics: environmental epigenetics. *Mutat Res.* 2008 Jul-Aug [cited 2021 Nov 28];659(1-2):158-65. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.01.003. Epub 2008 Jan 19. PMID: 18342568.
21. Tiffon C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 1 [cited 2021 Nov 28];19(11):3425. doi: 10.3390/ijms19113425. PMID: 30388784; PMCID: PMC6275017.
22. Gao X, Zhang Y, Breitling LP, Brenner H. Relationship of tobacco smoking and smoking-related DNA methylation with epigenetic age acceleration. *Oncotarget.* 2016 Jul 26 [cited 2021 Nov 28];7(30):46878-46889. doi: 10.18632/oncotarget.9795. PMID: 27276709; PMCID: PMC5216910.
23. Chen Z, Wen W, Cai Q, Long J, Wang Y, Lin W, Shu XO, Zheng W, Guo X. From tobacco smoking to cancer mutational signature: a mediation analysis strategy to explore the role of epigenetic changes. *BMC Cancer.* 2020 Sep 14 [cited 2021 Nov 28];20(1):880. doi: 10.1186/s12885-020-07368-1. PMID: 32928150; PMCID: PMC7488848.
24. Ambatipudi S, Cuenin C, Hernandez-Vargas H, Ghantous A, Le Calvez-Kelm F, Kaaks R, Barrdahl M, Boeing H, Aleksandrova K, Trichopoulou A, Lagiou P, Naska A, Palli D, Krogh V, Polidoro S, Tumino R, Panico S, Bueno-de-Mesquita B, Peeters PH, Quirós JR, Navarro C, Ardanaz E, Dorronsoro M, Key T, Vineis P, Murphy N, Riboli E, Romieu I, Herceg Z. Tobacco smoking-associated genome-wide DNA methylation changes in the EPIC study. *Epigenomics.* 2016 May [cited 2021 Nov 28];8(5):599-618. doi: 10.2217/epi-2016-0001. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26864933.
25. Lin WJ, Jiang RS, Wu SH, Chen FJ, Liu SA. Smoking, alcohol, and betel quid and oral cancer: a prospective cohort study. *J Oncol.* 2011 [cited 2021 Nov 28];2011:525976.

doi: 10.1155/2011/525976. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21547265; PMCID: PMC3087410.

26. Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, Baurecht H, Kleinschmidt A, Gieger C, Weidinger S, Lattka E, Adamski J, Peters A, Strauch K, Waldenberger M, Illig T. Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One*. 2013 May 17 [cited 2021 Nov 28];8(5):e63812. doi: 10.1371/journal.pone.0063812. PMID: 23691101; PMCID: PMC3656907.
27. Radhakrishnan R, Kabekkodu S, Satyamoorthy K. DNA hypermethylation as an epigenetic mark for oral cancer diagnosis. *J Oral Pathol Med*. 2011 Oct [cited 2021 Nov 28];40(9):665-76. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01055.x. Epub 2011 Jun 8. PMID: 21649736.
28. Bramer WM, Giustini D, Kramer BM, Anderson P. The comparative recall of Google Scholar versus PubMed in identical searches for biomedical systematic reviews: a review of searches used in systematic reviews. *Syst Rev*. 2013 Dec 23 [cited 2021 Nov 28];2:115. doi: 10.1186/2046-4053-2-115. PMID: 24360284; PMCID: PMC3882110.
29. Ward LS. Molecular basis for the diagnosis and therapy of the thyroid cancer. *Rev Bras Clin Terap*. 2000 [cited 2021 Nov 28];26:103–7.
30. Giuffrida D, Ferraù F, Bordonaro R, Mattina M, Priolo D, Aiello RA, Cordio S, Motta S, Failla G. Il carcinoma midollare della tiroide: diagnosi e terapia [Medullary carcinoma of the thyroid: diagnosis and therapy]. *Clin Ter*. 2000 Jan-Feb [cited 2021 Nov 28];151(1):29-35. Italian. PMID: 10822879.
31. Pharoah PD, Caldas C. Molecular genetics and the assessment of human cancers. *Expert Rev Mol Med*. 1999 Mar 11 [cited 2021 Nov 28];1999:1-19. doi: 10.1017/S1462399499000526. PMID: 14585124.
32. Plass C, Soloway PD. DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur J Hum Genet*. 2002 Jan;10(1) [cited 2021 Nov 28]:6-16. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200768. PMID: 11896451.
33. Nowell PC, Jensen J, Gardner F. Two complex translocations in chronic granulocytic leukemia involving chromosomes 22, 9, and a third chromosome. *Humangenetik*. 1975 Oct 20 [cited 2021 Nov 28];30(1):13-21. doi: 10.1007/BF00273627. PMID: 1058830.
34. Schofield PN, Joyce JA, Lam WK, Grandjean V, Ferguson-Smith A, Reik W, Maher ER. Genomic imprinting and cancer; new paradigms in the genetics of neoplasia. *Toxicol Lett*. 2001 Mar 31 [cited 2021 Nov 28];120(1-3):151-60. doi: 10.1016/s0378-4274(01)00294-6. PMID: 11323172.

35. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1 [cited 2021 Nov 28];90(23):10914-21. doi: 10.1073/pnas.90.23.10914. PMID: 7902574; PMCID: PMC47892.
36. Foy JP, Pickering CR, Papadimitrakopoulou VA, Jelinek J, Lin SH, William WN Jr, Frederick MJ, Wang J, Lang W, Feng L, Zhang L, Kim ES, Fan YH, Hong WK, El-Naggar AK, Lee JJ, Myers JN, Issa JP, Lippman SM, Mao L, Saintigny P. New DNA methylation markers and global DNA hypomethylation are associated with oral cancer development. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015 Nov [cited 2021 Nov 28];8(11):1027-35. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0179. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26342026; PMCID: PMC4777304.
37. Pattani KM, Zhang Z, Demokan S, Glazer C, Loyo M, Goodman S, Sidransky D, Bermudez F, Jean-Charles G, McCaffrey T, Padhya T, Phelan J, Spivakovskiy S, Bowne HY, Goldberg JD, Rolnitzky L, Robbins M, Kerr AR, Sirois D, Califano JA. Endothelin receptor type B gene promoter hypermethylation in salivary rinses is independently associated with risk of oral cavity cancer and premalignancy. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010 Sep [cited 2021 Nov 28];3(9):1093-103. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0115. Epub 2010 Aug 26. PMID: 20798208; PMCID: PMC2945229.
38. Towle R, Truong D, Hogg K, Robinson WP, Poh CF, Garnis C. Global analysis of DNA methylation changes during progression of oral cancer. *Oral Oncol*. 2013 Nov [cited 2021 Nov 28];49(11):1033-42. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.08.005. Epub 2013 Sep 13. PMID: 24035722.
39. Sushma PS, Jamil K, Kumar PU, Satyanarayana U, Ramakrishna M, Triveni B. PTEN and p16 genes as epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on south Indian population. *Tumour Biol*. 2016 Jun [cited 2021 Nov 28];37(6):7625-32. doi: 10.1007/s13277-015-4648-8. Epub 2015 Dec 19. PMID: 26687648.
40. Ribeiro IP, Caramelo F, Marques F, Domingues A, Mesquita M, Barroso L, Prazeres H, Julião MJ, Baptista IP, Ferreira A, Melo JB, Carreira IM. WT1, MSH6, GATA5 and PAX5 as epigenetic oral squamous cell carcinoma biomarkers - a short report. *Cell Oncol (Dordr)*. 2016 Dec [cited 2021 Nov 28];39(6):573-582. doi: 10.1007/s13402-016-0293-5. Epub 2016 Aug 4. PMID: 27491556.
41. Singh A, Srivastava N, Yadav A, Ateeq B. Targeting AGTR1/NF-κB/CXCR4 axis by miR-155 attenuates oncogenesis in glioblastoma. *Neoplasia*. 2020 Oct [cited 2021 Nov 28];22(10):497-510. doi: 10.1016/j.neo.2020.08.002. Epub 2020 Sep 5. PMID: 32896760; PMCID: PMC7481885.
42. Zhang Z, Zhu R, Sun W, Wang J, Liu J. Analysis of Methylation-driven Genes in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma for Predicting Prognosis. *J Cancer*. 2021 Sep 9 [cited

2021 Nov 28];12(21):6507-6518. doi: 10.7150/jca.53208. PMID: 34659542; PMCID: PMC8489123.

43. Asangani IA, Harms PW, Dodson L, Pandhi M, Kunju LP, Maher CA, Fullen DR, Johnson TM, Giordano TJ, Palanisamy N, Chinnaiyan AM. Genetic and epigenetic loss of microRNA-31 leads to feed-forward expression of EZH2 in melanoma. *Oncotarget*. 2012 Sep [cited 2021 Nov 28];3(9):1011-25. doi: 10.18632/oncotarget.622. PMID: 22948084; PMCID: PMC3663613.
44. Jin T, Hao J, Fan D. Nicotine induces aberrant hypermethylation of tumor suppressor genes in pancreatic epithelial ductal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 May 23 [cited 2021 Nov 28];499(4):934-940. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.022. Epub 2018 Apr 11. PMID: 29626481.
45. Hsu LS, Lee HC, Chau GY, Yin PH, Chi CW, Lui WY. Aberrant methylation of EDNRB and p16 genes in hepatocellular carcinoma (HCC) in Taiwan. *Oncol Rep*. 2006 Feb [cited 2021 Nov 28];15(2):507-11. doi: 10.3892/or.15.2.507 PMID: 16391877.
46. Kaur J, Demokan S, Tripathi SC, Macha MA, Begum S, Califano JA, Ralhan R. Promoter hypermethylation in Indian primary oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2010 Nov 15 [cited 2021 Nov 28];127(10):2367-73. doi: 10.1002/ijc.25377. PMID: 20473870; PMCID: PMC2946507.
47. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res*. 2001 Mar 10 [cited 2021 Nov 28];264(1):29-41. doi: 10.1006/excr.2000.5130. PMID: 11237521.
48. Ohtsubo K, Watanabe H, Yamaguchi Y, Hu YX, Motoo Y, Okai T, Sawabu N. Abnormalities of tumor suppressor gene p16 in pancreatic carcinoma: immunohistochemical and genetic findings compared with clinicopathological parameters. *J Gastroenterol*. 2003 [cited 2021 Nov 28];38(7):663-71. doi: 10.1007/s00535-003-1119-6. PMID: 12898359.
49. Dadone B, Ambrosetti D, Carpentier X, Duranton-Tanneur V, Burel-Vandenbos F, Amiel J, Pedeutour F. A renal metanephric adenoma showing both a 2p16e24 deletion and BRAF V600E mutation: a synergistic role for a tumor suppressor gene on chromosome 2p and BRAF activation? *Cancer Genet*. 2013 Sep-Oct [cited 2021 Nov 28];206(9-10):347-52. doi: 10.1016/j.cancergen.2013.09.002. PMID: 24432405.
50. Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat*. 1997 [cited 2021 Nov 28];9(3):209-25. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:3<209:AID-HUMU2>3.0.CO;2-2. PMID: 9090524.
51. Fung SYH, Chan KCA, Wong EWY, Ng CWK, Cho R, Yeung ZWC, Lam JWK, Chan JYK. Droplet digital PCR of tumor suppressor gene methylation in serial oral rinses of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2021 Jun [cited 2021 Nov 28];43(6):1443-51. doi: 10.1002/hn.34003. PMID: 33833110.

- 2021 Nov 28];43(6):1812-1822. doi: 10.1002/hed.26647. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33594807; PMCID: PMC8248028.
52. Cordero JB, Macagno JP, Stefanatos RK, Strathdee KE, Cagan RL, Vidal M. Oncogenic Ras diverts a host TNF tumor suppressor activity into tumor promoter. *Dev Cell*. 2010 Jun 15 [cited 2021 Nov 28];18(6):999-1011. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.014. PMID: 20627081; PMCID: PMC3175220.
53. SAINTIGNY, Pierre et al. New DNA methylation markers associated with oral cancer (OC) development (dvlpt). 2012 [cited 2021 Nov 28]. doi: 10.1200/jco.2012.30.15_suppl.5524.
54. Furlan C, Polesel J, Barzan L, Franchin G, Sulfaro S, Romeo S, Colizzi F, Rizzo A, Baggio V, Giacomarra V, Dei Tos AP, Boscolo-Rizzo P, Vaccher E, Dolcetti R, Sigalotti L, Fratta E. Prognostic significance of LINE-1 hypomethylation in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Epigenetics*. 2017 May 30 [cited 2021 Nov 28];9:58. doi: 10.1186/s13148-017-0357-z. PMID: 28572862; PMCID: PMC5450111.
55. Reygold M, Chan TA. DNA methylation. In: Gelmann EP, editor. *Molecular oncology: causes of cancer and targets for treatment*. Cambridge: Cambridge University Press; 2018 [cited 2021 Nov 28]. Doi: 10.1017/CBO9781139046947.006.
56. Misawa K, Yamada S, Mima M, Nakagawa T, Kurokawa T, Imai A, Mochizuki D, Shinmura D, Yamada T, Kita J, Ishikawa R, Yamaguchi Y, Misawa Y, Kanazawa T, Kawasaki H, Mineta H. Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation has novel prognostic value and potential utility in liquid biopsy for oral cavity cancer. *Biomark Res*. 2020 Oct 23 [cited 2021 Nov 28];8:53. doi: 10.1186/s40364-020-00235-y. PMID: 33110605; PMCID: PMC7585304.
57. Caliri AW, Caceres A, Tommasi S, Besaratinia A. Hypomethylation of LINE-1 repeat elements and global loss of DNA hydroxymethylation in vapers and smokers. *Epigenetics*. 2020 Aug [cited 2021 Nov 28];15(8):816-829. doi: 10.1080/15592294.2020.1724401. Epub 2020 Feb 5. PMID: 31996072; PMCID: PMC7518689.
58. Andreotti G, Karami S, Pfeiffer RM, Hurwitz L, Liao LM, Weinstein SJ, Albanes D, Virtamo J, Silverman DT, Rothman N, Moore LE. LINE1 methylation levels associated with increased bladder cancer risk in pre-diagnostic blood DNA among US (PLCO) and European (ATBC) cohort study participants. *Epigenetics*. 2014 Mar [cited 2021 Nov 28];9(3):404-15. doi: 10.4161/epi.27386. Epub 2013 Dec 6. PMID: 24316677; PMCID: PMC4053459.
59. Zhang Y, Yang R, Burwinkel B, Breitling LP, Holleczek B, Schöttker B, Brenner H. F2RL3 methylation in blood DNA is a strong predictor of mortality. *Int J Epidemiol*.

- 2014 Aug [cited 2021 Nov 28];43(4):1215-25. doi: 10.1093/ije/dyu006. Epub 2014 Feb 7. PMID: 24510982; PMCID: PMC4258765.
60. Prak ET, Kazazian HH Jr. Mobile elements and the human genome. *Nat Rev Genet*. 2000 Nov [cited 2021 Nov 28];1(2):134-44. doi: 10.1038/35038572. Erratum in: *Nat Rev Genet* 2001 Jan;2(1):78. PMID: 11253653.
61. Piskareva O, Lackington W, Lemass D, Hendrick C, Doolan P, Barron N. The human L1 element: a potential biomarker in cancer prognosis, current status and future directions. *Curr Mol Med*. 2011 Jun [cited 2021 Nov 28];11(4):286-303. doi: 10.2174/156652411795677954. PMID: 21506922.
62. Lisanti S, Omar WA, Tomaszewski B, De Prins S, Jacobs G, Koppen G, Mathers JC, Langie SA. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS One*. 2013 Nov 18 [cited 2021 Nov 28];8(11):e79044. doi: 10.1371/journal.pone.0079044. PMID: 24260150; PMCID: PMC3832524.
63. Yang AS, Estécio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res*. 2004 Feb 18 [cited 2021 Nov 28];32(3):e38. doi: 10.1093/nar/gnh032. PMID: 14973332; PMCID: PMC373427.
64. Arayataweegool A, Srisuttee R, Mahattanasakul P, Tangjaturonsasme N, Kerekhanjanarong V, Kitkumthorn N, Mutirangura A. Head and neck squamous cell carcinoma drives long interspersed element-1 hypomethylation in the peripheral blood mononuclear cells. *Oral Dis*. 2019 Jan [cited 2021 Nov 28];25(1):64-72. doi: 10.1111/odi.12944. Epub 2018 Aug 20. PMID: 30047194.
65. Kitkumthorn N, Keelawat S, Rattanatanyong P, Mutirangura A. LINE-1 and Alu methylation patterns in lymph node metastases of head and neck cancers. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012 [cited 2021 Nov 28];13(9):4469-75. doi: 10.7314/apjcp.2012.13.9.4469. PMID: 23167363.
66. Subbalekha K, Pimkhaokham A, Pavasant P, Chindavijak S, Phokaew C, Shuangshoti S, Matangkasombut O, Mutirangura A. Detection of LINE-1s hypomethylation in oral rinses of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol*. 2009 Feb [cited 2021 Nov 28];45(2):184-91. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.002. Epub 2008 Aug 19. PMID: 18715815.
67. de Freitas Cordeiro-Silva M, Oliveira ZF, de Podestá JR, Gouvea SA, Von Zeidler SV, Louro ID. Methylation analysis of cancer-related genes in non-neoplastic cells from patients with oral squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2011 Nov [cited 2021 Nov 28];38(8):5435-41. doi: 10.1007/s11033-011-0698-1. Epub 2011 Mar 5. PMID: 21380558.

68. Viet CT, Ye Y, Dang D, Lam DK, Achdjian S, Zhang J, Schmidt BL. Re-expression of the methylated EDNRB gene in oral squamous cell carcinoma attenuates cancer-induced pain. *Pain*. 2011 Oct [cited 2021 Nov 28];152(10):2323-2332. doi: 10.1016/j.pain.2011.06.025. Epub 2011 Jul 22. PMID: 21782343; PMCID: PMC3375027.
69. Morandi L, Gissi D, Tarsitano A, Asioli S, Gabusi A, Marchetti C, Montebugnoli L, Foschini MP. CpG location and methylation level are crucial factors for the early detection of oral squamous cell carcinoma in brushing samples using bisulfite sequencing of a 13-gene panel. *Clin Epigenetics*. 2017 Aug 15 [cited 2021 Nov 28];9:85. doi: 10.1186/s13148-017-0386-7. PMID: 28814981; PMCID: PMC5558660.
70. Barault L, Amatu A, Siravegna G, Ponzetti A, Moran S, Cassingena A, Mussolin B, Falcomatà C, Binder AM, Cristiano C, Oddo D, Guarnera S, Cancelliere C, Bustreo S, Bencardino K, Maden S, Vanzati A, Zavattari P, Matullo G, Truini M, Grady WM, Racca P, Michels KB, Siena S, Esteller M, Bardelli A, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F. Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer. *Gut*. 2018 Nov [cited 2021 Nov 28];67(11):1995-2005. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313372. Epub 2017 Oct 5. PMID: 28982739; PMCID: PMC5897187.
71. Li PP, Wang X. Role of signaling pathways and miRNAs in chronic lymphocytic leukemia. *Chin Med J (Engl)*. 2013 Nov [cited 2021 Nov 28];126(21):4175-82. doi: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20130414. PMID: 24229693.
72. Zhang C, Zhao H, Li J, Liu H, Wang F, Wei Y, Su J, Zhang D, Liu T, Zhang Y. The identification of specific methylation patterns across different cancers. *PLoS One*. 2015 Mar 16 [cited 2021 Nov 28];10(3):e0120361. doi: 10.1371/journal.pone.0120361. PMID: 25774687; PMCID: PMC4361543.
73. Thu YM, Richmond A. NF-κB inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010 Aug [cited 2021 Nov 28];21(4):213-26. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.06.002. Epub 2010 Aug 3. PMID: 20685151; PMCID: PMC2939163.
74. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF-κB, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*. 2014 Sep [cited 2021 Nov 28];2(9):823-30. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0112. PMID: 25187272; PMCID: PMC4155602.
75. Taniguchi K, Karin M. NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol*. 2018 May [cited 2021 Nov 28];18(5):309-324. doi: 10.1038/nri.2017.142. Epub 2018 Jan 22. PMID: 29379212.

76. Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res.* 2010 Jan [cited 2021 Nov 28];20(1):24-33. doi: 10.1038/cr.2009.137. Epub 2009 Dec 8. PMID: 19997086; PMCID: PMC3052775.
77. Van Waes C. Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 15 [cited 2021 Nov 28];13(4):1076-82. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2221. PMID: 17317814.
78. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* 2009 Apr [cited 2021 Nov 28];21(4):317-37. doi: 10.1093/intimm/dxp017. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19246554; PMCID: PMC2721684.
79. Tato CM, Hunter CA. Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. *Infect Immun.* 2002 Jul [cited 2021 Nov 28];70(7):3311-7. doi: 10.1128/IAI.70.7.3311-3317.2002. PMID: 12065467; PMCID: PMC128040.
80. Malaponte G, Signorelli SS, Bevelacqua V, Polesel J, Taborelli M, Guarneri C, Fenga C, Umezawa K, Libra M. Increased Levels of NF-kB-Dependent Markers in Cancer-Associated Deep Venous Thrombosis. *PLoS One.* 2015 Jul 20 [cited 2021 Nov 28];10(7):e0132496. doi: 10.1371/journal.pone.0132496. PMID: 26192925; PMCID: PMC4507873.
81. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24 [cited 2021 Nov 28];454(7203):436-44. doi: 10.1038/nature07205. PMID: 18650914.
82. Aggarwal BB, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Aug [cited 2021 Nov 28];9(4):351-69. doi: 10.1016/j.coph.2009.06.020. Epub 2009 Aug 6. PMID: 19665429; PMCID: PMC2730981.
83. Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, Watabe T, Miyazono K. TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *J Biochem.* 2012 Feb [cited 2021 Nov 28];151(2):205-16. doi: 10.1093/jb/mvr136. Epub 2011 Dec 7. PMID: 22161143.
84. Chen CC, Yang SY, Liu CJ, Lin CL, Liaw YF, Lin SM, Lee SD, Chen PJ, Chen CJ, Yu MW. Association of cytokine and DNA repair gene polymorphisms with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Int J Epidemiol.* 2005 Dec [cited 2021 Nov 28];34(6):1310-8. doi: 10.1093/ije/dyi191. Epub 2005 Sep 19. PMID: 16172101.
85. Wheelhouse NM, Chan YS, Gillies SE, Caldwell H, Ross JA, Harrison DJ, Prost S. TNF-alpha induced DNA damage in primary murine hepatocytes. *Int J Mol Med.* 2003

- Dec [cited 2021 Nov 28];12(6):889-94. <https://doi.org/10.3892/ijmm.12.6.889> PMID: 14612962.
86. Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC. Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res.* 2002 [cited 2021 Nov 28];137:37-47. doi: 10.1016/s0079-6123(02)37006-7. PMID: 12440358.
87. Kurasawa Y, Shiiba M, Nakamura M, Fushimi K, Ishigami T, Bukawa H, Yokoe H, Uzawa K, Tanzawa H. PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2008 Jun [cited 2021 Nov 28];19(6):1429-34. doi: 10.3892/or.19.6.1429 PMID: 18497947.
88. von Zeidler SV, Miracca EC, Nagai MA, Birman EG. Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. *Int J Mol Med.* 2004 Nov [cited 2021 Nov 28];14(5):807-11. doi: 10.3892/ijmm.14.5.807. PMID: 15492849..
89. Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, Brown JS, Vaughan ED, Lowe D, Field JK, Risk JM. Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *Br J Cancer.* 2006 Feb 27 [cited 2021 Nov 28];94(4):561-8. doi: 10.1038/sj.bjc.6602972. PMID: 16449996; PMCID: PMC2361183.
90. BYRD, David R. et al. AJCC cancer staging manual. New York: Springer, 2010 [cited 2021 Nov 28].
91. Allen PJ, Kuk D, Castillo CF, Basturk O, Wolfgang CL, Cameron JL, Lillemoe KD, Ferrone CR, Morales-Oyarvide V, He J, Weiss MJ, Hruban RH, Gönen M, Klimstra DS, Mino-Kenudson M. Multi-institutional Validation Study of the American Joint Commission on Cancer (8th Edition) Changes for T and N Staging in Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *Ann Surg.* 2017 Jan [cited 2021 Nov 28];265(1):185-191. doi: 10.1097/SLA.0000000000001763. PMID: 27163957; PMCID: PMC5611666.
92. Khongsti S, Lamare FA, Shunyu NB, Ghosh S, Maitra A, Ghosh S. Whole genome DNA methylation profiling of oral cancer in ethnic population of Meghalaya, North East India reveals novel genes. *Genomics.* 2018 Mar [cited 2021 Nov 28];110(2):112-123. doi: 10.1016/j.ygeno.2017.09.002. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28890207.
93. Oji Y, Inohara H, Nakazawa M, Nakano Y, Akahani S, Nakatsuka S, Koga S, Ikeba A, Abeno S, Honjo Y, Yamamoto Y, Iwai S, Yoshida K, Oka Y, Ogawa H, Yoshida J, Aozasa K, Kubo T, Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2003 Jun [cited 2021 Nov 28];94(6):523-9. doi: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01477.x. PMID: 12824878.
94. Li X, Ottosson S, Wang S, Jernberg E, Boldrup L, Gu X, Nylander K, Li A. Wilms' tumor gene 1 regulates p63 and promotes cell proliferation in squamous cell carcinoma

- of the head and neck. *BMC Cancer*. 2015 May 1 [cited 2021 Nov 28];15:342. doi: 10.1186/s12885-015-1356-0. PMID: 25929687; PMCID: PMC4421988.
95. Norhany S, Kouzu Y, Uzawa K, Hayama M, Higo M, Koike H, Kasamatu A, Tanzawa H. Overexpression of PAX5 in oral carcinogenesis. *Oncol Rep*. 2006 Nov [cited 2021 Nov 28];16(5):1003-8. doi: 10.3892/or.16.5.1003 PMID: 17016584.
96. Ribeiro IP, Caramelo F, Esteves L, Oliveira C, Marques F, Barroso L, Melo JB, Carreira IM. Genomic and epigenetic signatures associated with survival rate in oral squamous cell carcinoma patients. *J Cancer*. 2018 Apr 27 [cited 2021 Nov 28];9(11):1885-1895. doi: 10.7150/jca.23239. PMID: 29896272; PMCID: PMC5995936.
97. Buttin BM, Powell MA, Mutch DG, Babb SA, Huettner PC, Edmonston TB, Herzog TJ, Rader JS, Gibb RK, Whelan AJ, Goodfellow PJ. Penetrance and expressivity of MSH6 germline mutations in seven kindreds not ascertained by family history. *Am J Hum Genet*. 2004 Jun [cited 2021 Nov 28];74(6):1262-9. doi: 10.1086/421332. Epub 2004 Apr 19. PMID: 15098177; PMCID: PMC1182090.