



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

EALBER CARVALHO MACEDO LUNA

**ESTUDO DA VIA PI3K/AKT/PTEN NO CÂNCER:
REVISÃO SISTEMÁTICA COM METANÁLISE DA METILAÇÃO DE PTEN EM
CARCINOMAS E ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PTEN, PI3K, S6K1 E
GSK-3 β EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS**

FORTALEZA
2019

EALBER CARVALHO MACEDO LUNA

**ESTUDO DA VIA PI3K/AKT/PTEN NO CÂNCER:
REVISÃO SISTEMÁTICA COM METANÁLISE DA METILAÇÃO DE PTEN EM
CARCINOMAS E ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PTEN, PI3K, S6K1 E
GSK-3 β EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora Prof^a. Dr^a Karuza Maria Alves Pereira.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L983e Luna, Ealber.
ESTUDO DA VIA PI3K/AKT/PTEN NO CÂNCER: REVISÃO SISTEMÁTICA COM METANÁLISE DA METILAÇÃO DE PTEN EM CARCINOMAS E ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PTEN, PI3K, S6K1 E GSK-3β EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS / Ealber Luna. – 2019.
95 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profª. Dra. Karuza Maria Alves Pereira.
1. Carcinoma de Células Escamosas; Imunoistoquímica; PTEN; Fosfatidilinositol 3-Quinase, S6K1, GSK-3β. I. Título.

CDD 617.6

EALBER CARVALHO MACEDO LUNA

**ESTUDO DA VIA PI3K/AKT/PTEN NO CÂNCER:
REVISÃO SISTEMÁTICA COM METANÁLISE DA METILAÇÃO DE PTEN EM
CARCINOMAS E ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PTEN, PI3K, S6K1 E
GSK-3 β EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Karuza Maria Alves Pereira (Orientadora)

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva (UFC)

Prof. Dr. Fábio Wildson Gurgel Costa (UFC)

Prof^a. Dr^a. Malena Regina de Freitas e Silva (UNICHRISTUS)

Prof^a. Dr^a. Roberta Barroso Cavalcante (UNIFOR)

Não deixe que as pessoas te façam desistir daquilo que você mais quer na vida. acredite, lute, conquiste. E acima de tudo, seja feliz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Criador de tudo, que sempre guiou minha vida e me deu forças para seguir firme nessa jornada tão árdua.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para a minha formação como ser humano de bem e sempre me apoiaram em todas as minhas decisões. A vocês, eu devo tudo o que sou hoje. Obrigado pelo carinho, dedicação e amor. Serei eternamente grato.

A minha noiva Camila, que sempre esteve presente na minha vida nos momentos de alegria e tristeza. Obrigado por ser minha cúmplice nessa selva de pedra que é a vida. Você fez, faz e sempre fará parte da minha história. Te amo.

A minha avó, que sempre foi um exemplo e me ensinou a ser uma pessoa de boa índole e do bem. Onde a senhora estiver, sei que está me abençoando e torcendo pelo meu sucesso.

A minha orientadora, Prof^ª. Karuza, por tudo que fez por mim nesses 10 anos de vida acadêmica. Obrigado por confiar e acreditar em mim quando nem mesmo eu acreditava; por me incentivar e apoiar tanto nos momentos bons quanto nos ruins. Agradeço imensamente a troca de valores éticos, morais e científicos. Sem dúvida alguma, um exemplo a ser seguido. Tenho a senhora não só como uma orientadora, mas como uma amiga. Gratidão eterna!

Aos professores do Laboratório de Patologia Bucal da UFC, Ana Paula, Mário e Fabrício, pelo prazer da convivência diária e pelos ensinamentos transmitidos. Me sinto honrado pela participação de vocês na minha formação.

Ao Professor Fábio Wildson, exemplo de profissional e ser humano a ser seguido. Agradeço os ensinamentos e a amizade. Obrigado por estar sempre disposto a ajudar e contribuir para o meu crescimento.

Ao Professor Alexandre Nogueira, obrigado pelos conselhos, trabalhos e ensinamentos transmitidos. Um grande mestre e amigo.

Às minhas amigas da pós-graduação Sthefane, Thâmara e Thaís. Sem a ajuda de vocês nada disso seria possível. Obrigado pelo carinho, amizade e conselhos ao longo dessa jornada. Vocês são pessoas iluminadas e especiais.

Ao meu amigo Paulinho, pela valorosa ajuda nos dados estatísticos do trabalho. Você, além de um excelente profissional, é um grande amigo e incentivador.

À Thinali, pela parceria e ajuda com as amostras da nossa pesquisa

Ao técnico de patologia e amigo Alceu, obrigado pela amizade e disponibilidade nesses anos de trabalhos científicos.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial, Filipe e Khalil, que compartilharam comigo momentos únicos.

Aos meus familiares, agradeço pelo carinho, ajuda e amizade. Vocês foram extremamente importantes para que eu conseguisse chegar até aqui. Amo todos vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Laboratório de Patologia Bucal e Clínica de Estomatologia, onde realizei minhas atividades acadêmicas, fiz grandes amizades e cresci bastante como pessoa e profissional.

À FUNCAP, pela concessão da bolsa, pelo apoio financeiro e por acreditar na nossa pesquisa.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) representa mais de 90% das malignidades da cavidade oral, sendo o câncer mais comum nessa localização no Brasil. Estudos na área concentram-se em investigar as bases moleculares do desenvolvimento e progressão tumoral. Entretanto, pesquisas recentes investigam alterações epigenéticas como mudanças críticas na carcinogênese e, dentre essas modificações, inclui-se a metilação do DNA. O gene *PTEN* é um gene supressor tumoral que participa da via PI3K/AKT/PTEN, uma das vias desreguladas e mais estudadas recentemente na carcinogênese. Dessa forma, a presente tese é constituída por dois capítulos, que têm como objetivos, respectivamente: 1) realizar uma revisão sistemática e metanálise da metilação do gene *PTEN* em carcinomas; 2) analisar a imunexpressão de PTEN, PI3K, S6K1 e GSK-3 β em amostras de (CCEO). No capítulo 1, realizou-se uma revisão sistemática com metanálise registrada na base de dados PROSPERO. As estratégias de busca foram realizadas em sete bases de dados, incluindo a literatura cinzenta. Foram incluídos 38 estudos para a revisão sistemática e 12 para a metanálise. O principal desfecho avaliado foi a relação entre o perfil de metilação de *PTEN* em carcinomas humanos, sugerindo que essa alteração epigenética possa estar associada ao processo de tumorigênese. No capítulo 2, foi analisada a expressão imunohistoquímica de PTEN, PI3K, S6K1 e GSK-3 β em amostras de carcinomas de células escamosas orais. Foram selecionados 76 casos de CCEO do Instituto do Câncer do Ceará (ICC). Foi realizada técnica de TMA (*Tissue microarray*) analisando os casos de CCEO, área perilesional e linfonodo. Os espécimes foram submetidos à técnica imunohistoquímica da Estreptavidina-biotina-peroxidase utilizando os anticorpos da marca Abcam PTEN (1:400), GSK-3 β (1:100), S6K1 (1:200) e PI3K (1:400). As células imunopositivas para esses marcadores foram contadas, bem como avaliadas a localização e a intensidade da marcação, sendo expressas as médias \pm EPM das contagens das células e dos histoscores calculados, os quais foram analisados pelo teste qui-quadrado de Pearson. Os dados categóricos foram expressos em frequência absoluta e comparados pelo teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson, adotando o nível de significância de $p < 0,05$. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a marcação de PTEN no citoplasma ($p < 0,001$), de PI3K ($p < 0,001$) e de GSK-3 β ($p < 0,001$) (quando comparadas amostras de tumor, perilesão e metástase linfonodal). Com relação à marcação do PTEN no núcleo ($p = 0,351$) e de S6K1 ($p = 0,999$), não foram observadas diferenças estatísticas. Sugere-se que as expressões dessas proteínas possam estar envolvidas no processo de carcinogênese oral.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas; Imunoistoquímica; PTEN; Fosfatidilinositol 3-Quinase, S6K1, GSK-3 β .

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) represents more than 90% of oral cavity malignancies, the most common cancer being in this location in Brazil. Studies in the area focus on investigating the molecular basis of tumor development and progression. However, recent research investigates epigenetic changes as critical changes in carcinogenesis and, among these modifications, DNA methylation is included. *PTEN* gene is a tumor suppressor gene that participates in the PI3K / Akt / PTEN one of deregulated pathways studied, and more recently in carcinogenesis. Thus, this thesis consists of two sections, which aims respectively: 1) performing a systematic review and meta-analysis of the methylation of PTEN gene in carcinoma; 2) to analyze the immunoexpression of PTEN, PI3K, S6K1 and GSK-3 β in OSCC samples. Chapter 1, a systematic review was performed with a meta-analysis registered in the PROSPERO database. The search strategies were performed in seven databases, including the gray literature. 38 studies were included for systematic review and meta-analysis to 12. The primary outcome was assessed the relationship between PTEN methylation profile of human carcinomas, suggesting that epigenetic changes may be associated with tumorigenesis process. Chapter 2, the immunohistochemical expression of PTEN, PI3K, S6K1 and GSK-3 β in oral squamous cell carcinoma samples was analyzed. Were selected 76 cases of OSCC from the Cancer Institute of Ceará (ICC). A TMA (Tissue microarray) technique was performed, analyzing the cases of OSCC, perilesional area and lymph node. Specimens were subjected to the Streptavidin-biotin-peroxidase immunohistochemical technique using the antibodies of the brand Abcam PTEN (1: 400), GSK-3 β (1: 100), S6K1 (1: 200) and PI3K (1: 400). Immunopositive cells for these markers were counted, as well as the location and intensity of labeling, and the mean \pm SEM of the cell counts and calculated histoscores were expressed, which were analyzed by the Pearson chi-square test. The categorical data were expressed in absolute frequency and compared by Fisher's exact test or Pearson's chi-square, adopting the level of significance of $p < 0.05$. Statistically significant differences were observed between cytoplasmic PTEN ($p < 0.001$), PI3K ($p < 0.001$) and GSK-3 β ($p < 0.001$) cytoplasmic markers, when comparing tumor samples, perilesion and lymph node metastasis. Regarding PTEN marking in the nucleus ($p = 0.351$) and S6K1 ($p = 0.999$), no statistical differences were observed. It is suggested that the expression of these proteins may be involved in the oral carcinogenesis process.

Keywords: Squamous cell carcinoma, immunohistochemical, PTEN, Phosphatidylinositol 3-Kinase, S6K1, GSK-3 β .

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4EBP1	Do inglês <i>Eukaryotic Initiation Fator 4E Binding Protein 1</i>
AKT	Do inglês <i>Protein Kinase B</i>
CCEO	Carcinoma de células escamosas oral
EGFR	Do inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
eIF4E	Do inglês <i>Eukaryotic Initiation Fator 4E</i>
FGFR	Do inglês <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
GSK-3β	Do inglês <i>Glycogen Synthase Kinase 3 beta</i>
HPV	Human Papiloma Virus
IGF1R	Do inglês <i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i>
mTORC	Do inglês <i>Mammalian Target of Rampamycin</i>
mTORC1	Do inglês <i>mTORC complex 1</i>
mTORC2	Do inglês <i>mTORC complex 2</i>
PH	Do inglês <i>pleckstrin homology domain</i>
PI3K	Do inglês <i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PIP2	Do inglês <i>phosphatidylinositol-4,4-biphosphate</i>
PIP3	Do inglês <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>
PKB	Do inglês <i>Protein Kinase B</i>
PS6	Do inglês <i>Phosphorilated Ribosomal Protein S6</i>
PTEN	Do inglês <i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RD	Domínio Regulatório
RTKs	Do inglês Receptors Tyrosine Kinases
S6K1	Do inglês <i>Protein S6 kinase</i>
TGF-β1	Do inglês <i>Transforming growth fator</i>

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 PROPOSIÇÃO	19
3 CAPÍTULOS	20
CAPÍTULO 1 : Metilação de <i>PTEN</i> em neoplasias malignas: revisão sistemática com metanálise.....	21
CAPÍTULO 2 : Análise imunoistoquímica de PTEN, PI3K, S6K1 e GSK-3 β em carcinomas de células escamosas orais.....	42
4. CONCLUSÃO GERAL	67
5. REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	75

1 INTRODUÇÃO GERAL

CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

O câncer representa um conjunto de doenças que causam grande preocupação na população mundial devido à sua alta taxa de incidência e elevada mortalidade, sendo considerado como a segunda maior causa de morte em todo o mundo, apresentando grande relevância em pesquisas e estudos científicos sendo, por isso, alvo de estudos e investigações (SCULLY, 2005; PEREA *et al.*, 2018).

O tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço é o carcinoma de células escamosas oral (CCEO) (CHI; DAY; NEVILLE, 2015), também chamado de carcinoma epidermoide ou carcinoma espinocelular (OGBUREKE *et al.*, 2007 e WOLFF, FOLLMAN, NAST, 2012; PEREA *et al.*, 2018). Caracteriza-se por apresentar altas taxas de invasão local e metástase, possuindo, portanto, grande agressividade. O CCEO afeta preferencialmente homens acima dos 50 anos de idade (JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011), entretanto sua prevalência entre indivíduos mais jovens (com menos de 45 anos) tem aumentado (CHI; DAY; NEVILLE, 2015).

No Brasil, o tabagismo é considerado o principal fator de risco para o câncer de boca, principalmente quando associado ao etilismo (FERREIRA *et al.*, 2016; ANDRADE; SANTOS; OLIVEIRA, 2015; MAIA, 2016). Acredita-se que a carcinogênese originada pelo tabaco é dose dependente, isto é, o risco de desenvolver câncer é proporcional à quantidade de cigarros consumidos por dia, além do tempo de consumo (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; PEREA *et al.*, 2018). Os indivíduos tabagistas têm risco maior de quinze vezes de desenvolver CCEO quando comparados aos não tabagistas (PINHEIRO; CARDOSO; PRADO, 2010). Outros fatores etiológicos relacionados ao CCEOs são o HPV (Papilomavirus Humano), deficiências nutricionais, imunossupressão, exposição a riscos ocupacionais e certas condições hereditárias (VAN DER WAAL, 2013). Estes fatores são descritos na literatura como apresentando associação também com o desenvolvimento do CCEO em pacientes jovens (menos de 45 anos de idade) que não se expuseram significativamente ao tabaco e/ou álcool (LIU *et al.*, 2016).

O HPV possui uma relação bem estabelecida com os carcinomas de orofaringe, acometendo uma pequena proporção de CCEOs (WICHMANN, 2017). O HPV de subtipo 16 é responsável pela maioria dos CCEO de orofaringe HPV-positivos, havendo uma maior variabilidade de subtipos de HPV em CCEOs. (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; PEREA *et al.*,

2018). O HPV é um vírus epiteliotrópico, acometendo a pele e as mucosas, incluindo a oral, como principais sítios de infecção (LIU *et al.*, 2016).

Os principais sítios de acometimento de CCEO são a língua e o assoalho bucal (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; FRONIE *et al.*, 2013). Clinicamente, o aspecto do CCEO é variado, apresentando-se como uma lesão exofítica ou endofítica, podendo ser leucoplásica, eritroplásica ou eritroleucoplásica (CHI *et al.*, 2016). Porém, há evidências clínicas que auxiliam no diagnóstico do CCEO, tais como: lesões de início indolor, que não cicatrizam espontaneamente em 15 dias, lesões ulceradas de bordas endurecidas e evertidas e com ausência de halo eritematoso (GAETTI-JARDIM *et al.*, 2010). Histopatologicamente, o CCEO caracteriza-se por uma proliferação de células epiteliais, que expressa graus variados de similaridade com suas células de origem. As células podem exibir citoplasma bastante eosinofílico, núcleo vesicular de tamanho aumentado com hipercromatismo, pontes intercelulares proeminentes, aumento do número de figuras de mitoses típicas ou atípicas, pleomorfismo celular e nuclear e pérolas de ceratina. Essas células invadem o tecido conjuntivo de forma isolada ou em grupos, formando cordões, ninhos e lençóis. (NEVILLE *et al.*, 2016; BATISTA *et al.*, 2010).

Para a escolha do melhor tratamento dos pacientes portadores de CCEO, leva-se em consideração a natureza do carcinoma e a condição geral do paciente, que inclui idade, estado de saúde e histórico (FELLER; MELLER, 2012). De forma geral, o tratamento de escolha para a maioria dessas lesões é o cirúrgico podendo ser acompanhado de radioterapia e/ou quimioterapia. Todo tratamento proposto para o paciente se baseia no estadiamento clínico através do sistema TNM (T: tamanho do tumor, N: presença e extensão de metástase linfonodal, M: presença ou ausência de metástase a distância) (FELLER; MELLER, 2012; BRASIL, 2018).

Alguns estudos têm identificado a desregulação de várias vias de sinalização em diversos tipos de cânceres, como a via da P53 (CUEVAS GONZALES *et al.*, 2016) e a via do PI3K/AKT/PTEN (GIUDICE; SQUARIZE, 2014; JOUALI *et al.*, 2018; REN *et al.*, 2018).

VIA PI3K/AKT/PTEN

A via PI3K/AKT/PTEN representa uma via de sinalização intracelular extremamente importante no controle do ciclo celular. A proteína PI3K é um dímero que pertence à família de lipídios-quinases presentes no meio intracelular (GIUDICE; SQUARIZE, 2014; GONÇALVES; HOPKINS; CANTLEY, 2018) sendo dividida em três classes (Classe I, Classe II e Classe III) de acordo com seus achados estruturais, distribuição tecidual,

mecanismos de ativação, função e substratos lipídicos específicos *in vivo* (GIUDICE; SQUARIZE, 2014).

A classe I PI3K é categorizada em IA e IB, sendo a classe IA PI3K a mais associada ao câncer. PI3K é constituído por um domínio catalítico p110 e um domínio regulador p85. Existem três isoformas de p110, nomeadamente p110 α (codificado por PIK3CA), p110 β e p110 δ . Enquanto p110 δ é expresso quase que exclusivamente em leucócitos, p110 α e p110 β são expressos de forma ubíqua em todos os tipos de células. Nos seres humanos, a subunidade reguladora PI3K 1 (PIK3R1), PIK3R2 e PIK3R3 codificam p85 α (ou sua variante de empalme p55 α ou p50 α), p85 β , e p55 γ , respectivamente (MUKOHARA, 2015; PADDOCK; FIELD; CANTLEY, 2018).

A via PI3K/AKT/PTEN tem início quando suas classes são ativadas. A classe IA torna-se ativa quando há a ligação de um ligante a um receptor, por exemplo RTK, EGFR, FGFR ou IGF-1R, localizado na membrana plasmática da célula (PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014). Uma vez ativados e presentes na membrana plasmática, os subprodutos da classe IA de PI3K irão fosforilar primariamente PIP2 (fosfatidinositol-4,4-bifosfato), gerando o produto PIP3 (PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014; GONÇALVES; HOPKINS; CANTLEY, 2018). A via PI3K possui ainda diversas outras repercussões nas células. através da ativação de AKT, a qual regula uma série de processos envolvidos na sobrevivência da célula e na progressão do ciclo celular (FIGURA 1) (PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014; JOUALI *et al.*, 2018).

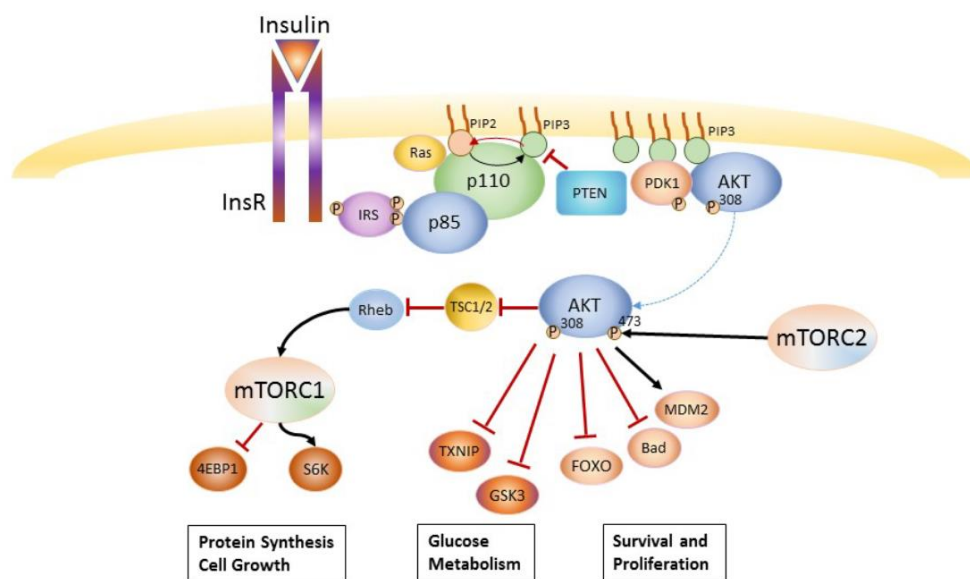


Figura 1: Via de sinalização PI3K/AKT. Fonte: (GONÇALVES; HOPKINS; CANTLEY 2018)

Vários estudos têm sido utilizados para detectar a presença dessas proteínas, seu papel na via PI3K-AKT-PTEN e estabelecer possíveis estratégias terapêuticas específicas para

o tratamento de vários tumores. A sinalização de PI3K/AKT/PTEN está relacionada a várias funções celulares, controle de síntese proteica, crescimento celular, apoptose, proliferação e angiogênese (MARTINS *et al.*, 2016; JOUALI *et al.*, 2018; GONÇALVES; HOPKINS; CANTLEY, 2018).

O AKT/PKB é uma serina/treonina quinase, pertencente à família de proteínas quinase que compartilham homologia estrutural dentro do seu domínio catalítico e possuem mecanismos semelhantes de ativação, composta de três domínios: domínio PH na região N-terminal, domínio central catalítico e domínio regulatório na região C-terminal (VADKONDA *et al.*, 2013; PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014). Os genes *AKT1*, *AKT2* e *AKT3*, conhecidos genericamente como AKT, codificam PKB (Proteína quinase B). As três isoformas de AKT, embora advindas de genes diferentes, compartilham mais de 80% de homologia em seus domínios (PH, catalítico e regulatório), havendo variações em alguns resíduos de aminoácidos e nas suas funções celulares (MADHUNAPANTULA; ROBERTSON, 2011) (Figura 2).

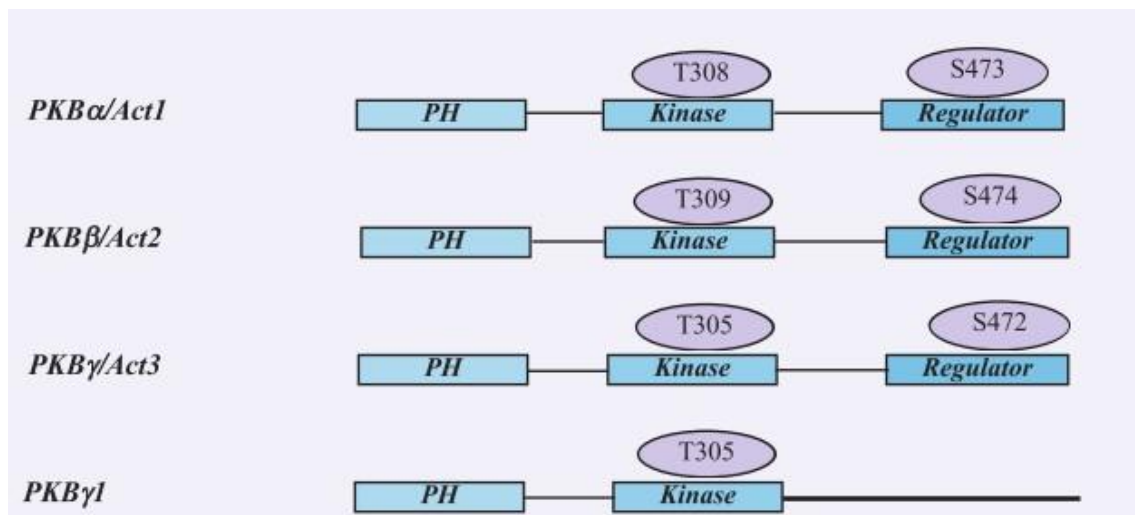


Figura 2: Representação esquemática das isoformas de AKT/PKB

Quando receptores de fatores de crescimento são estimulados, a via PI3K é ativada, levando a ativação de PIP3 na membrana plasmática, que desencadeia a translocação de AKT do citoplasma para a membrana e se liga com o domínio PH de AKT (SONG; OUYANG; BAO, 2005; JOUALI *et al.*, 2018; GONÇALVES; HOPKINS; CANTLEY, 2018). Estudos recentes mostram que PIP3 isolado não é suficiente para proporcionar ligação segura de AKT à membrana plasmática, havendo a participação de um fosfolípido membranar denominado PS (Fosfatidilserina) (HUANG *et al.*, 2011; PADDOCK; FIELD; CANTLEY, 2018). PS se liga ao domínio PH de AKT numa região diferente de ligação de PIP3 e promove uma mudança conformacional de AKT com exposição de T308 (Treonina 308) para a fosforilação por PDK1.

Simultaneamente, o domínio RD também interage com PS, o que leva a uma outra abertura conformacional de AKT com exposição de S473 (serina 473) para sua fosforilação por mTOR (mTORC1 e mTORC2) (JOUALI *et al.*, 2018).

mTORC1 fosforila as proteínas S6K1 e S6K2 e 4E - BPs, tornando-as ativas. As proteínas ribossomais S6K1 e S6K2, juntamente com 4E-BPs, são responsáveis pela tradução do mRNA e a consequente síntese proteica. Tem sido proposto que, enquanto 4E-BPs medeiam a proliferação celular, S6Ks regulam o crescimento através de um mecanismo distinto, porém complementar (DOWLING; TOPISIROVIC, 2010). Após S6K ser fosforilada, ela regula vários substratos que estão envolvidos no metabolismo do mRNA e na sua tradução (MAGNUSON; EKIM; FINGAR, 2012), como PS6 (*Phosphorilated Ribosomal Protein S6*), IF4B e o supressor tumoral PDCD4 (*Programmed Cell Death 4*). O eixo mTORC1-S6K1 controla processos celulares fundamentais como a transcrição e a tradução de proteínas, síntese de lipídios, crescimento/tamanho celular e o metabolismo da célula. A desregulação desse eixo leva ao desenvolvimento de diversas doenças (MAGNUSON; EKIM; FINGAR, 2012), dentre elas o câncer. Alguns estudos têm demonstrado que a expressão dos níveis de mTOR, eIF4E, 4EBP1, S6K1 e S6 são potenciais biomarcadores diagnóstico e prognóstico para cânceres de cabeça e pescoço (GAO *et al.*, 2012). Todo esse processo é regulado negativamente pela desfosforilação do *PTEN* (JOUALI *et al.*, 2018; GONÇALVES; HOPKINS; CANTLEY, 2018).

PTEN é um dos principais genes responsáveis pela progressão de vários tipos de cânceres, dentre eles o CCEO (SNIETURA *et al.*, 2012 ; PADDOCK; FIELD; CANTLEY, 2018) e age como antagonista do PI3K devido à desfosforilação de PIP3 a PIP2. O gene *PTEN* codifica uma proteína composta por 403 aminoácidos que contém um domínio fosfatase N-terminal, um domínio C2 e uma região caudal C-terminal que apresenta múltiplos sítios de fosforilação. O *PTEN* também contém duas sequências PEST (degradação) e um domínio PDZ (liga proteínas regulatórias e de ligação à membrana) na região caudal, e esses elementos são indispensáveis para a função de supressor tumoral. A função das sequências PEST é segmentar proteínas com meia vida intracelular curta para degradação proteica. A deleção dessas sequências no *PTEN*, no entanto, leva à diminuição da expressão da proteína, talvez pelo envelhecimento das proteínas comprometidas (SIMPSON; PARSONS, 2001; SNIETURA *et al.*, 2012; MILELLA *et al.*, 2015).

O domínio fosfatase tem características que se assemelham às fosfatases de especificidade dual, que são capazes de desfosforilar tanto os resíduos serina e treonina, quanto os de tirosina. Apesar de possuir especificidade dual, seu principal substrato *in vivo* é o PIP3, um produto direto da atividade *PI3K* (ANGADI; KRISHNAPILLAI, 2012). A ativação de *PI3K*

por sinalizações dependentes dos fatores de crescimento leva à síntese de PIP3, que é desfosforilado por *PTEN* a PIP2. A presença do *PTEN*, portanto, mantém os níveis de PIP3 baixos, enquanto sua ausência promove o aumento da concentração de PIP3 e da sinalização PI3K/AKT (GIUDICE; SQUARIZE, 2014).

O papel do *PTEN* nos CCEOs ainda não é totalmente claro e mostra muitas muitas discrepâncias. Chen *et al.* (2000) e Cohen *et al.* (2011) não demonstraram qualquer deleção homozigótica nesse gene e concluíram que as alterações no *PTEN* são raras em CCEO. No entanto, a perda da sua imunexpressão tem sido relatada (SQUARIZE, 2002; ALYASIRI *et al.*, 2012; ANGADI; KRISHNAPILLAI, 2012; WON *et al.*, 2012), o que indica que a taxa de inativação do PTEN no nível da proteína parece ser mais comum do que aquele reconhecido ao nível gênico (ALYASIRI *et al.*, 2012; ANGADI; KRISHNAPILLAI, 2012).

Estudos com linhagens celulares de CCEOs silenciadas por meio de siRNA (*small interfering RNA*) para o gene *PTEN* mostraram que este gene é importante para o controle da transição epitélio-mesênquima uma vez que foram detectadas maiores taxas de proliferação, invasividade, bem como expressão de vimentina e TGF- β 1 (*Transforming growth factor*) nas linhagens celulares silenciadas para *PTEN* quando comparado ao grupo controle e negativo para o silenciamento desse gene (LU *et al.*, 2016). Won *et al.*, (2016) detectaram que a perda de *PTEN* foi significativamente mais frequente em CCEOs do que em cânceres de orofaringe. Para Squarize *et al.* (2013), a expressão reduzida ou a inativação de *PTEN* estão envolvidos na progressão do CCEOs, sendo este gene um novo alvo molecular no tratamento de pacientes com CCEOs.

GSK-3, (*Glycogen synthase kinase 3*), é uma serina/ treonina quinase. Foi inicialmente isolada e purificada do músculo esquelético de rato como uma quinase que fosforilou e inativou glicogênio sintase (GS), a última enzima na biossíntese de glicogênio. Assim, foi identificada inicialmente por seu importante papel no metabolismo celular (McCUBREY *et al.*, 2014).

Essa proteína tem importante função reguladora em muitas doenças e distúrbios, tais como: câncer e envelhecimento (células-tronco cancerígenas, senescência celular, controle da pluripotencialidade e diferenciação de células-tronco), distúrbios imunológicos e distúrbios metabólicos (aterosclerose, diabetes e doença cardíaca), distúrbios neurológicos (Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica [ELA], transtorno bipolar, transtornos de humor, Parkinson e esquizofrenia) e outras doença (McCUBREY *et al.*, 2014; MISHARA; NAGINI; RANA, 2015). É ativada pela porção treonina do complexo AKT, tendo importante papel no processo de oncogênese, podendo atuar inibindo ou ativando todo o processo, dependendo do tipo de

célula (MISHARA; NAGINI; RANA, 2015).

METILAÇÃO

As alterações epigenéticas referem-se a modificações hereditárias que podem alterar a expressão gênica sem mudanças na sequência dos nucleotídeos, que ocorrem em elevada frequência e podem persistir por toda a vida da célula e até por várias gerações (KYRGIDIS; TZELLOS; TRIARIDIS, 2010). Essas alterações ocorrem como parte de uma maquinaria transcricional aberrante, promovendo vantagem seletiva ao tumor através do silenciamento de genes supressores tumoral ou através da disfunção de genes de reparo de DNA (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Os fenômenos epigenéticos são considerados potencialmente reversíveis por não alterarem a sequência do DNA (KHAN *et al.*, 2016) e essas características tornam as alterações epigenéticas alvos atrativos para os estudos de intervenções terapêuticas em relação ao câncer (DUCASSE; BROWN, 2006; WANG *et al.*, 2015; HEMA *et al.*, 2017). Atualmente, as principais modificações epigenéticas incluem: metilação do DNA, modificações covalentes de histonas, remodelação da cromatina e o efeito de RNAs não codificantes e proteínas polimorfonucleares na expressão gênica (HEYN; ESTELLER, 2012; ISSA *et al.*, 2017).

A metilação do DNA caracteriza-se pela adição do radical metil (CH₃) às regiões específicas do DNA contendo predominantemente nucleotídeos citosina (CpG), que estão presentes principalmente na região promotora, associada ao silenciamento dos genes (ESTELLER, 2002; SILVA; JASIULIONIS, 2014). Esse mecanismo constitui um dos principais mecanismos epigenéticos do DNA humano, sendo a primeira e mais explorada modificação da cromatina (BAYLIN; JONES, 2011; DAWSON; KOUZARIDES, 2012). Além disso, a metilação do DNA funciona em associação com modificações da cromatina para reprimir a expressão gênica (BAYLIN; JONES, 2011). O processo de metilação ocorre pela ação da família de enzimas DNA metiltransferases (MULLER; PRADO, 2008). A DNMT (DNA metiltransferase) catalisa a transferência de grupos metil para o DNA, a enzima DNMT1 mantém os padrões de metilação normais da célula durante a mitose, as DNMT3a e DNMT3b promovem uma nova metilação no DNA, principalmente nas ilhas CpG (MULLER; PRADO, 2008).

Em tumores malignos, as alterações epigenéticas mais bem estudadas são as alterações de metilação que ocorrem em ilhas CpG, que estão presentes em aproximadamente 70% de todos os promotores de mamíferos. A metilação da ilha CpG desempenha um papel

importante na regulação transcricional, e é comumente alterada durante a transformação maligna (ROBERTSON, 2005; BAYLIN; JONES, 2011). A metilação do promotor é considerada como um dos principais mecanismos envolvidos na inativação de genes relacionados com tumores, particularmente supressores tumorais, juntamente com alterações genéticas, resultando no processo de carcinogênese. Essas alterações são investigadas em diversos tipos de cânceres, como o gástrico, em que a metilação do promotor é uma importante marca desse tipo de câncer, desempenhando um papel fundamental na iniciação e na progressão do tumor (WU *et al.*, 2017).

A metilação na região promotora dos genes supressores de tumor, como *PTEN*, é um mecanismo crítico para a sua inativação e é comumente associada à repressão da transcrição gênica que promove o desenvolvimento de vários tipos de câncer, incluindo a carcinogênese do CCEO. A desregulação da expressão de *PTEN*, devido à hipermetilação do promotor, frequentemente ocorre em cancer, e uma quantidade crescente de evidências sugere que esse gene pode ser inativado pelo mecanismo epigenético em diferentes cânceres. Estudos de câncer de próstata e linhagens celulares de leucemia e linfoma sugerem que os mecanismos epigenéticos podem ser responsáveis por casos em que a expressão de *PTEN* é desregulada na ausência de uma mutação detectável. A metilação nas regiões promotoras de *PTEN* pode resultar em uma menor expressão desse gene e tem sido relatada em diferentes cânceres, demonstrando seu possível envolvimento na patogênese dos cânceres orais e outras neoplasias (SUSHMA *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2016).

Estudos evidenciam a hipermetilação dos genes *DAPK*, *DCC* e *TIMP3* em aproximadamente 90% de casos clinicamente T1 e T2 de CCEO, sugerindo a viabilidade de utilizar esses marcadores no diagnóstico precoce do câncer oral (ARANTES *et al.*, 2015). Novos estudos epigenéticos com outros genes supressores tumorais precisam ser desenvolvidos, buscando elucidar mecanismos envolvidos na tumorigênese do câncer de boca e sugerindo novos biomarcadores.

2 PROPOSIÇÃO GERAL

Geral

Analisar a metilação do gene *PTEN* em neoplasias malignas e a imunexpressão das proteínas da via PI3K/AKT/PTEN em Carcinoma de Células Escamosas Oral.

Específicos

- Realizar uma revisão sistemática com metanálise no PROSPERO para avaliar o perfil de metilação do gene *PTEN* em neoplasias malignas.
- Avaliar a imunexpressão das proteínas PTEN, PI3K, S6K1 e GSK-3 β em Carcinomas de Células Escamosas Orais.
- Correlacionar a imunexpressão das proteínas PTEN, PI3K, S6K1 e GSK-3 β em Carcinomas de Células Escamosas Orais com o perfil clínico e histológico da amostra.

3 CAPÍTULOS

A presente tese está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato (ANEXO). Assim sendo, esta tese é composta de dois capítulos contendo dois artigos científicos que serão submetidos aos periódicos “*Journal of Oral Pathology & Medicine*” e “*Archives of Oral Biology*”.

3.1 Capítulo 1: METILAÇÃO DE PTEN EM NEOPLASIAS MALIGNAS: REVISÃO SISTEMÁTICA COM METANÁLISE

AUTORES:

EALBER CARVALHO MACEDO LUNA

Grau Acadêmico: Estudante de Doutorado em Odontologia; Bacharel em Odontologia.

Afiliação Institucional: Departamento de Clínica Odontológica, Setor de Diagnóstico Oral, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

KARUZA MARIA ALVES PEREIRA

Grau Acadêmico: Pós-Doutora em Odontologia, Doutora em Patologia Oral, Mestre em Patologia Oral, Bacharel em Odontologia. Posição: Professora Adjunta IV da Universidade Federal do Ceará. Afiliação Institucional: Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

Autor de Correspondência: Ealber Carvalho Macedo Luna: Rua Delmiro de Farias, S/N, Rodolfo Teófilo – Fortaleza, Ceará, Brasil.

E-mail: ealberluna@gmail.com

METILAÇÃO DE *PTEN* EM NEOPLASIAS MALIGNAS: REVISÃO SISTEMÁTICA COM METANÁLISE

RESUMO

Objetivo: este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de metilação do gene *PTEN* em neoplasias malignas. **Materiais e Métodos:** foi realizada uma revisão sistemática com metanálise registrada na base de dados PROSPERO. As estratégias de busca foram realizadas nas bases de dados (PubMed, Scopus, Web of Science, COCHRANE, LILACS e KOREA MED), incluindo a literatura cinzenta (Google Scholar, OpenGrey e ProQuest Dissertations & Theses Global). Essa busca foi realizada em duas fases por dois revisores de maneira independente. **Resultados:** Entre 573 estudos, 38 foram selecionados para a revisão sistemática e 12 foram incluídos para a metanálise. De uma forma geral, um baixo risco de viés foi observado. A amostra dos 38 estudos selecionados totalizou 5.118 casos de neoplasias malignas e 1.865 controles; para a metanálise, obteve-se um total de 1.075 pacientes com câncer e 521 pacientes sem câncer, obtendo-se um total de 411 eventos de metilação de *PTEN* nos pacientes com câncer e cinco eventos nos pacientes sem câncer. O principal desfecho avaliado foi a relação entre o perfil de metilação de *PTEN* em carcinomas humanos. **Conclusão:** Pôde-se concluir, no presente estudo, que o promotor do *PTEN* está mais hipermetilado em tecidos neoplásicos comparado aos tecidos normais, sugerindo o seu importante papel desempenhado como marcador de prognóstico e diagnóstico em diversos tipos de neoplasias.

Palavras-chave: PTEN, metanálise, metilação, neoplasias.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to evaluate the methylation profile of the PTEN gene in malignant neoplasms. **Materials and Methods:** A systematic review with meta-analysis was performed in the PROSPERO database. The search strategies were performed in the databases (PubMed, Scopus, Web of Science, COCHRANE, LILACS and KOREA MED), including the gray literature (Google Scholar, OpenGrey and ProQuest Dissertations & Theses Global). This search was performed in two phases by two independent reviewers. **Results:** Among 573 studies, 38 were selected for the systematic review and 12 were included for meta-analysis. In general, a low risk of bias was observed. The sample of the 38 selected studies totaled 5.188 cases of malignant neoplasms and 1.865 controls; for the meta-analysis, a total of 1075 patients with cancer and 521 patients without cancer were obtained, obtaining a total of 411 PTEN methylation events in cancer patients and 5 events in patients without cancer. The main outcome evaluated was the relationship between the methylation profile of PTEN in human carcinomas. **Conclusion:** In the present study, it was concluded that the PTEN promoter is more hypermethylated in neoplastic tissues compared to normal tissues, suggesting its important role as a marker of prognosis and diagnosis in several types of neoplasms. **Keywords:** PTEN, meta-analysis, methylation, neoplasms.

INTRODUÇÃO

PTEN é um gene que está presente no cromossomo 10 e atua com função dupla específica, altamente conservada e não redundante, que é capaz de eliminar os resíduos de fosfato das proteínas, além de atuar como um supressor tumoral e modulador crucial de várias reações no processo de carcinogênese¹. O *PTEN* inibe o eixo PI3K/AKT através da função lipofosfatase, a fim de regular a proliferação celular, migração, apoptose, crescimento e metabolismo energético²⁻³.

O importante papel da via de sinalização *PTEN/AKT* no desenvolvimento e na progressão de tumores é evidenciado em diferentes tipos de câncer de próstata, pulmão, mama, ovário e colorretal²⁻⁵, nos quais *PTEN* é regulado negativamente⁶.

No câncer, diferentes mecanismos envolvidos no controle da expressão e função de *PTEN* são geralmente alterados, como os eventos epigenéticos, transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais. Dentre estes, a regulação epigenética é crítica para o crescimento e desenvolvimento normal e fornece determinado controle transcricional. Com isso, mudanças epigenéticas são consideradas um evento precoce no desenvolvimento do tumor e uma das marcas do câncer. Isso porque o grau de metilação do DNA na região promotora de genes supressores de tumor, como o *PTEN*, fatores de transcrição e genes de resposta a drogas podem desempenhar diferentes papéis no início do câncer, na progressão tumoral e ainda na resposta ao tratamento⁶⁻⁸.

O silenciamento de genes supressores tumorais devido às regiões promotoras com hipermetilação e à ativação de oncogenes com hipometilação são marcadores de eventos moleculares precoces para células cancerígenas e para o desenvolvimento do câncer⁶. Estudos recentes apresentam um enfoque para a detecção de ilhas CpG com hipermetilação no gene supressor tumoral *PTEN* em diferentes tipos de câncer⁹⁻¹⁴.

É importante salientar que a metilação do gene *PTEN* é investigada em diferentes tipos de cânceres, entretanto, não há revisão sistemática da literatura discutindo e comparando os padrões de metilação em carcinomas. Assim, investigar o papel da metilação de *PTEN* em diferentes carcinomas é fundamental para melhor compreender seu papel na iniciação e na progressão da carcinogênese. Com base no exposto, esta revisão se propõe a investigar a metilação de *PTEN* em carcinomas humanos.

METODOLOGIA

Esta revisão sistemática foi conduzida para resumir o conhecimento atual sobre metilação de PTEN em carcinomas conforme a lista de verificação de Itens de Relatórios Preferenciais para Análises Sistemáticas e Metanálises (PRISMA). O protocolo foi registrado no banco de dados do Registro Internacional Prospectivo de Revisões Sistemáticas (PROSPERO) com o número de registro CRD42019120103.

Fontes de informação e estratégia de busca

Os estudos a serem considerados para inclusão foram identificados utilizando uma estratégia de busca individual para cada uma das seguintes bases de dados eletrônicas: PubMed, Scopus, Web of Science, COCHRANE, LILACS e KOREA MED (Recurso Online 1). Uma pesquisa parcial de literatura cinza foi realizada usando o Google Scholar, OpenGrey e ProQuest Dissertations & Theses Global. A pesquisa nas bases de dados e bibliográfica cinzenta incluiu todos os artigos publicados até 30 de abril de 2019, sem restrição de tempo. Referências duplicadas foram removidas pelo software gerenciador de referência (EndNote®, Thomson Reuters). Além disso, as listas de referências de artigos selecionados foram selecionadas manualmente para possíveis estudos relevantes que poderiam ter sido perdidos durante as buscas eletrônicas no banco de dados.

CrITÉRIOS de elegibilidade

Os critérios de inclusão adotados nesta revisão foram artigos sem restrição de ano de língua inglesa, estudos laboratoriais e estudos envolvendo seres humanos, todos que envolvessem análise de metilação de PTEN em carcinomas. Como critérios de exclusão, não foram considerados elegíveis: relatos de caso, estudos em animais, revisões de literatura e estudos sem parâmetros clínico-patológicos descritos.

Seleção de estudo

A seleção dos artigos foi realizada em duas fases. Na fase 1, dois revisores independentemente (ECML e SGF) revisaram os títulos e os resumos de todas as citações de banco de dados eletrônicas identificadas. Um terceiro revisor foi envolvido quando necessário

para tomar uma decisão final (KMAP). Os estudos que não cumpriram os critérios de inclusão foram descartados. Na fase 2, os mesmos critérios de seleção foram aplicados aos artigos completos para confirmar sua elegibilidade. Os mesmos dois revisores participaram independentemente na fase 2. A lista de referências de todos os artigos incluídos foi revista por um examinador, mas ambos os examinadores leram os artigos selecionados. Qualquer discordância em qualquer fase foi resolvida por discussão e acordo mútuo.

Processo de coleta de dados

Um autor coletou informações importantes de cada artigo selecionado. Um segundo revisor cruzou as informações coletadas e confirmou sua precisão. Novamente, qualquer discordância entre eles foi resolvida por discussão e concordância mútua. Para todos os estudos incluídos, as seguintes informações foram registradas: autor(es), ano de publicação, país, sexo, idade, tabagismo, etilismo, infecção por HPV, tamanho da amostra (grupo-estudo e grupo-controle), tipo de tecido (controle e neoplasia), tipo histológico, diferenciação do tumor, estadiamento clínico, tamanho do tumor, localização da lesão, progressão da doença, envolvimento da margem, metástase, tempo de *follow-up*, taxa de óbito, sobrevida, delineamento metodológico e principais resultados.

Risco de viés em estudos individuais

A análise do risco de viés dos estudos foi realizada de forma independente por dois autores (ECML e SGF) de acordo com um questionário desenvolvido pelo Instituto Joanna Briggles. Os autores classificaram cada item do questionário como “sim”, “não”, “impreciso” ou “não aplicável”. O risco de viés foi classificado como alto (até 49% de pontuação "sim"), moderado (50% a 69% de pontuação "sim") e baixo (mais de 70% de pontuação "sim").

Medidas resumidas e síntese dos resultados

O desfecho primário para esta revisão sistemática foi o uso do padrão de metilação de PTEN como biomarcador prognóstico em carcinomas. Um desfecho secundário seria o papel da metilação do PTEN como marcador diagnóstico. Qualquer tipo de medida foi considerada nesta revisão (variáveis categóricas e contínuas).

Os dados foram tabulados em uma planilha do Excel® (Microsoft Corporation,

Redmond, WA) com objetivo de obter frequências relativas e absolutas. Em seguida, foram exportados para o SPSS® (*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 17, IBM, Armonk, New York, USA) a fim de realizar análise estatística.

Metanálise

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software MedCalc para metanálise do tipo caso-controle. As análises de DerSimonian Lair foram utilizadas para cálculo das odds ratio combinadas em efeito aleatório. Uma confiança de 95% foi utilizada para todas as avaliações. Um total de 12 artigos foram incluídos na metanálise e estes foram também categorizados conforme origem da neoplasia (cabeça e pescoço, trato digestório e geniturinário).

RESULTADOS

Seleção de estudos

A fase 1 resultou em 573 referências bibliográficas nas bases de dados eletrônicas. No entanto, 32 artigos estavam em mais de um dos bancos de dados (artigos duplicados). Após a remoção destes, 540 artigos permaneceram para análise independente dos revisores. Além disso, foi realizada busca manual nas referências dos periódicos selecionados e no Google Acadêmico, no qual foram adicionados três artigos a partir das listas de referências dos periódicos.

A revisão de texto completo foi conduzida pelos revisores de maneira independente, e 38 artigos foram selecionados por preencherem os critérios de inclusão. Os motivos de exclusão dos demais trabalhos foram: estudos laboratoriais que envolviam análise de PTEN em outras patologias, estudos em neoplasias malignas sanguíneas, linfáticas ou cerebrais, estudos que não utilizaram amostras do tumor para análises, estudos em animais e estudos sem parâmetros clínico-patológicos descritos. Um fluxograma detalhando o processo de identificação, inclusão e exclusão de estudos é mostrado na Figura 1.

Análise descritiva da revisão sistemática

Todos os estudos desta revisão foram publicados na língua inglesa, entre 2001 e 2017, e foram conduzidos em quatorze países diferentes, sendo a maioria das publicações ocorrendo no China (n=06), Índia (n=06), seguido por EUA (n=05), Japão (n=04), Alemanha (n=02), Coreia (n=02), Taiwan (n=03), Irã (n=02), Sérvia (n=02), Espanha (n=02), Noruega (n=01), Suécia (n=01), Suíça (n=01) e Tailândia (n=01).

A amostra dos 38 estudos selecionados totalizou 4.205 casos de neoplasias malignas, sendo que o tamanho das amostras variou de cinco (SCHAGDARSURENGIN et al., 2003¹⁵) a 482 (HUANG et al., 2009). Os controles totalizaram 1.857, sendo que 13 estudos não relataram grupo-controle (KANG et al., 2002¹⁶; KISHI et al., 2005¹⁷; MURAO et al., 2006¹⁸; GOEL et al., 2007¹⁹; HOU et al., 2008²⁰; HINO et al., 2009²¹; HO et al., 2009²; HUANG et al., 2009²²; LU et al., 2009³; RIZVI et al., 2012¹¹; LI et al., 2014 ; DRAGOJ et al., 2015⁴; MASUNAGA et al., 2017¹⁴).

A maioria dos estudos envolveram neoplasias de mama (n=11; 28,9%) (BAREKATI et al., 2012²³; KHAN et al., 2004²⁴; MUGGERUD et al., 2010⁹; SADEQ et al., 2011¹⁰; SHETTY et al., 2012²⁵; STANKOVIC et al., 2014²⁶; YARI et al., 2015⁶; ZHANG et al., 2013²⁷; SIDIQQUI et al., 2016⁸; GARCIA et al., 2004²⁸; KLAJIC et al., 2013⁷), cavidade oral (n=04, 10,5%) (KIM et al., 2009²⁹; HUANG et al., 2009²²; ALYASIRI et al., 2013³⁰; SUSHMA et al., 2015³¹) e pulmão (n=04; 10,5%) (SORIA et al., 2002³²; KIM et al., 2009²⁹; STANKOVIC et al., 2014²⁶; DRAGOJ et al., 2015⁴).

O perfil de hipermetilação de *PTEN* foi evidenciado, principalmente, em carcinomas de mama, sendo observadas as porcentagens de 16,7% (15/89) (MUGGERUD et al., 2010⁹), 41,6% (BAREKATI et al., 2012²³), 34% (KHAN et al., 2004²⁴), 69,8% (SADEQ et al., 2011¹⁰), 20,4% (SHETTY et al., 2012²⁵), 36,6% (STANKOVIC et al., 2014²⁶), 30% (YARI et al., 2015⁶), 31% (ZHANG et al., 2013²⁷), 39,4% (SIDIQQUI et al., 2018⁸), 47,7% (GARCIA et al., 2004²⁸), 19,2% em carcinoma ductal em situ, 13,8% em carcinoma de mama invasivo estágio I, em estágio II 35%, em estágio III 72,3% e no IV 55% (KLAJIC et al., 2013⁷).

Além das neoplasias de mama, a hipermetilação de *PTEN* também ocorreu em carcinoma de tireoide com porcentagens de 45,7% (ALVAREZ-NUNES et al., 2006³³) e 44% (HOU et al., 2008²⁰), carcinoma de pulmão com 40% (DRAGOJ et al., 2015⁴), 28,4% (KIM et al., 2009²⁹), 37,6% (SORIA et al., 2002³²) e 36,6% (STANKOVIC et al., 2014²⁶), cavidade oral 1,2 % (HUANG et al., 2009²²), 35% (ALYASIRI et al., 2013³⁰), 24% (SUSHMA et al., 2015³¹).

Quanto aos cânceres no trato genital, foi evidenciado *PTEN* não metilado em ovário (HO et al., 2009²), porcentagem de 18,8 % de metilação de *PTEN* no endométrio

(SALVENSEN et al., 2001³⁴), 61,4% em cérvix (RIZVI et al., 2012¹¹), 15,7% no colo de útero e 8,1% no ovário (YANG et al., 2006). Na região colorretal, evidenciaram-se porcentagens de metilação de *PTEN* de 31,2% (YAZDANI et al., 2016⁵), 27,2% (LIN et al., 2015³⁵) e 6% (GOEL et al., 2007¹⁹). Em bexiga, observou-se 1,8% de metilação de *PTEN* (KUNZE et al., 2006³⁶), no timo 39% (MASUNAGA et al., 2017¹⁴), em pele não foi evidenciada a metilação de *PTEN* (MURAO et al., 2006¹⁸), em carcinoma de fígado 13% (SCHAGDARSURENGIN et al., 2003¹⁵) e em colangiocarcinoma 35,2% (SRIRAKSA et al., 2011³⁷) (Tabela 1).

Ainda quanto ao perfil de hipermetilação de *PTEN*, Li et al. (2014)³⁸ e Peng et al. (2016)¹³ observaram elevado padrão de hipermetilação de *PTEN* em carcinomas de nasofaringe, correspondendo a 82% e 80%, respectivamente. Pan et al. (2014)¹² também evidenciaram níveis de hipermetilação de *PTEN* em carcinoma de esôfago (10 %). Esses achados sugerem que a metilação de *PTEN* possa estar associada ao processo de tumorigênese nessas neoplasias.

Metanálise: carcinomas apresentam aumento significativo de metilação de *PTEN*

Dos 12 estudos de caso-controle levantados para metanálise, obteve-se um total de 1.075 pacientes no grupo de pacientes com câncer e 521 pacientes sem câncer, obtendo-se um total de 411 eventos (metilação de *PTEN*) nos pacientes com câncer e cinco eventos nos pacientes sem câncer.

Não houve heterogeneidade significativa entre os trabalhos ($p=0,110$) com um coeficiente $I^2 = 36\%$. O grupo de pacientes com câncer mostrou aumento significativo da metilação de *PTEN* com uma odds combinada de 19,84 (IC95% = 8,19 - 48,06) ($p<0,001$) (Figura 1).

Após análise de sensibilidade *live on out* nenhum dos estudos contribuiu isoladamente para esse aumento, apresentando, após retirada de Alvarez-Nunes et al., 2006³³ ($p<0,0001$), Garcia et al., 2004²⁸ ($p<0,0001$), Khan et al., 2004²⁴ ($p<0,0001$), Klajic et al., 2013⁷ ($p<0,0001$), Kunze et al., 2006³⁶ ($p<0,0001$), Muggerud et al., 2010⁹ ($p<0,0001$), Peng et al., 2016²⁰¹⁶ ($p<0,0001$), Sidiqqi et al., 2016⁸ ($p<0,0001$), Sriraksa et al., 2011³⁷ ($p<0,0001$), Shushma et al., 2015³¹ ($p<0,0001$), Yari et al., 2015⁶ ($p<0,0001$) e Zhang et al., 2013²⁷ ($p<0,0001$), aumento significativo da associação entre metilação de *PTEN* nos tecidos tumorais (Figura 2).

Risco de viés em estudos individuais

De um modo geral, a maioria dos estudos apresentou um risco de viés moderado (8 de 12), enquanto três estudos apresentaram baixo risco de viés e apenas um alto risco. Em relação às questões individuais do formulário Joanna Briggs, observou-se um alto risco para as questões 5, 6 e 8 (Figura 3).

DISCUSSÃO

PTEN é um gene que codifica uma proteína que regula a progressão do ciclo celular, sobrevivência, crescimento celular, angiogênese e estabilidade genômica através da via de sinalização PI3K/AKT, na qual sua expressão é modulada por eventos como mutação, deleção genômica, que geram silenciamento em muitos tumores primários e metastáticos^{19,20-22}. Além desses, perda de heterozigosidade no gene locus *PTEN*, mutações genéticas germinativas e somáticas de *PTEN*, silenciamento epigenético por metilação em agrupamento de CpG do promotor de *PTEN*, interações de proteína que reduzem a transcrição de *PTEN* e a degradação da proteína PTEN são importantes reguladores da expressão desse gene^{6,26}. Entretanto, a hipermetilação do promotor de *PTEN* é considerada um dos mecanismos mais importantes de sua inativação, o que pode estar associado ao processo de carcinogênese em diferentes localizações anatômicas¹²⁻¹³.

Evidências gerais da literatura e resultados atuais indicam que a hipermetilação de *PTEN* pode ser um importante evento epigenético envolvido no processo de carcinogênese de neoplasias de mama (BAREKATI et al., 2012; KHAN et al., 2004; MUGGERUD et al., 2010; SADEQ et al., 2011; SHETTY et al., 2012; STANKOVIC et al., 2014; YARI et al., 2015; ZHANG et al., 2013; SIDIQQUI et al., 2016; GARCIA et al., 2004; KLAJIC et al., 2013), tireoide (ALVAREZ-NUNES et al., 2006; HOU et al., 2008), nasofaringe (LI et al., 2014; PENG et al., 2016), pulmão (DRAGOJ et al., 2015; KIM et al., 2009; SORIA et al., 2002; STANKOVIC et al., 2014) e esôfago (PAN et al., 2014). Além disso, a metilação do promotor CpG do gene *PTEN* pode estar associada à agressividade do tumor e à metástase no carcinoma de esôfago. Portanto, o status de metilação de *PTEN* pode representar um valioso biomarcador para as neoplasias de esôfago (PAN et al., 2014).

No pulmão, a hipermetilação do promotor de *PTEN* é uma característica significativa do carcinoma de pulmão de células não pequenas que pode servir como um marcador molecular para esse tipo de neoplasia. Além disso, as coalterações da metilação de

PTEN têm valor para o prognóstico e para o subtipo de carcinoma de células escamosas (DRAGOJ et al., 2015). Um importante achado no estudo de Soria et al. (2002) evidenciou que a metilação de *PTEN* é reversível com 5-aza-2-desoxicidina. Embora alguns estudos mostrem a importância da metilação de *PTEN* no desenvolvimento do carcinoma de pulmão, Kim et al. (2009) concluíram que a metilação do promotor não é um mecanismo importante para a desregulação do *PTEN* em carcinoma de pulmão de células não pequenas na população.

Existem trabalhos na literatura que associaram a alta frequência de hipermetilação do promotor do gene *PTEN* em tumores na tireoide, especialmente em tumores foliculares, sugerindo seu possível papel na tumorigênese nessa localização (Alvarez-Nunes et al., 2006, Hou et al., 2008). A associação entre a metilação do *PTEN* com alterações genéticas pode ser responsável pela ativação da via de sinalização PI3K/AKT em tumores de tireoide já que, durante esse evento epigenético, poderá ocorrer o silenciamento desse gene, inativando a via da qual faz parte (Alvarez-Nunes et al., 2006, Hou et al., 2008). A metilação do promotor e a perda da expressão de *PTEN* ocorrem com frequência no carcinoma de células escamosas de cérvix, apresentando um importante mecanismo alternativo de silenciamento gênico (Rizvi et al., 2012). Além disso, esses achados corroboram com os trabalhos de Yang et al. (2006) e Salvensen et al. (2001), que também evidenciaram metilação desse gene em neoplasias de cérvix, de endométrio e de ovário, sugerindo seu envolvimento no surgimento nesses cânceres.

Em casos de carcinomas de células escamosas orais, foi evidenciada uma pequena taxa de metilação do gene estudado (1,2%); tomando por base esse resultado, evidencia-se que a inativação do *PTEN* através da metilação pode não ser um mecanismo importante na patogênese dessas lesões (Huang et al., 2009). Esses achados divergem do estudo de Sushmana et al., (2015), no qual foi observada hipermetilação do promotor, provocando silenciamento gênico, representando um importante biomarcador para esse tipo de câncer. Assim, os achados no CCEO permanecem conflitantes. De maneira geral, pode-se sugerir que o promotor do *PTEN* está mais hipermetilado em tecidos neoplásicos comparado aos tecidos normais, principalmente em carcinomas de mama, do trato digestório e urogenital, sugerindo o seu importante papel desempenhado com marcador de prognóstico e diagnóstico em diversos tipos de neoplasias nessas localizações.

Referências

1. Cheng Z, Shao X, Xu M, Wang J, Kuai X, Zhang L, et al. A promotes proliferation and migration abilities via regulation of the HER2/AKT-independent mTOR/S6K1 pathway in colorectal cancer. *Oncology Reports* 2019, 41: 2717-2728.
2. Ho CM, Lin MC, Huang SH, Lai HC, Chien TY, Chang FS. PTEN promoter methylation and LOH of 10q22–23 locus in PTEN expression of ovarian clear cell adenocarcinomas. *Gynecologic Oncology* 2009, 112: 307–313.
3. Lu X, Gu Y, Zhu D, Tan J, Liu X, Zha X. Promoter methylation status of PTEN, SYK and survivin genes in breast cancer tissues derived from Chinese women. *Asian Biomedicine* 2009, 3: 595-601.
4. Dragoj M, Milosevic C, Bancovic J, Dinic J, Pesic M, Tanic M, et al. Association of CCND1 overexpression with KRAS and PTEN alterations in specific subtypes of non-small cell lung carcinoma and its influence on patients' outcome. *Tumor Biol.*, 2015.
5. Yazdani Y, Farazmandfar T, Azadah H, Zecavatian Z. The prognostic effect of PTEN expression. status in colorectal cancer development and evaluation of factors affecting it: miR-21 and promoter methylation. *Journal of Biomedical Science* 2016, 23:9.
6. Yari K, Payandeh M, Rahimi Z. Association of the hypermethylation status of PTEN tumor suppressor gene with the risk of breast cancer among Kurdish population from Western Iran. *Tumour Biol.* 2016; 37 (6): 8145–8152.
7. Klajic J, Fleischer T, Dejeux E, et al. Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors. *BMC Cancer* 2013; 13: 456.
8. Siddiqui S, Akhter N, Deo SV, Shukla NK, Husain SA. A study on promoter methylation of PTEN in sporadic breast cancer patients from North India. *Breast Cancer*. Epub 2016 Jan 11.
9. Muggerud AA, Rønneberg JA, Wärnberg F, et al. Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOXC1, PPP2R2B and PTEN in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12: R3.
10. Sadeq V, Isar N, Manoochehr T. Association of sporadic breast cancer with PTEN/MMAC1/TEP1 promoter hypermethylation. *Med Oncol* 2011; 28: 420–423.
11. Rizvi MM, Alam MS, Mehdi SJ, Ali A, Batra S. Allelic loss of 10q23.3, the PTEN gene locus in cervical carcinoma from Northern Indian population. *Pathol Oncol Res* 2012; 18(2): 309-13.
12. Pan QF, Li WT, Dong WC, Chen YZ, Yin L, Liu W. *PTEN* hypermethylation profiles of Chinese Kazakh patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the Esophagus* 2014; 27: 396–402.

13. Peng H, Chen Y, Gong P, Cai L, Lyu X. Higher methylation intensity induced by EBV LMP1 via NF- κ B/ DNMT3b signaling contributes to silencing of PTEN gene. *Oncotarget* 2016; 7-26.
14. Masunaga A, Omatsu M, Kunimura T, Uematsu S, Kamio Y, Kitami A, et al. Expression of PTEN and its pseudogene PTENP1, and promoter methylation of PTEN in non-tumourous thymus and thymic tumours. *J Clin Pathol* 2017; 0: 1–7.
15. Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann, Flemming P. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 1866–1871.
16. Khang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter Methylation and Silencing of PTEN in Gastric Carcinoma. *Laboratory Investigation* 2002; 82.
17. Kishi M, Nakamura M, Nishimine M, Ikuta M, Kirita T, Konishi M. Genetic and epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. *Oral Oncology* 2005; 41: 161–169.
18. Murao K, Kubo Y, Ohtani N, Hara E, Arase S. Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. *British Journal of Dermatology* 2006; 155: 999–1005.
19. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, et al. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res.* 2004; 64: 3014–3021.
20. Hou P, Ji M, Xing M. Association of PTEN Gene Methylation With Genetic Alterations in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signaling Pathway in Thyroid Tumors. *Cancer*, 2008.
21. Hino R, Uozaki H, Murakami M, Ushiko T. Activation of DNA Methyltransferase 1 by EBV Latent Membrane Protein 2A Leads to Promoter Hypermethylation of PTEN Gene in Gastric Carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69 (7).
22. Huang KH, Huang SF, Chen IH, Liao CT, Wang HM, Hsieh LL. Methylation of RASSF1A, RASSF2A, and HIN-1 Is Associated with Poor Outcome after Radiotherapy, but not Surgery, in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (12).
23. Barekati Z, Radpour R, Kohler C, et al. Methylation profile of TP53 regulatory pathway and mtDNA alterations in breast cancer patients lacking TP53 mutations. *Hum Mol Genet.* 2010; 19: 2936–2946.
24. Khan S, Kumagai T, Vora J, et al. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer.* 2004; 112: 407–410.
25. Shetty PJ, Pasupuleti N, Chava S, Nasaruddin K, Hasan Q. Altered transcription and expression of PTEN in breast tumors: is it regulated by hypermethylation? *Breast Dis.* 2011; 33: 27–33.

26. Stankovic T, Milinkovic T, Bancovic J, Dinic J, Tanic N, Dramicanin T, et al. Comparative analyses of individual and multiple alterations of p53, PTEN and p16 in non-small cell lung carcinoma, glioma and breast carcinoma samples. *Biomed Pharmacother* 2014.
27. Zhang HY, Liang F, Jia ZL, Song ST, Jiang ZF. Mutation, methylation and expression in breast cancer patients. *Oncol Lett*. 2013; 6: 161–168.
28. Garcia JM, Silva J, Pena C, et al. Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001; 41: 117–124.
29. Kim DS, Lee SM, Yoon GS, Choi JE, Park JY. Infrequent hypermethylation of the PTEN gene in Korean non-small-cell lung cancers. *JCA* 2009.
30. Alyasiri NS, Mehdi SJ, Alam MS, Ali A, Mandal AK, Gupta S, et al. PTEN-mediated AKT activation contributes to the reduced apoptosis among Indian oral squamous cell carcinoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138: 103-9.
31. 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. *Tumor Biol* 2016; 37: 7625–7632.
32. Soria JC, et al. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res*. 2001; 8: 1178–1184.
33. Alvarez-Nuñez F, Bussaglia E, Mauricio D, Ybarra J, Vilar M, Lerma E, et al. PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid* 2006; 16 (1): 17-23.
34. Salvesen HD, MacDonald M, Ryan A, Jacobs YJ, Lynch ED. PTEN Methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int. J. Cancer* 2001; 91: 22–26.
35. Lin PC, Lin JK, Lin HH, et al. A comprehensive analysis of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) loss in colorectal cancer. *World J Surg Oncol*. 2015; 13:186.
36. Kunze E, Wendt M, Schlott T. Promoter hypermethylation of the 14-3-3 \hat{U} , SYK and CAGE-1 genes is related to the various phenotypes of urinary bladder carcinomas and associated with progression of transitional cell carcinomas. *International Journal of Molecular Medicine*, 2006; 18: 547-557.
37. Sriraksa R, Zeller C, El-Bahrawy MA, Daduang WB. CpG-island methylation study of liver fluke-related cholangiocarcinoma. *British Journal of Cancer* 2011; 104: 1313 – 1318.
38. Li J, Gong P, Lyu X, Yao K, Li X, Peng H. Aberrant CpG island methylation of PTEN is an early event in nasopharyngeal carcinoma and a potential diagnostic biomarker. *Oncol Rep*. 2014; 31: 2206–2212.

Figura 1. Diagrama de fluxo dos critérios de busca e seleção de literatura adaptados do PRISMA

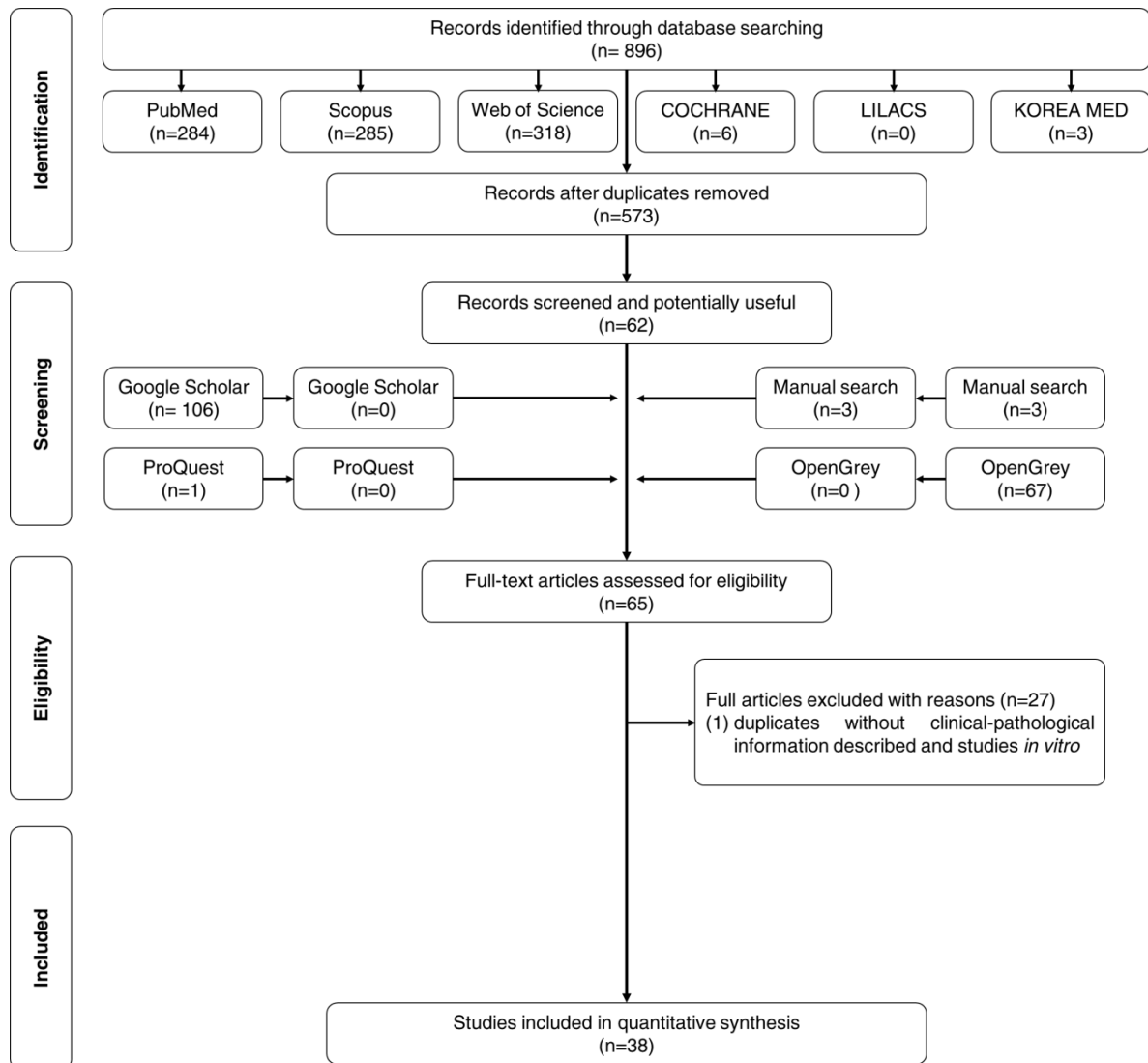


TABELA 1. SÍNTESE DOS ARTIGOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA

Autor	Ano	Amostra	Tipo de neoplasia	Conclusão
Kunze, E	2006	GE:55 GC:6	bexiga	Apenas 1 caso metilado de carcinoma papilar não-invasivo de bexiga (1/55).
Huang, K	2009	GE:482	CCE oral	Metilação de PTEN em CCEOs foi raro (1,2%).
Alvarez-Nunes, F	2006	GC:39 GE:53	tireoide	PTEN hipermetilado em 21 de 46 (45,7%) carcinomas papilíferos, 6 de 7 carcinomas foliculares e 5 de 6 adenomas foliculares.
Alyasiri, N	2013	GE:100 GC:100	CCE oral	35% de PTEN hipermetilado.
Barekati, Z	2012	GE:24 GC:17	mama	41,6% de hipermetilação de PTEN.
Dragoj, M	2015	GE:30	pulmão	40 % de PTEN hipermetilado.
Goel, A	2007	GE:123	cólon	6% de metilação de PTEN.
Hino, R	2009	GE:116	carcinoma gástrico	O promotor do gene PTEN foi de 29%, 36% e 64% para os locais (A), (B) e (C) no GC associado ao VEB, respectivamente, e 13%, 15% e 30% no GC EBV negativo.
Ho, C	2009	GE:24	ovário	PTEN não metilado.
Hou, P	2008	GE:143	tireoide	44% de hipermetilação de PTEN.
Kang, Y	2002	GE:310	carcinoma gástrico	17,5% de PTEN hipermetilado.
Khan, S	2004	GE:44 GC:16	mama	34% de PTEN hipermetilado.
Kim, D	2009	GC:137 GE:137	pulmão	28,4% de PTEN hipermetilado.
Kishi M	2005	GE: 36	glândula salivar e boca	Não foi evidenciada a metilação de PTEN em neoplasias malignas de glândula salivar e cavidade oral.
Li, J. et al.	2014	GE: 45	nasofaringe	82% de hipermetilação de PTEN.
Lin, PC et al.	2015	GE: 198 GC:198	colo retal	27,2% de hipermetilação de PTEN.
Lu, X. et al.	2009	GE: 52	mama	43,2% de PTEN hipermetilado.
Masunaga, A et al.	2017	GE: 39	timo	39% de PTEN hipermetilado.

Muggerud, AA et al.	2010	GE: 89 GC: 23	mama	Perfil de hipermetilação de PTEN 18.5% carcinoma ductal <i>in situ</i> , 14.3% carcinoma ductal invasivo, 23.5% carcinoma misto).
Murao, K et al.	2006	GE: 20	pele	PTEN apresentou 0% de metilação em carcinoma de células escamosas de pele.
Pan, Q F	2014	GC:65 GE:95	esôfago	10% de hipermetilação de PTEN.
Peng, H	2016	GE: 50 GC: 22	nasofaringe	80% de PTEN hipermetilado.
Rizvi, M	2012	GE 223	cérvix	61,4% de PTEN hipermetilado.
Sadeq, V	2011	GE: 52 GC: 20	mama	69,8% de PTEN hipermetilado.
Salvensen, H	2001	GC:138 GE:138	endométrio	18,8% de PTEN hipermetilado.
Schagdarsurengin, U	2003	GE:05 GC:02	fígado	13% de PTEN hipermetilado.
Shetty, P	2012	GE:93 GC:93	mama	20,4% de PTEN hipermetilado.
Soria, J	2002	GE:125 GC:125	pulmão	37,6% de PTEN hipermetilado.
Sriraksa, R	2011	GE:102 GC:29	colangiocarcinoma	35,2% de PTEN hipermetilado.
Stankovic, T	2014	GE:158 GC:79	pulmão, glioma e mama	36,6% de PTEN hipermetilado.
Sushma, P	2015	GE:50 GC:50	cavidade oral	24% de PTEN hipermetilado.
Yang, H	2006	GE:237 GC:237	cérvix	PTEN apresentou-se hipermetilado em 15,7% de carcinomas de colo de útero e 8,1% em carcinoma de ovário.
Yari, K	2015	GE:103 GC:50	mama	30% de PTEN hipermetilado.
Yazdani, Y	2016	GE:125 GC:125	colorretal	31,2% de PTEN hipermetilado.
Zhang	2013	GE:45 GC:10	mama	31% de PTEN hipermetilado.
Sidiqqi et	2016	GE:180	mama	39,4% de PTEN hipermetilado.

al.		GC:180		
Garcia et al.	2004	GE:90 GC:90	mama	47,7% de PTEN hipermetilado.
Klajic et al.	2013	GE:214 GC:6	mama	Porcentagem de metilação de PTEN em: carcinoma ductal <i>in situ</i> : 19,2%; carcinomas de mama invasivo estágio I: 13,8%, estágio II: 35%; estágio III: 72,3% e estágio IV: 55%.

Figura 2: Metanálise da metilação de *PTEN*

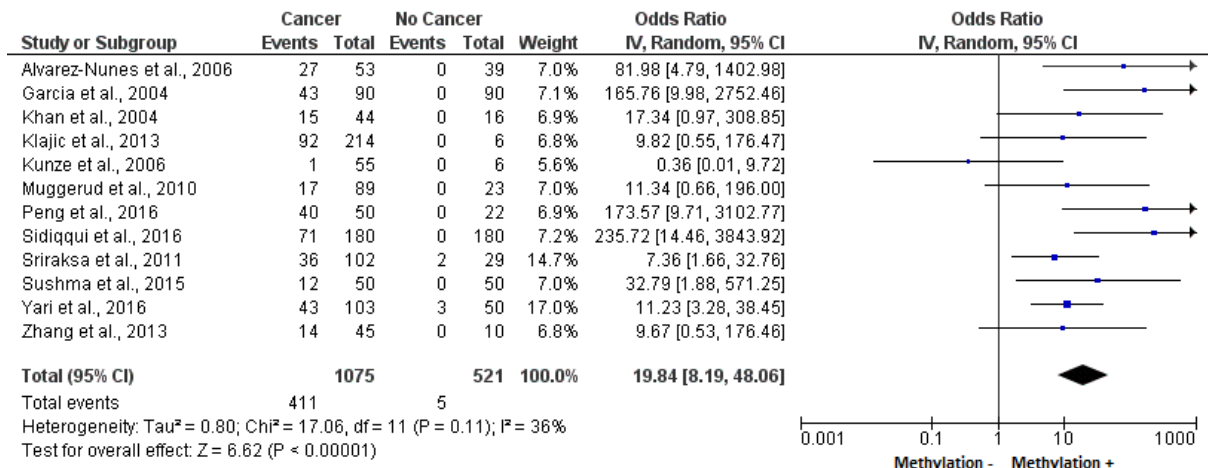
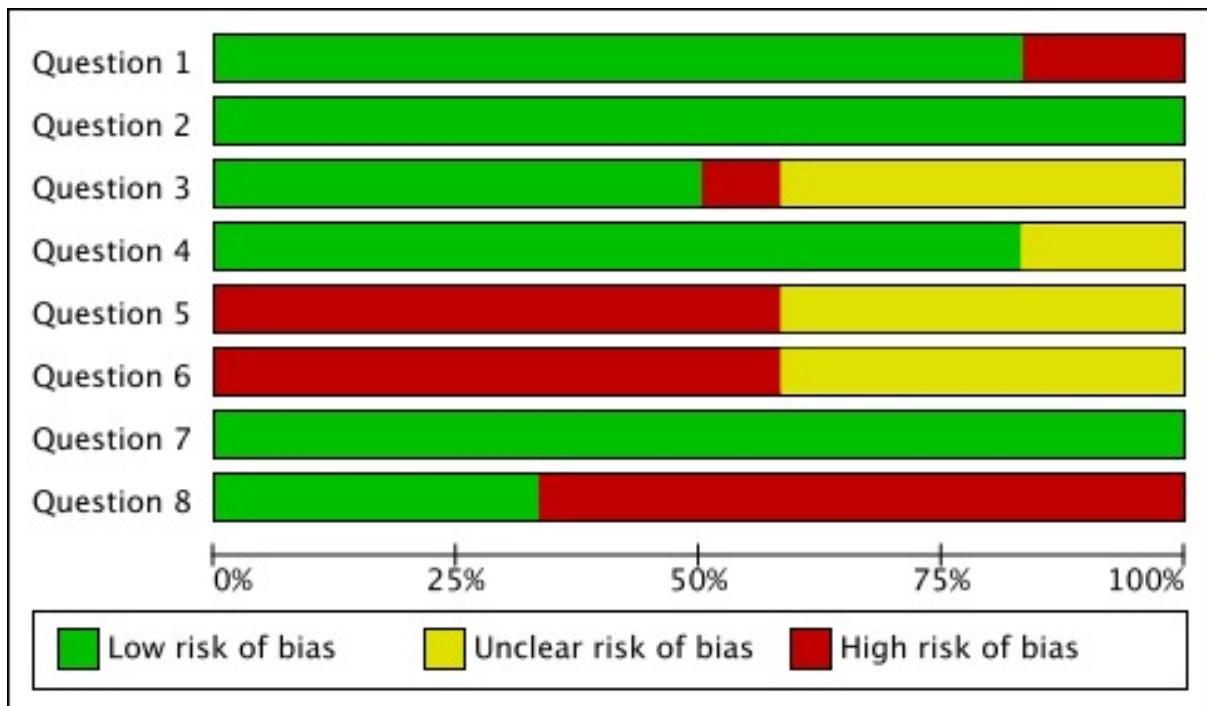


Figura 3. Gráfico do risco de viés: revisão dos julgamentos dos autores sobre cada ítem do risco de viés apresentados na forma de porcentagem para cada estudo incluído.



Apêndice

Search Terms Specific for Each Database and Truncations

Eletronic Database	Search strategy used	Items found
Keywords	PTEN protein, human[MeSH Terms]; PTEN- Phosphohydrolase[MeSH Terms]; Methylation[MeSH Terms]; DNA Methylation[MeSH Terms]; Neoplasms[Mesh]; Neoplasms Metastasis[Mesh]; Tumor Suppressor Proteins"[Mesh]; Genes, Tumor Suppressor[Mesh]	
PubMed	Search (((PTEN protein, human[MeSH Terms]) OR PTEN-Phosphohydrolase[MeSH Terms])) AND ((Methylation[MeSH Terms]) OR DNA Methylation[MeSH Terms])) AND (((("Neoplasms"[Mesh]) OR "Neoplasms Metastasis"[Mesh]) OR "Tumor Suppressor Proteins"[Mesh]) OR "Genes, Tumor Suppressor"[Mesh])	284
Scopus	TITLE-ABS-KEY ("MMAC1 protein" OR "PTEN-MMAC1 protein" OR "phosphatase and tensin homolog" OR "phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10" OR "phosphatase and tensin homolog protein" OR "mutated in multiple advanced cancers 1 protein" OR "PTEN Protein" OR "Phosphatase and Tensin Homologue on Chromosome Ten Protein" OR "PTEN Phosphatase" OR "MMAC1	285

Protein OR PTEN Protein Phosphatase" OR "Mutated In Multiple Advanced Cancers 1 Protein") AND TITLE-ABS-KEY ("Methylations" OR "DNA Methylations") AND TITLE-ABS-KEY ("Neoplasia" OR "Neoplasias" OR "Neoplasm" OR "Tumors" OR "Tumor" OR "Cancer" OR "Cancers" OR "Malignancy" OR "Malignancies" OR "Malignant Neoplasms" OR "Malignant Neoplasm" OR "Benign Neoplasms" OR "Benign Neoplasm" OR "Neoplasm Metastases" OR "Metastasis" OR "Metastases" OR "Metastasis Suppressor Proteins" OR "Growth Suppressor Proteins" OR "Tumor Suppressor Gene" OR "Antioncogenes" OR "Antioncogene" OR "Emerogenes" OR "Emerogene" OR "Onco-Suppressor Gene" OR "Onco-Suppressor Genes" OR "Cancer Suppressor Genes" OR "Cancer Suppressor Gene" OR "Recessive Oncogene" OR "Recessive Oncogenes" OR "Anti-Oncogenes" OR "Anti Oncogenes" OR "Anti-Oncogene" OR "Tumor Suppressing Genes" OR "Tumor Suppressing Gene" OR "Tumor Suppressor Genes" OR "Metastasis Suppressor Genes" OR "Metastasis Suppressor Gene" OR "Growth Suppressor Genes" OR "Growth Suppressor Gene")

Web of Science	<p>((TÓPICO: (((((((((((MMAC1 protein OR PTEN-MMAC1 protein) OR (phosphatase AND tensin homolog)) OR (phosphatase AND tensin homolog deleted from chromosome 10)) OR (phosphatase AND tensin homolog protein)) OR mutated in multiple advanced cancers 1 protein) OR PTEN Protein) OR (Phosphatase AND Tensin Homologue on Chromosome Ten Protein)) OR PTEN Phosphatase) OR MMAC1 Protein) OR PTEN Protein Phosphatase) OR Mutated In Multiple Advanced Cancers 1 Protein) AND TÓPICO: (Methylations OR DNA Methylations)) AND TÓPICO: (((((((((((((((((((((((((((((((((((((((Neoplasia OR Neoplasias) OR Neoplasm) OR Tumors) OR Tumor) OR Cancer) OR Cancers) OR Malignancy) OR Malignancies) OR Malignant Neoplasms) OR Malignant Neoplasm) OR Neoplasm, Malignant) OR Benign Neoplasms) OR Benign Neoplasm) OR Neoplasm Metastases) OR Metastasis) OR Metastases) OR Metastasis Suppressor Proteins) OR Growth Suppressor Proteins) OR Tumor Suppressor Gene) OR Antioncogenes) OR Antioncogene) OR emergences) OR emerogenes) OR Onco-Suppressor Gene) OR Onco-Suppressor Genes) OR Cancer Suppressor Genes) OR Cancer Suppressor Gene) OR Recessive Oncogene) OR Recessive Oncogenes) OR Anti-Oncogenes) OR Anti Oncogenes) OR Anti-Oncogene) OR Tumor Suppressing Genes) OR Tumor Suppressing Gene) OR Tumor Suppressor Genes) OR Metastasis Suppressor Genes) OR Metastasis Suppressor Gene) OR Growth Suppressor Genes) OR Growth Suppressor Gene))</p>	318
COCHRANE	<p>ID Search Hits</p> <p>#1 MMAC1 protein OR PTEN-MMAC1 protein OR phosphatase and tensin homolog OR phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 OR phosphatase and tensin homolog protein OR mutated in multiple advanced cancers 1 protein OR PTEN Protein OR Phosphatase and Tensin Homologue on Chromosome Ten Protein OR PTEN Phosphatase OR MMAC1 Protein OR PTEN Protein Phosphatase OR Mutated In Multiple Advanced Cancers 1 Protein</p> <p>#2 Methylations OR DNA Methylations</p> <p>#3 Neoplasia OR Neoplasias OR Neoplasm OR Tumors OR Tumor OR Cancer OR Cancers OR Malignancy OR Malignancies OR Malignant Neoplasms OR Malignant Neoplasm OR Neoplasm, Malignant OR Benign Neoplasms OR Benign Neoplasm OR Neoplasm Metastases OR Metastasis OR Metastases OR Metastasis Suppressor Proteins OR Growth Suppressor Proteins OR Tumor Suppressor Gene OR Antioncogenes OR Antioncogene OR Emerogenes OR Emerogene OR Onco-Suppressor Gene OR Onco-</p>	6

	Suppressor Genes OR Cancer Suppressor Genes OR Cancer Suppressor Gene OR Recessive Oncogene OR Recessive Oncogenes OR Anti-Oncogenes OR Anti Oncogenes OR Anti-Oncogene OR Tumor Suppressing Genes OR Tumor Suppressing Gene OR Tumor Suppressor Genes OR Metastasis Suppressor Genes OR Metastasis Suppressor Gene OR Growth Suppressor Genes OR Growth Suppressor Gene #4 #1 and #2 and #3	
LILACS	(tw:(MMAC1 protein OR PTEN-MMAC1 protein OR phosphatase and tensin homolog OR phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 OR phosphatase and tensin homolog protein OR mutated in multiple advanced cancers 1 protein OR PTEN Protein OR Phosphatase and Tensin Homologue on Chromosome Ten Protein OR PTEN Phosphatase OR MMAC1 Protein OR PTEN Protein Phosphatase OR Mutated In Multiple Advanced Cancers 1 Protein)) AND (tw:(Methylations OR DNA Methylations)) AND (tw:(Neoplasia OR Neoplasias OR Neoplasm OR Tumors OR Tumor OR Cancer OR Cancers OR Malignancy OR Malignancies OR Malignant Neoplasms OR Malignant Neoplasm OR Neoplasm, Malignant OR Benign Neoplasms OR Benign Neoplasm OR Neoplasm Metastases OR Metastasis OR Metastases OR Metastasis Suppressor Proteins OR Growth Suppressor Proteins OR Tumor Suppressor Gene OR Antioncogenes OR Antioncogene OR Emerogenes OR Emerogene OR Onco-Suppressor Gene OR Onco-Suppressor Genes OR Cancer Suppressor Genes OR Cancer Suppressor Gene OR Recessive Oncogene OR Recessive Oncogenes OR Anti-Oncogenes OR Anti Oncogenes OR Anti-Oncogene OR Tumor Suppressing Genes OR Tumor Suppressing Gene OR Tumor Suppressor Genes OR Metastasis Suppressor Genes OR Metastasis Suppressor Gene OR Growth Suppressor Genes OR Growth Suppressor Gene))	0
KOREA MED	PTEN [ALL] AND neoplasia [ALL]	3
<i>Grey literature</i>		
Google Scholar	Busca #1. allintitle: allintitle: PTEN AND methylation (total 73) Busca #2. allintitle: PTEN and neoplasm (total 33)	67
ProQuest	noft(MMAC1 protein OR PTEN-MMAC1 protein OR phosphatase and tensin homolog OR phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 OR phosphatase and tensin homolog protein OR mutated in multiple advanced cancers 1 protein OR PTEN Protein OR Phosphatase and Tensin Homologue on Chromosome Ten Protein OR PTEN Phosphatase OR MMAC1 Protein OR PTEN Protein Phosphatase OR Mutated In Multiple Advanced Cancers 1 Protein) AND noft(Methylations OR DNA Methylations) AND noft(Neoplasia OR Neoplasias OR Neoplasm OR Tumors OR Tumor OR Cancer OR Cancers OR Malignancy OR Malignancies OR Malignant Neoplasms OR Malignant Neoplasm OR Neoplasm, Malignant OR Benign Neoplasms OR Benign Neoplasm OR Neoplasm Metastases OR Metastasis OR Metastases OR Metastasis Suppressor Proteins OR Growth Suppressor Proteins OR Tumor Suppressor Gene OR Antioncogenes OR Antioncogene OR Emerogenes OR Emerogene OR Onco-Suppressor Gene OR Onco-Suppressor Genes OR Cancer Suppressor Genes OR Cancer Suppressor Gene OR Recessive Oncogene OR Recessive Oncogenes OR Anti-Oncogenes OR Anti Oncogenes OR Anti-Oncogene OR Tumor Suppressing Genes OR Tumor Suppressing Gene OR Tumor Suppressor Genes OR Metastasis Suppressor Genes OR Metastasis Suppressor Gene OR Growth Suppressor Genes OR Growth Suppressor Gene)	1
OpenGrey	PTEN	67

3.1 Capítulo 2: ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PTEN, PI3K, S6K1 E GSK-3 β EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS

AUTORES:

EALBER CARVALHO MACEDO LUNA

Grau Acadêmico: Estudante de Doutorado em Odontologia; Bacherel em Odontologia

Afiliação Institucional: Departamento de Clinica Odontológica, Setor de Diagnóstico Oral, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

KARUZA MARIA ALVES PEREIRA

Grau Acadêmico: Pós-Doutora em Odontologia, Doutora em Patologia Oral, Mestre em Patologia Oral, Bacharel em Odontologia. Posição: Profesora Adjunta IV da Universidade Federal do Ceará. Afiliação Institucional: Departamento do Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

Autor de Correspondência: Ealber Carvalho Macedo Luna: Rua Delmiro de Farias, S/N, Rodolfo Teófilo – Fortaleza, Ceará, Brasil.

E-mail: ealberluna@gmail.com

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PTEN, PI3K, S6K1 E GSK-3 β EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS

RESUMO

OBJETIVO: analisar a expressão imunoistoquímica de PTEN, PI3K, S6K1 e GSK-3 β em amostras de carcinomas de células escamosas orais (CCEO). **MATERIAL E MÉTODO:** para isso, foram selecionados 76 casos de CEC oral do Serviço de referência em câncer do Estado. Foi realizada técnica de TMA (*Tissue microarray*) analisando os casos de CEC oral, área perilesional e linfonodo. Os espécimes foram submetidos à técnica imunoistoquímica da Estreptavidina-biotina-peroxidase utilizando os anticorpos da marca Abcam PTEN (1:400), GSK-3 β (1:100), S6K1 (1:200) e PI3K (1:400). As células imunopositivas para esses marcadores foram contadas, bem como avaliadas a localização e a intensidade da marcação, sendo expressas as médias \pm EPM das contagens das células e dos histoscores calculados, os quais foram analisados pelo teste qui-quadrado de Pearson. Os dados categóricos foram expressos em frequência absoluta e comparados pelo teste Exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson, adotado o nível de significância de $p < 0,05$. **RESULTADOS:** foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a marcação de PTEN no citoplasma ($p < 0,001$), de PI3K ($p < 0,01$) e de GSK-3 β quando comparadas amostras de tumor, perilesão e metástase linfonodal. Com relação à marcação do PTEN no núcleo ($p = 0,351$) e de S6K1 ($p = 0,999$), não foram observadas diferenças estatísticas. **CONCLUSÃO:** sugere-se que as expressões dessas proteínas possam estar envolvidas no processo de carcinogênese oral.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas, PTEN, Fosfatidilinositol 3-Quinase.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To analyze immunohistochemical expression of PTEN, PI3K, S6K1 and GSK-3 β in oral squamous cell carcinoma samples (OSCC). **MATERIAL AND METHODS:** We selected 76 cases of oral SCC from the state cancer reference services. A TMA (Tissue microarray) technique was performed, analyzing the cases of oral SCC, perilesional area and lymph node. Specimens were subjected to the Streptavidin-biotin-peroxidase immunohistochemical technique using the antibodies of the brand Abcam PTEN (1: 400), GSK-3 β (1: 100), S6K1 (1: 200) and PI3K (1: 400). Immunopositive cells for these markers were counted, as well as the location and intensity of labeling, and the mean \pm SEM of the cell counts and calculated histoscores were expressed, which were analyzed by the Pearson chi-square test. The categorical data were expressed in absolute frequency and compared by Fisher's exact test or Pearson's chi-square, adopting the level of significance of $p < 0.05$. **RESULTS:** Statistically significant differences were observed between cytoplasmic PTEN ($p < 0.001$), PI3K ($p < 0.01$) and GSK-3 β markers when compared to tumor, perillion and lymph node metastases. Regarding PTEN marking in the nucleus ($p = 0.351$) and S6K1 ($p = 0.999$), no statistical differences were observed. **CONCLUSION:** It is suggested that the expression of these proteins may be involved in the oral carcinogenesis process.

Keywords: Squamous cell carcinoma, PTEN, Phosphatidylinositol 3-Kinase.

INTRODUÇÃO

O câncer de boca continua sendo alvo de diversos estudos científicos, sendo o sexto tipo de carcinoma mais comum no mundo¹. No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA)², em 2018, estima-se a ocorrência de 14.700 novos casos, representando um importante problema de saúde pública. Dentre os diversos tipos de câncer que podem acometer a cavidade oral, o Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO) é o mais frequente e representa mais de 90% dos cânceres nessa localização e cerca de 38% de todos os diagnósticos de tumores malignos de cabeça e pescoço^{3,4}. No Brasil, afeta principalmente homens entre a sexta e a oitava década de vida e possui vários fatores etiológicos, porém o tabagismo e o etilismo, hábitos comuns em países ocidentais, contribuem para o desenvolvimento de mais de 75% dos casos dos CCEO, incluindo o câncer oral e de orofaringe. Contudo, apesar dos avanços atuais, os mecanismos de carcinogênese ainda não estão completamente elucidados⁴⁻⁷.

Existem algumas vias de sinalização que se apresentam bastante desreguladas em vários tipos de cânceres, dentre elas a via do fosfatidilinositol 3 – quinase (PI3K)⁸⁻¹⁰. Essa via está intimamente relacionada à metástase, angiogênese, organização do citoesqueleto, progressão do ciclo celular, crescimento e resistência ao tratamento^{11,12}, sendo crucial em muitos aspectos de crescimento celular e de sobrevivência tanto em condições fisiológicas como patológicas¹³⁻¹⁴.

A via é ativada por meio da ligação de fatores de crescimento que se ligam à membrana plasmática celular por meio de receptores tirosino quinase também presentes na membrana da célula⁹. Essa ligação provoca uma cascata de sinalização intracelular que começa com a ativação da molécula PI3K que, através de seu subproduto PIP3, ativa AKT, que é uma molécula que controla diversas funções celulares como metabolismo, proliferação, crescimento e sobrevivência. Uma vez fosforilada, AKT pode ativar mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), que regula a proliferação celular por fosforilação de P70S6 na transição da fase G1/S do ciclo celular. P70S6 fosforila a proteína S6 da subunidade 40S do ribossomo (PS6), induzindo a síntese proteica celular. Essa reação é regulada negativamente pela desfosforilação do PTEN^{10,15}.

Nesse contexto, objetiva-se realizar a análise imunoistoquímica de PTEN em amostras de CCEOs com diferentes gradações histológicas e associadas a outras proteínas da via, buscando um melhor entendimento dessa via no CCEO.

MATERIAL E MÉTODO

Seleção da amostra e coleta de dados clínicos

Estudo do tipo analítico e transversal usando análise imunoistoquímica de *Tissue Microarrays* (TMAs) contendo 76 núcleos de CCEOs, epitélios orais normais perilesão e, em caso de metástase, linfonodos contendo tecido neoplásico. Os TMAs foram obtidos do Instituto do Câncer do Ceará – ICC no período compreendido entre 1º de janeiro de 2013 a 1º de setembro de 2016. Esta pesquisa obteve o parecer favorável do Comitê de ética e Pesquisa do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará, sob o número do parecer 3.728.390 (ANEXO 2).

A partir das fichas clínicas de biópsias, as seguintes características clínicas foram obtidas: idade, sexo, cor da pele, hábitos deletérios (tabagismo e etilismo) e localização da lesão. Os dados referentes ao TNM, aspecto clínico, tempo de evolução, modalidade de tratamento e taxa de sobrevida foram coletados dos prontuários médicos.

Histologia e Imunoistoquímica de TMA

Os núcleos dos CCEOs presentes nos TMAs foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E) a fim de categorizar os espécimes de acordo com a Gradação Histológica de Malignidade da OMS¹⁶. A técnica imunoistoquímica seguiu o protocolo conforme Chaves et al., 2017¹⁷. As lâminas de TMA foram incubadas com os anticorpos primários descritos na Tabela 1 (clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e incubação). Para o controle positivo da reação, foram utilizadas amostras de câncer de mama para o PTEN, de músculo esquelético humano para o PI3K, e de câncer de cólon para GSK-3 β e S6K1. No controle negativo, foi excluída a incubação do anticorpo primário em todas as reações. A avaliação histopatológica das lâminas por H&E e imunoistoquímica se deu por um único patologista experiente.

Avaliação do perfil de imunoexpressão

A avaliação da imunoexpressão de PTEN, GSK-3 β , PI3K e S6K1 foi realizada com base na intensidade de marcação (SI) e porcentagem de células marcadas positivamente (PP) dentro da secção da amostra. Para PTEN e GSK-3 β , foi utilizado o escore imunorreativo (IRS),

que foi calculado da seguinte forma: $IRS = SI \times PP$, no qual SI foi definido como: 0 = negativo, 1 = fraco, 2 = moderado e 3 = forte, e PP é representado por: 0 = 1%, 1 = 1% – 10%, 2 = 11% - 50%, 3 = 51% - 80% e 4 = >80% de células marcadas positivamente. A perda de PTEN e de GSK-3 foi definida por um IRS menor ou igual a 3 e o ganho dessas proteínas com IRS maior que 3¹⁸.

Para a análise da imunomarcção de PI3K e S6K1 foi utilizado o histoscore H, que foi calculado da seguinte maneira: $H = PP \times SI$, em que SI foi definido como: 0 = negativo, 1 = fraco, 2 = moderado e 3 = forte, e PP representa o percentual de células marcadas em cada um dos casos, variando de 0% a 100%, tendo um valor máximo de 300 (100% x 3). A perda de PI3K e de S6K1 foi definida por H menor que 50%, e o ganho por H maior que 50% (Adaptado de Esteva et al.,2010).

Todas as imagens foram obtidas utilizando câmera digital Leica DFC295 HD acoplada a um microscópio e analisadas através do Las software em resolução máxima.

Análise estatística

Os dados categóricos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e analisados por meio do teste Exato de Fisher, e os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, expressos em forma de média \pm desvio padrão da média (dados paramétricos) e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Para a análise de sobrevida, foram utilizados os testes do qui-quadrado (avaliação de percentual de pacientes vivos).

Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 17.0, adotando uma confiança de 95%.

RESULTADOS

Perfil sociodemográfico e clínico dos pacientes com CCEO

A tabela 2 representa a distribuição dos casos de CCEOs na amostra estudada. Dentre os 76 casos de CCEOs analisados, a maioria deles acometeu assoalho bucal (46,1%) e língua (34,2%) em homens (65,8%), com idade até 60 anos (56,6%) e usuários de álcool e tabaco (67,1%). Além disso, a maioria dos casos de CCEOs encontrava-se em estadiamento clínico avançado (56,6% em estadiamento IV) e gradação histológica de malignidade moderada (85,5%). Esse perfil clínico é característico não somente do Brasil, mas também de países ocidentais e está relacionado ao grau de instrução e ao acesso a informações sobre a doença como, por exemplo, os fatores etiológicos envolvidos e a possibilidade do diagnóstico precoce por meio da prevenção.

A taxa de sobrevivência em cinco anos dos pacientes com CCEOs do presente estudo foi alta (86,8%). Esse prognóstico mais favorável pode ser reflexo das melhorias nas técnicas terapêuticas.

Análise de PTEN, PI3K, GSK3 β e S6K1 em regiões de tumor e perilesão

Inicialmente avaliou-se a localização celular das imunorexpressões de PTEN, PI3K, GSK3 β e S6K1. A imunorexpressão de PTEN e GSK-3 β foi observada no núcleo e no citoplasma das células, enquanto de PI3K ocorreu no citoplasma celular e de S6K1 no núcleo.

É possível observar maior ganho de PTEN no citoplasma celular em regiões de tumor e linfonodo em relação à região de perilesão (Tabela 3) ($p < 0,001$). Essas observações indicam que a imunorexpressão de PTEN pode ser regulada através da interação das células cancerígenas com o microambiente tumoral. O ganho ou a perda de PTEN em região nuclear não se mostrou diferente entre as diversas localizações (Tabela 3) ($p = 0,351$), o que mostra uma tentativa de PTEN em cumprir seu papel supressor tumoral até mesmo em estágios mais avançados do tumor.

Com relação ao GSK-3 β , sua marcação citoplasmática e nuclear está relacionada à maior agressividade dessa lesão. Embora haja muitos casos com alta regulação de PTEN e GSK3 β , a imunorexpressão dessas proteínas se deu de forma

heterogênea (Figura 1.A). A heterogeneidade é uma característica importante do fenótipo maligno e ressalta as diferenças na patogênese molecular dentro de um mesmo tumor.

Houve perda gradativa na expressão de PTEN e de GSK3 β nas áreas de perilesão (epitélio normal adjacente ao tumor), tumor e nas amostras com invasão linfonodal ($p < 0,001$ vs perilesão) (Figura 1.B-C; Figura 2. A-B), sugerindo que a perda dessas proteínas pode possuir significado no prognóstico da doença.

Houve maior ganho de PI3K nas amostras tumorais e com invasão linfonodal quando comparadas com as áreas de perilesão (Figura 2.E- F) (Tabela 3) ($p < 0,001$). Para a proteína S6K1, não foi observada diferença entre os grupos examinados (Figura 2.C-D) ($p = 0,999$).

Avaliação da sobrevida com as proteínas estudadas

Analisando a perda e o ganho de PTEN, PI3K, S6K1 e GSK3 β com as taxas de sobrevida dos pacientes em cinco anos, não foram observadas diferenças com relação às proteínas analisadas (Tabelas 4, 5 e 6). Esses dados sugerem que, no referido período de tempo estudado, o perfil de marcação parece não interferir diretamente no índice de mortalidade dos pacientes da amostra.

Correlação das proteínas entre si

Na tentativa de determinar as possíveis correlações entre as proteínas deste estudo no câncer oral, foi avaliada a imunexpressão das proteínas conforme a marcação da localização celular, buscando entender os mecanismos de ação entre elas. Evidenciou-se uma correlação direta fraca entre PTEN citoplasmático e PTEN nuclear, porém não se observou qualquer tipo de correções entre as demais proteínas estudadas.

DISCUSSÃO

No presente estudo, o perfil epidemiológico da amostra estudada demonstrou diferença entre os sexos para lesões de CCEO, sendo o sexo masculino o mais acometido (65,8%) dos casos, em conformidade com os estudos de Velmurugan et al., 2019¹⁹ e Kim et al., 2019²⁰. Isso se deve principalmente a hábitos nocivos como o tabagismo e etilismo, praticados, em sua maioria, por homens. Em relação à faixa etária, obteve-se uma maior

taxa (56,6%) de pacientes com até 60 anos de idade, corroborando com os trabalhos de Meier et al., 2018²¹ e Khattab et al., 2018²². No que diz respeito aos principais sítios anatômicos de localização das lesões de CCEO, observou-se que as regiões de assoalho bucal (46,1%) e língua (34,2%) foram as principais regiões acometidas, como nos estudos de Mehdi et al., 2019²³. Esse é o perfil clínico clássico dos pacientes acometidos de CCEO em conformidade com os dados do Brasil².

Com relação à gradação histológica, 85,5% dos casos foram classificados com carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado, achado semelhante nos trabalhos de Kim et al., 2019²⁰ e Velmurugan et al., 2019¹⁹, porém divergindo de Kumar et al., 2019, que encontraram uma maior porcentagem de casos de CCEO bem diferenciado. Com relação ao grau de estadiamento, 56,6% dos pacientes apresentavam estadiamento IV, corroborando com Kim et al., 2019²⁰, mas divergindo do trabalho de Cheng et al., 2019²⁴, no qual prevaleceu o grau de estadiamento I. É de fundamental importância o diagnóstico precoce dessas lesões, pois assim o grau de estadiamento tende a ser menor e a chance de cura ou aumento na taxa de sobrevivência do paciente aumenta consideravelmente, além de interferir diretamente na escolha das modalidades de tratamento.

Em relação à marcação imunoistoquímica, a maioria dos casos teve uma imunomarcação positiva para as proteínas PTEN, PI3K, S6K1 e GSK-3 β . Com relação à imunoposição de PTEN, observou-se um maior ganho dessa proteína em regiões de tumor e linfonodos comparado à perilesão. Esses achados divergem do estudo de Giudice Squarize, 2013⁹ e Jasphin et al., 2016²⁵, que verificaram um maior ganho dessa proteína em tecidos normais comparados a tecidos neoplásicos. Tal fato observado na presente pesquisa pode estar associado a mecanismos de inativação do gene *PTEN* por mecanismos epigenéticos como a hipermetilação do promotor desse gene²⁶. Apesar de haver uma alta expressão de PTEN, de forma geral, as áreas mais invasivas do parênquima tumoral exibiam perda da imunoposição de PTEN, podendo estar associada a seu papel de gene supressor tumoral, mesmo em casos em que a neoplasia já esteja estabelecida.

Alterações no *PTEN* podem estar associadas a estágios mais avançados da doença e à regulação de invasão e metástase de células tumorais. Como a via de sinalização PI3K/AKT/PTEN envolve muitas regulações negativas, como inibição da proliferação de células tumorais, apoptose e reparo do DNA, a inativação de PTEN pode afetar a eficiência da terapia antineoplásica, fazendo com que os constituintes da via

possam ser usados como marcadores de prognósticos e direcionar modalidades de tratamento para cada paciente^{25,27-28}.

Observou-se, também, maior ganho de GSK-3 β em região de tumor comparado com o tecido perilesional adjacente, resultado que corrobora com os estudos de Mishra et al., 2015²⁹ e Ren et al., 2018³⁰, em que o ganho dessa proteína foi significativamente maior em áreas de tecido normal. A imunexpressão de GSK-3 β em região citoplasmática e nuclear está relacionada a lesões mais agressivas. É interessante observar que áreas mais invasivas do tumor possuem uma maior imunexpressão de GSK3 β . Segundo Ren et al., 2018³⁰, também foi evidenciado que a imunomarcção dessa proteína não está relacionada ao estadiamento clínico, assim como a presente pesquisa, mas se correlaciona com a taxa global de sobrevida dos pacientes, na qual o ganho de GSK-3 β está associado a um pior prognóstico³⁰.

Com relação à imunexpressão de PI3K, trabalhos como o de CHEN et al., 2018³¹ obtiveram resultados similares ao presente estudo, no qual houve maior ganho dessa proteína em amostras de tecido neoplásico comparado à mucosa normal adjacente, o que indica ativação na via de sinalização PI3K/AKT/PTEN no câncer oral. Assim, esse marcador pode ser de fundamental importância para avaliação prognóstica de pacientes com neoplasias malignas.

No que diz respeito à marcação da proteína S6K1, não foi evidenciada diferença de marcação entre os três sítios avaliados, resultado que diverge de alguns estudos como os de Wu et al., 2018³² e Hsiao et al., 2016³³, que verificaram uma maior marcação de S6K1 em lesões malignas do que em tecido normal. Desse modo, ainda parece incerto o papel dessa proteína no processo de tumorigênese.

No presente trabalho, foi avaliada a relação entre os níveis de expressão das proteínas estudadas com parâmetros clínicos e histopatológicos, porém nenhuma associação foi observada (Tabelas 3, 4 e 5). Alguns trabalhos, como os de Mishra et al., 2015²⁹ e Wu et al., 2018³², encontraram associação significativa entre a expressão dessas proteínas com dados clínicos dos pacientes. Esses achados podem estar relacionados a outros eventos genéticos e/ou epigenéticos, bem como à heterogeneidade na imunexpressão dessas proteínas

Quando se avaliou a existência de correlações entre as proteínas estudadas, verificou-se associação entre a imonoexpressão de PTEN no citoplasma e no núcleo. Possivelmente a heterogeneidade intratumoral dos CCEOs como também eventos epigenéticos influenciam mutuamente o circuito interno do tumor, uma vez que há

subclones celulares distintos em fases distintas no seu interior, o que indica uma tentativa positiva, porém incipiente de translocar PTEN para o núcleo das células malignas e frear o processo de carcinogênese^{9,25}.

Conclusão

Como conclusão deste estudo, pôde-se inferir que a presença dessas proteínas podem estar envolvidas no processo de carcinogênese oral.

Referências

1. Pratesi N. et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the XRCC1 and RAD51 genes and clinical radiosensitivity in head and neck cancer. *Radiotherapy Oncology* 2011; 99 (3): 356-61.
2. Brasil. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa para 2018.
3. Wolff K, Follman M, Nast A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Deutsches Ärzteblatt International* 2012; 109 (48): 829-35.
4. Hema KN. et al. Epigenética no carcinoma epidermóide oral. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 2017; 21 (2): 252-9.
5. Riedel F, Goessler UR, Hormann K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Digestive Diseases* 2005; 23: 195-203.
6. Hunter; Parkinson; Thakker. An overview of the molecular pathology of head and neck cancer, and its clinical implications. *Journal of Periodontology* 2000; 57 (1): 132-49.
7. LIU X. et al. The etiologic spectrum of head and neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oncotarget* 2016; 7 (40): 2016.
8. Molinolo AA. et al. mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. *Clinical Cancer Research* 2012; 18 (9): 2558-68.
9. Giudice FS, Squarize CH. The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. *J Carcinog Mutagen* 2013.
10. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation, and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* 2015; 15 (1): 7–24.
11. Griffith, CC et al. PIK3CA mutations and PTEN loss in salivary duct carcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology* 2013; 37 (8): 1201-7.
12. Porta PC, Paglino C, Mosca A. targeting PI3K/AKT/mtor signaling in cancer. *Frontiers oncology* 2014; (4): 64-75.
13. Broek RV, Mohan S, Eytan DF, Chen Z, Waees CW. The PI3K/Akt/mTOR axis in head and neck cancer: functions, aberrations, cross-talk, and therapies. *Oral Diseases* 2015; 21: 815–825.
14. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K pathway in human disease. *Cell*. 2017 August 10; 170 (4): 605–635.
15. Snietura M, Jaworska M, Mlynarczyk-Liszka J, Goraj-Zajac A, Piglowski W, Lange D, et al. PTEN as a prognostic and predictive marker in postoperative radiotherapy for squamous cell cancer of the head and neck. *PLoS One* 2012;

7:e33396.

16. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, WHO Classification of Head and Neck Tumours (4th edition). IARC: Lyon, 2017.
17. Chaves FN, Bezerra T, de Barros Silva PG, et al. Evaluation of the p-AKT, p-JNK and FoxO3a function in oral epithelial dysplasia. *Oral Dis.* 2017; 23 (3): 367-378.
18. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K Status Association with Trastuzumab Response and Survival in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *AJP* 2010; 177 (4).
19. Velmurugam VK, Wang HK, Chung CM, Lee CH, Huang LR, Yeh KT, et al. CIP2A overexpression in Taiwanese oral cancer patients. *Cancer Management and Research.*
20. Kim DW, Lee S, Kwon S, Nam W, Cha IH, Kim HJ. Deep learning-based survival prediction of oral cancer patients. *Scientific Reports* 2019; 9: 6994.
21. Meier JK, Schuderer JG, Zeman F, Klingelhöffer CH, Hullmann M, Spanier G, et al. Health-related quality of life: a retrospective study on local vs. Microvascular reconstruction in patients with oral cancer. *BMC oral health* 2019: 19-62.
22. Khattab NMA, Elheeny AAH, Tonu GA. Oral-cancer knowledge, practice, and attitude assessment of dentists in Upper Egypt: A cross-sectional study. *Clin Exp Dent Res.* 2019; 5: 121–127.
23. Mehdi RF, Sheikh F, Khan R, Fawad B, Haq AU. *Asian Pac J Cancer Prev*, 20 (4): 1289-1293.
24. Cheng Z, Shao X, Xu M, Wang J, Kuai X, Zhang L, et al. A promotes proliferation and migration abilities via regulation of the HER2/AKT-independent mTOR/S6K1 pathway in colorectal cancer. *Oncology Reports* 2019; 41: 2717-2728.
25. Jasphin SSR, Desai D, Pandit S, Gonçalves NM, Nayak PB, Iype A. Immunohistochemical expression of phosphatase and tensin homolog in histologic gradings of oral squamous cell carcinoma. *Contemp Clin Dent* 2016; 7: 524-8.
26. 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. *Tumor Biol* 2016; 37: 7625–7632.
27. Angadi PV, Krishnapillai R. Evaluation of PTEN immunoexpression in oral submucous fibrosis: Role in pathogenesis and malignant transformation. *Head Neck Pathol* 2012; 6: 314-21.
28. Alyasiri NS, Mehdi SJ, Alam MS, Ali A, Mandal AK, *Gupta S, et al.* PTEN-mediated AKT activation contributes to the reduced apoptosis among Indian oral squamous cell carcinoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138: 103-9.

29. Mishra R, Nagini S, Rana A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. *Molecular Cancer* 2015; 14: 20.
30. Ren J, Liu T, Han Y, Wang Q, Chen Y, Li G, et al. GSK-3 β inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in non-small cell lung cancer. *Diagnostic Pathology* 2018; 13: 33.
31. Cheng Z, Shao X, Xu M, Wang J, Kuai X, Zhang L, et al. A promotes proliferation and migration abilities via regulation of the HER2/AKT-independent mTOR/S6K1 pathway in colorectal cancer. *Oncology Reports* 2019; 41: 2717-2728.
32. Wu N, Du Z, Zhu Y, Song Y, Pang L, Chen Z. The Expression and prognostic Impact of the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Technology in Cancer Research & Treatment* 2018, 17: 1–9.
33. Hsiao YH, Huang YT, Hung CY, Kuo TC, Luo FJ, Yan TC. PYK2 via S6K1 regulates the function of androgen receptors and the growth of prostate cancer cells. *Endocrine-Related Cancer* 2016; 23: 651–663.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados na reação imunoistoquímica

<i>Anticorpo</i>	<i>Clone</i>	<i>Tempo de Incubação</i>	<i>Origem</i>	<i>Diluição</i>	<i>Fabricante</i>
Anti-PTEN	ab31392	overnight	Monoclonal de coelho	1:400	Abcam
Anti-PI3K	ab86714	overnight	Monoclonal de rato	1:400	Abcam
Anti-P-GSK-3 β	Ab75745	overnight	Policlonal de coelho	1:100	Abcam
Anti-P-S6K1	Ab60948	overnight	Policlonal de coelho	1:200	Abcam

Tabela 2: Perfil sociodemográfico e clínico da amostra

	n	%
Total	76	100,0
Localização		
Assoalho bucal	35	46,1
Língua	26	34,2
Outros	15	19,7
Graduação histológica		
Bem diferenciado	6	7,9
Moderadamente diferenciado	65	85,5
Pobremente diferenciado	5	6,6
Estadiamento		
I	3	3,9
II	13	17,1
III	17	22,4
IV	43	56,6
Sexo		
Masculino	50	65,8
Feminino	26	34,2
Hábitos		
Fuma	30	39,5
Fuma e bebe	21	27,6
Não fuma/bebe	25	32,9
Idade		
Até 60 anos	43	56,6
Mais de 60 anos	33	43,4
Sobrevida em 5 anos		
Vivo	66	86,8
Morto	10	13,2

Tabela 3: Imunoexpressão das proteínas em diferentes sítios

	Tecido						p-Valor
	Perilesão		Tumor		Linfonodo		
PTEN							
Citoplasma	4	7,4%	46*	74,2%	16*	69,6%	<0,001
Núcleo	11	20,4%	20	32,3%	6	26,1%	0,351
PI3K							
	17	32,1%	47*	77,0%	12*	54,5%	<0,001
S6K1							
	42	85,7%	53	85,5%	18	85,7%	0,999
GSK 3 beta							
	3	6,1%	27*	44,3%	8*	33,3%	<0,001

*p<0,05 versus Perilesão; †p<0,05 versus Tumor, teste qui-quadrado de Pearson (n, %)

Tabela 4: Imunoexpressão de PI3K e S6K1 e perfil clínico e histológico na amostra estudada

	PI3K			p-Valor	S6K1					
	Negativo	Positivo			Negativo	Positivo	p-Valor			
Localização										
Assoalho bucal	5	35,7%	21	44,7%	0,433	3	33,3%	22	41,5%	0,225
Língua	4	28,6%	17	36,2%		2	22,2%	21	39,6%	
Outros	5	35,7%	9	19,1%		4	44,4%	10	18,9%	
Graduação histológica										
Bem/Mod. diferenciado	14	100,0%	42	89,4%	0,203	9	100,0%	49	92,5%	0,394
Pobremente diferenciado	0	0,0%	5	10,6%		0	0,0%			
Estadiamento										
Estadiamento 1 e 2	1	7,1%	11	23,4%	0,179	1	11,1%	12	22,6%	0,432
Estadiamento 3 e 4	13	92,9%	36	76,6%		8	88,9%	41	77,4%	
Sexo										
Masculino	9	64,3%	32	68,1%	0,790	5	55,6%	35	66,0%	0,543
Feminino	5	35,7%	15	31,9%		4	44,4%	18	34,0%	
Hábitos										
Fuma	7	50,0%	21	44,7%	0,676	4	44,4%	25	47,2%	0,527
Fuma e bebe	2	14,3%	12	25,5%		1	11,1%	13	24,5%	
Não fuma/bebe	5	35,7%	14	29,8%		4	44,4%	15	28,3%	
Idade 60										
Até 60 anos	7	50,0%	29	61,7%	0,435	5	55,6%	32	60,4%	0,785
Mais de 60 anos	7	50,0%	18	38,3%		4	44,4%	21	39,6%	
Sobrevida em 5 anos										
Vivo	13	92,9%	43	91,5%	0,870	9	100,0%	48	90,6%	0,337
Morto	1	7,1%	4	8,5%		0	0,0%	5	9,4%	

*p<0,05 teste qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher (n, %)

Tabela 5: Imunoexpressão de GSK-3 β e perfil clínico e histológico da amostra estudada

	GSK 3 beta				p-Valor
	Negativo		Positivo		
Localização					
Assoalho bucal	16	47,1%	9	33,3%	0,524
Língua	12	35,3%	11	40,7%	
Outros	6	17,6%	7	25,9%	
Graduação histológica					
Bem/Mod. diferenciado	33	97,1%	24	88,9%	0,200
Pobremente diferenciado	1	2,9%	3	11,1%	
Estadiamento					
Estadiamento 1 e 2	7	20,6%	6	22,2%	0,877
Estadiamento 3 e 4	27	79,4%	21	77,8%	
Sexo					
Masculino	21	61,8%	19	70,4%	0,482
Feminino	13	38,2%	8	29,6%	
Hábitos					
Fuma	15	44,1%	14	51,9%	0,729
Fuma e bebe	7	20,6%	6	22,2%	
Não fuma/bebe	12	35,3%	7	25,9%	
Idade 60					
Até 60 anos	22	64,7%	14	51,9%	0,311
Mais de 60 anos	12	35,3%	13	48,1%	
Sobrevida em 5 anos					
Vivo	30	88,2%	26	96,3%	0,254
Morto	4	11,8%	1	3,7%	

*p<0,05 teste qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher (n, %)

Tabela 6: Imunoexpressão de PTEN conforme localização celular e perfil clínico e histológico

*p<0,05 teste qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher (n, %)

	PTEN citoplasma			PTEN núcleo		
	Negativo	Positivo	p-Valor	Negativo	Positivo	p-Valor
Localização						
Assoalho bucal	8 50,0%	19 41,3%	0,683	19 45,2%	8 40,0%	0,248
Língua	4 25,0%	17 37,0%		16 38,1%	5 25,0%	
Outros	4 25,0%	10 21,7%		7 16,7%	7 35,0%	
Graduação histológica						
Bem/Mod. diferenciado	15 93,8%	43 93,5%	0,970	39 92,9%	19 95,0%	0,748
Pobremente diferenciado	1 6,3%	3 6,5%		3 7,1%	1 5,0%	
Estadiamento						
Estadiamento 1 e 2	5 31,3%	7 15,2%	0,162	9 21,4%	3 15,0%	0,549
Estadiamento 3 e 4	11 68,8%	39 84,8%		33 78,6%	17 85,0%	
Hábitos						
Fuma	9 56,3%	20 43,5%	0,434	19 45,2%	10 50,0%	0,865
Fuma e bebe	2 12,5%	13 28,3%		11 26,2%	4 20,0%	
Não fuma/bebe	5 31,3%	13 28,3%		12 28,6%	6 30,0%	
Idade 60						
Até 60 anos	7 43,8%	29 63,0%	0,178	24 57,1%	12 60,0%	0,831
Mais de 60 anos	9 56,3%	17 37,0%		18 42,9%	8 40,0%	
Sobrevida em 5 anos						
Vivo	13 81,3%	44 95,7%	0,068	38 90,5%	19 95,0%	0,541
Morto	3 18,8%	2 4,3%		4 9,5%	1 5,0%	

Tabela 7: Correlação entre as proteínas estudadas

	Histoscores (0-12)				
	PTEN citoplasma	PTEN núcleo	PI3K	S6K1	GSK 3beta
PTEN citoplasma					
r	-	0,324*	0,195	0,143	0,217
p	-	0,010	0,136	0,275	0,102
PTEN núcleo					
r	-	-	0,187	0,140	0,080
p	-	-	0,152	0,287	0,549
PI3K					
r	-	-	-	0,209	0,015
p	-	-	-	0,112	0,909
S6K1					
r	-	-	-	-	0,008
p	-	-	-	-	0,954
GSK 3beta					
r	-	-	-	-	-
p	-	-	-	-	-

p<0,05, correlação de Spearman

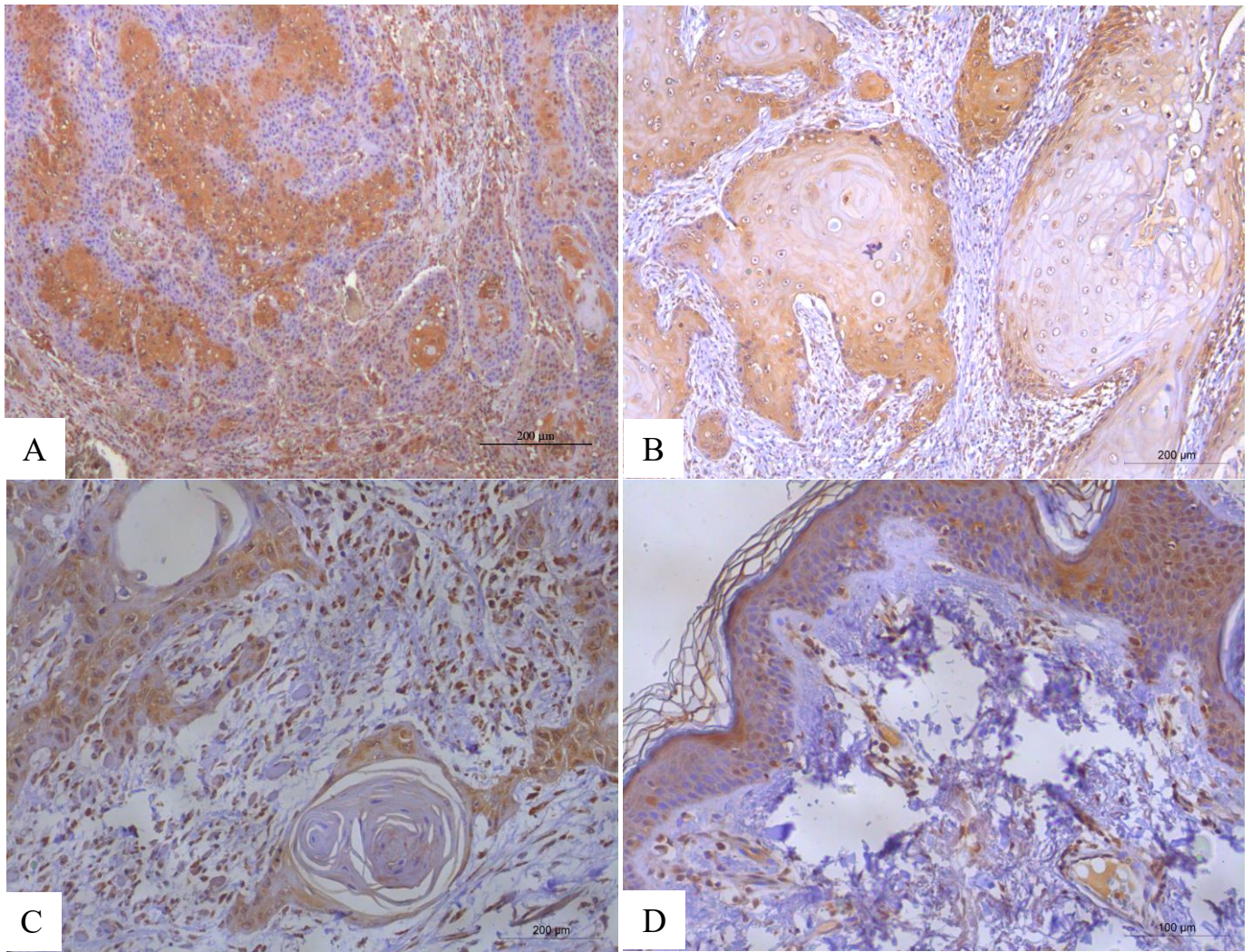


Figura 1. A) Fotomicrografia exibindo heterogeneidade na marcação de PTEN em CCEO (LSAB, 200x). B) Fotomicrografia evidenciando ganho de PTEN em CCEO (LSAB, 200x). C) Fotomicrografia evidenciando perda de PTEN em CCEO (LSAB, 200x). D) Fotomicrografia evidenciando ganho de PTEN em perilesão (LSAB, 100x).

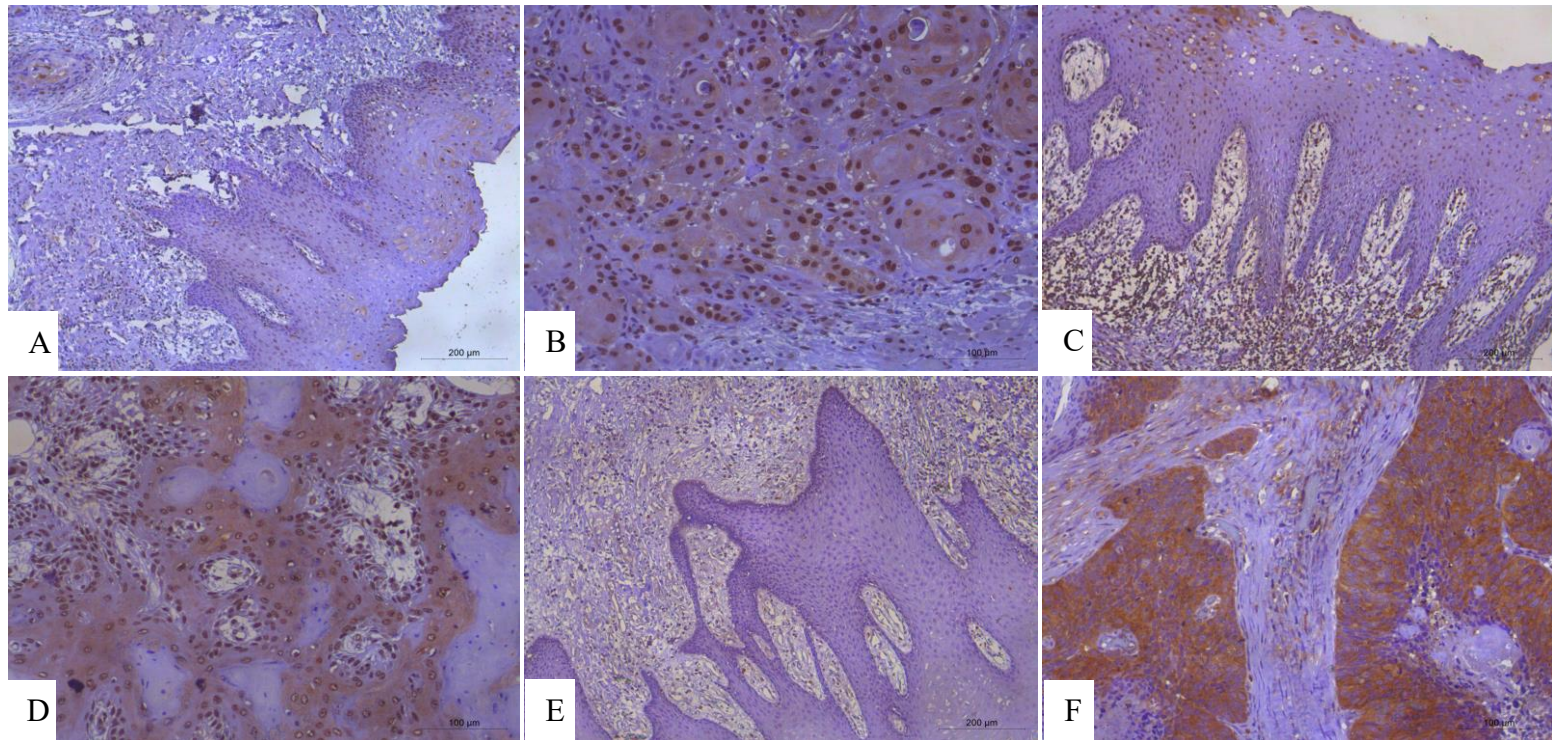


Figura 2. **A)** Fotomicrografia evidenciando perda de GSK-3 β em perilesão (LSAB, 200x). **B)** Fotomicrografia evidenciando ganho de GSK-3 β em CCEO (LSAB, 100x). **C)** Fotomicrografia evidenciando ganho de S6K1 em perilesão (LSAB, 200x). **D)** Fotomicrografia evidenciando ganho de S6K1 em CCEO (LSAB, 100x). **E)** Fotomicrografia evidenciando perda de PI3K em perilesão (LSAB, 200x). **F)** Fotomicrografia evidenciando ganho de PI3K em CCEO (LSAB, 100x).

ANEXO 1

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: ANÁLISE IMUNOMOLECULAR DE PTEN ASSOCIADO À VIA AKT/mTOR EM DISPLASIAS EPITELIAIS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS

Pesquisador: EALBER CARVALHO MACEDO LUNA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22310819.6.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.728.390

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 27 de Novembro de 2019

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

CONCLUSÃO GERAL

Na presente tese, por meio de uma revisão sistemática com metanálise, observou-se um maior percentual de metilação do gene *PTEN* em neoplasias malignas, comparando com tecidos não neoplásicos (normais). Dessa forma, sugere-se que a hipermetilação do promotor desse gene pode servir como importante marcador de prognóstico e diagnóstico para essas lesões.

Com relação à imunexpressão de *PTEN*, *PI3K*, *S6K1* e *GSK-3 β* , observaram-se diferenças de marcação dessas proteínas em diferentes sítios (tumor, perilesão e linfonodo metastático), o que sugere uma possível participação dessas proteínas no processo de carcinogênese oral.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-NUNEZ, F. *et al.* PTEN Promoter Methylation in Sporadic Thyroid Carcinomas. **Thyroid**. v. 16, n. 1, 2006.
- ALYASIRI, N. S. *et al.* PTEN-mediated AKT activation contributes to the reduced apoptosis among Indian oral squamous cell carcinoma patients. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v.138, n.1, p.103-9, 2012.
- ANGADI, P.V.; KRISHNAPILLAI, R. Evaluation of PTEN Immunoexpression in Oral Submucous Fibrosis: Role in Pathogenesis and Malignant Transformation. **Head Neck Pathol.**, v.6, n.3, p.314-21, 2012.
- ARANTES, D. A. *et al.* Overexpression of immunosuppressive cytokines is associated with poorer clinical stage of oral squamous cell carcinoma. **Archives of Oral Biology**, n.61, p.28-35, 2016.
- BAREKATI, B. *et al.* Methylation signature of lymph node metastases in breast cancer patients. **BMC Cancer**, v.12, 2012.
- BATISTA, A. C. *et al.* Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.109, p.74-9, 2010.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - Biological and translational implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 726-734, 2011.
- CHEN, Q. *et al.* Homozygous deletion of PTEN tumor suppressor gene is not a feature of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v.36, n.1, p.95-99, 2000.
- CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma - an update. **CA Cancer J Clin.**, v.65, n.5, p.401-21, 2015.
- CLAUDITZ, T. S. *et al.* Abundant expression of mTOR kinase in salivary gland tumors - potentials as therapy target? **J Oral Pathol Med.**, v.42, n.10, p.769-773, 2013.
- COHEN, Y. *et al.* Mutational analysis of PTEN/PIK3CA/AKT pathway in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v.47, n.10, p. 946-950, 2011.
- CUEVAS GONZALEZ, J. C. *et al.* p53 and p16 in oral epithelial dysplasia and oralsquamous cell carcinoma: A study of 208 cases. **Indian J Pathol Microbiol.**, v. 59, n. 2, p. 153-8, Apr-Jun 2016. ISSN 0377-4929.
- DRAGOJ, M. *et al.* Association of CCND1 overexpression with KRAS and PTEN alterations in specific subtypes of non-small cell lung carcinoma and its influence on patients' outcome. **Tumor Biol.**, 2015.

- DOWLING, R. J. *et al.* mTORC1- mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. **Science.**, v.328, n.5982, p.1172–1176, 2010.
- DUCASSE, M.; BROWN, M. A. Epigenetic aberrations and cancer. **Molecular Cancer**, v.8, n.5, p. 60, 2006.
- EL NAGGAR, A. K. *et al.* **WHO Classification of Head and Neck Tumours (4th edition)**. IARC: Lyon, 2017.
- ESTELLER, M. The coming of age of DNA methylation in medicine in the genomics and postgenomics era. **Clinical Immunology**, v.102, n.3, p.2013-6, 2002.
- FERREIRA, A. M. *et al.* Prevalence and factors associated with oral potentially malignant disorders in Brazil's rural workers. **Oral diseases**, v.22, n.6, p.536-42, 2016.
- GAETTI-JARDIM, E. C. *et al.* Carcinoma de células escamosas de grandes dimensões. **Rev Odont Araçatuba**, v.31, n.2, p.09-13, 2010.
- GAO, W. *et al.* mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer. **ISRN Otolaryngol**. doi: 10.5402/2012/953089, 2012.
- GIUDICE, F. S.; SQUARIZE, C. H. The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. **J Carcinog Mutagen**. Suppl 5, 2014.
- GOEL, A. *et al.* The CpG Island Methylator Phenotype and chromosomal Instability Are Inversely Correlated in Sporadic Colorectal Cancer. **Gastroenterology** v.132, n.1, 2007.
- GONÇALVES, M. D. *et al.* Phosphatidylinositol 3-Kinase, Growth Disorders, and Cancer. **N engl j med.**, v.21, n.379, p.2052-62, 2018.
- GRIFFITH, C. C. *et al.* PIK3CA mutations and PTEN loss in salivary duct carcinomas. **Am J Surg Pathol.**, v.37, n.8, p.1201-1207, 2013.
- HEMA, K. N. *et al.* Epigenética no carcinoma epidermoide oral. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v.2, n.21, p.252-9, 2017.
- HINO, R. *et al.* Activation of DNA Methyltransferase 1 by EBV Latent Membrane Protein 2A Leads to Promoter Hypermethylation of PTEN Gene in Gastric Carcinoma. **Cancer Res.**, v.69, n.7, 2009.
- HO, C. M. *et al.* PTEN promoter methylation and LOH of 10q22–23 locus in PTEN expression of ovarian clear cell adenocarcinomas. **Gynecologic Oncology**, v.112, 2009.
- HOU, P.; JI, M.; XING, M. Association of PTEN Gene Methylation With Genetic Alterations in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signaling Pathway in Thyroid Tumors. **American Cancer Society**, 2008.
- HUANG, B. X. *et al.* Phosphatidylserine is a critical modulator for Akt activation. **J**

Cell Biol., v.192, n.6, p.979-992, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018.

ISSA, M. E. *et al.* Epigenetic strategies to reverse drug resistance in heterogeneous multiple myeloma. **Clinical Epigenetics**, n.9, p.17, 2017.

JOHNSON, N. W.; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A. A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. **Journal of Periodontology**, v.57, n.1, p.19-37, 2011.

JOUALI, F. *et al.* Detection of PIK3/AKT pathway in Moroccan population with triple negative breast cancer. **BMC Cancer**, v.18, 2018.

KHANG, W. H; LEE, W. S; KIM, W. H. Promoter Methylation and Silencing of PTEN in Gastric Carcinoma. **Laboratory Investigation**, v.82, n.3, 2002.

KHAN, S. *et al.* PTEN PROMOTER IS METHYLATED IN A PROPORTION OF INVASIVE BREAST CANCERS. **Int. J. Cancer**, v.112, 2004.

KHAN, S. S. *et al.* Epigenetics in oral cancer- neoteric biomarker. **Oral Surgery, Journal Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v.2, p.62-5, 2016.

KIM, D. S. *et al.* Infrequent hypermethylation of the PTEN gene in Korean non-small-cell lung cancers. **Cancer Sci**, v.101, n.2, 2010.

KUNZE, E; WENDT, M; SCHOTT, T. Promoter hypermethylation of the 14-3-3 \hat{U} , SYK and CAGE-1 genes is related to the various phenotypes of urinary bladder carcinomas and associated with progression of transitional cell carcinomas. **International Journal Of Molecular Medicine**. v.18, p.547-557, 2006.

KURASAWA, Y. *et al.* PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma. **ONCOLOGY REPORTS**, v.19, 2008.

LI, J. *et al.* Aberrant CpG island methylation of PTEN is an early event in nasopharyngeal carcinoma and a potential diagnostic biomarker. **ONCOLOGY REPORTS**, v.31, 2014.

LU, X. *et al.* Promoter methylation status of PTEN, SYK and survivin genes in breast cancer tissues derived from Chinese women. **Asian Biomedicine**, v.3, n.6, 2009.

LUO, S. *et al.* The association of PTEN hypermethylation and breast cancer: a meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, p.9, 2016.

LIN, P. C. *et al.* A comprehensive analysis of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) loss in colorectal cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v.13, n.186, 2015.

LIU, X. *et al.* The etiologic spectrum of head and neck squamous cell carcinoma in young patients. **Oncotarget.**, Epub ahead of print, 2016.

- MAGNUSON, B.; EKIM, B.; FINGAR, D. C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. **Biochem J.**, v.441, n.1, p.1-21, 2012.
- MAIA, H. C. *et al.* Potentially malignant oral lesions: clinicopathological correlations. **Einstein**, v.1, n.14, p.35-40, 2016.
- MASUNAGA, A. *et al.* Expression of PTEN and its pseudogene PTENP1, and promoter methylation of PTEN in non-tumourous thymus and thymic tumours. **J Clin Pathol.**, 2017.
- MARTINS, F. *et al.* PI3K-AKT-mTOR pathway proteins are differently expressed in oral carcinogenesis. **J Oral Pathol Med.**, v.5, p.1-7, 2016.
- MISHRA, R. *et al.* Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. **Molecular Cancer**, v.14, n.20, 2015.
- MOLINOLO, A. A. *et al.* mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. **Clin Cancer Res.**, v.18, n.9, p.2558–2568, 2012.
- MUGGERUD, A. *et al.* R Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOXC1, PPP2R2B and *PTEN* in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer. **Breast Cancer Research**, v.12, 2010.
- MULLER, H. R.; PRADO, K. B. Epigenética: um novo campo da genética. **RUBS**, v.1, n.3, p.61-69, 2008.
- MUKOHARA, Toru. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. **Breast Cancer** (Dove Med Press). v.7, p.111-123, 2015.
- MURAO, K. *et al.* Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. **British Journal of Dermatology**, v.155, 2006.
- NEVILLE, B. W. *et al.* Patologia Oral & Maxilofacial. 3. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2016.
- OGBUREKE, K. U. E. *et al.* Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. **Oral Oncol.**, v.43, n.9, p.920-32, 2007.
- PADDOCK, M. N. *et al.* Treating cancer with phosphatidylinositol-3-kinase inhibitors: increasing efficacy and overcoming resistance. **Journal of Lipid Research**, 2018.
- PAN, Q. F. *et al.* PTEN hypermethylation profiles of Chinese Kazakh patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Diseases of the Esophagus**, v.27, 2014.

PENG, H. *et al.* Higher methylation intensity induced by EBV LMP1 via NF- κ B/DNMT3b signaling contributes to silencing of PTEN gene. **Oncotarget**, v.7, n.26, 2016.

PINHEIRO, S. M. S.; CARDOSO, P. J.; PRADO, F. O. Conhecimentos e Diagnóstico em Câncer Bucal entre Profissionais de Odontologia de Jequié, Bahia. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.56, n.2, p.195-205, 2010.

PIRES, F. R. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. **J Appl Oral Sci**, v.21, n.5, p. 460-7, 2013.

PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. **Front Oncol**. doi: 10.3389/fonc.2014.00064, 2014.

PRATESI, N. *et al.* Association between single nucleotide polymorphisms in the XRCC1 and RAD51 genes and clinical radiosensitivity in head and neck cancer. **Radiother Oncol.**, v.99, n.3, p.356-61, 2011.

REN, J. *et al.* GSK-3 β inhibits autophagy and enhances radiosensitivity in non-small cell lung cancer. **Diagnostic Pathology**, v.13, n.33, 2018.

RIZVI, M. M. A. *et al.* Aberrant promoter methylation and inactivation of PTEN gene in cervical carcinoma from Indian population. **J Cancer Res Clin Oncol**. v.137, 2011.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nature Reviews Genetics**, v.6, n.8, p.597-610, 2005.

SALVESEN, H. B. *et al.* Pten methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. **Int. J. Cancer**. v.91, 2001.

SAQUED, V.; ISAR, N.; MANOOCHEHR, T. Association of sporadic breast cancer with PTEN/MMAC1/TEP1 promoter hypermethylation. **Med Oncol.**, v.28, 2011.

SCHAGDARSURENGIN, U. *et al.* Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. **Oncogene**. v.22, 2003.

SCULLY, C. *et al.* Oral cancer: evidence for sexual transmission. **Br.Dent.J**, v.144, n.4, p-203-7, 2005.

SHETTY, P. J. *et al.* Altered transcription and expression of PTEN in breast tumors: Is it regulated by hypermethylation? **Breast Disease**. v.33, 2011/2012.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v.66, n.1, p.38-42, 2014.

SIMPSON, L.; PARSONS, R. PTEN: life as a tumor suppressor. **Exp Cell Res.**, v.264, n.1, p.29-41, 2001.

- SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **J Cell Mol Med.**, v.9, n.1, p.59-71, 2005.
- SORIA, J. C. *et al.* Lack of PTEN Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Could Be Related to Promoter Methylation. **Clinical Cancer Research.** v.8, 2002.
- SNIETURA, M. *et al.* PTEN as a Prognostic and Predictive Marker in Postoperative Radiotherapy for Squamous Cell Cancer of the Head and Neck. **Plos One.**, v.7, n.3, p.e33396, 2012.
- SQUARIZE, C. H. *et al.* Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. **J Oral Pathol Med.**, v. 31, p.379–84, 2002.
- SRIRRAKSA, R. *et al.* CpG-island methylation study of liver fluke-related cholangiocarcinoma. **British Journal of Cancer**, v.104, 2011.
- STANKOVIC, T. *et al.* Comparative analyses of individual and multiple alterations of p53, PTEN and p16 in non-small cell lung carcinoma, glioma and breast carcinoma samples. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2014.
- SUSHMA, P. S. *et al.* PTEN and p16 genes as epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on south Indian population. **Tumor Biol.**, 2015.
- YANG, H. J. *et al.* Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data. **BMC Cancer**, v.6, 2006.
- VADLAKONDA, L. *et al.* The paradox of akt-mtor interactions. **Frontiers in oncology**, n.3, p.165, 2013.
- WANG, S.; SHENG, Z.; XIANJIE, C. Promotion of PTEN on apoptosis through PI3K/Akt signal in vascular smooth muscle cells of mice model of coronary heart disease. **J Cell Biochem.**, p.1-9, 2019.
- WOLFF, K.; FOLLMAN, M.; NAST, A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. **Dtsch Arztebl Int**, v.109, n.48, p.829-35, 2012.
- WON, H.S. *et al.* Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v.48, n.10, p.98590, 2012.
- YARI, K.; PAYANDEH, M.; RAHIMI, Z. Association of the hypermethylation status of PTEN tumor suppressor gene with the risk of breast cancer among Kurdish population from Western Iran. **Tumor Biol.**, 2015.
- YAZDANI, Y. *et al.* The prognostic effect of PTEN expression. status in colorectal cancer development and evaluation of factors affecting it: miR-21 and promoter methylation. **Journal of Biomedical Science**, v.23, 2016.

YU, J. *et al.* Telomerase reverse transcriptase regulates DNMT3B expression/aberrant DNA methylation phenotype and AKT activation in hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters**, 2018.

ZHANG, H. Y. *et al.* *PTEN* mutation, methylation and expression in breast cancer patients. **Oncology Letters**, v.6, 2013.

ZHANG, Q. *et al.* Expression of the PTEN/FOXO3a/PLZF signalling pathway in pancreatic cancer and its significance in tumourigenesis and progression. **Investigational New Drugs**, 2019.

ANEXO: REGIMENTO INTERNO

Art. 46 – As dissertações e as teses apresentadas ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará poderão ser produzidas em formato alternativo ou tradicional. O formato alternativo estabelece: a critério do orientador e com a aprovação da Coordenação do Programa, que os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou co-autoria do candidato, publicados ou submetidos para

11

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

publicação em revistas científicas, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§1º - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

§2º - A dissertação e a tese em formatos tradicionais ou formatos alternativos deverão seguir as normas preconizadas pelo Guia para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Biblioteca Universitária disponível no site <http://www.biblioteca.ufc.br>. As partes específicas do formato alternativo deverão ser feitas em concordância com o Manual de Normalização para Defesa de dissertação de Mestrado e tese de Doutorado no formato Alternativo do PPGO, disponível no site <http://www.ppgp.ufc.br>.

**JOURNAL OF
ORAL PATHOLOGY & MEDICINE****iii. Systematic Reviews**

A systematic review is a comprehensive high-level summary of primary research on a specific research question that attempts to identify, select, synthesise and appraise all (high-quality) evidence relevant to that question. A meta-analysis uses statistical methods to quantitatively evaluate pooled data from single studies. Many pathological reviews are likely not to have sufficient data on clinical outcomes to warrant a meta-analysis. While the content of a systematic review will be partly determined by the topic and evidence, as a minimum the review should:

Clearly state the purpose of the review

Determine inclusion and exclusion criteria to generate a PRISMA flowchart that includes identification of studies, screening, eligibility and inclusion data (See Liberati A, Altman DG, Tetzlafi J et al, The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ* 2009; 339: b2700)

Determine the primary end point of the review ie. acceptance or rejection of the null hypothesis

Clearly describe the search methodology [databases (preferably more than one), search terms]

Describe the process of data extraction

Undertake statistical assimilation if appropriate

Evaluate the quality and/or risk of bias of the studies included preferably using a standard assessment tool (See Guyatt, GH, Oxman AD, Vist GE et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2008; 336: 924-926)

Provide recommendations for future researches

Word limit: 3,000 words maximum, excluding abstract and references.

Abstract: 250 words maximum. Should not contain abbreviations. Please choose headings appropriate for the article.

References: Maximum of 50 references.

Figures/Tables: Total of no more than 6 figures and/or tables.

Main Text must comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Systematic reviews must be registered in the **PROSPERO** (International Prospective Register of Systematic Reviews) database and the registration number provided in the text.

NORMAS DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS À *ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY*

GUIDE FOR AUTHORS

Editors-in-Chief:

Professor G B Proctor, London, UK

Professor S W Cadden, Dundee, Scotland

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- salivary biology
- mastication and swallowing
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will consider clinical papers only where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#)

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check all relevant sections in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts (where applicable)

Highlights (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

AUTHOR INFORMATION PACK 12 Jun 2019 www.elsevier.com/locate/anchorlabio 5

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#)

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places:

1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted.
2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication'

section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article is likely to be checked by the originality detection service CrossCheck.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#).

Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

AUTHOR INFORMATION PACK 12 Jun 2019 www.elsevier.com/locate/archoralbio 6

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Contributors

If there are four or more authors, then each is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that "All authors have read and approved the final article" should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

AUTHOR INFORMATION PACK 12 Jun 2019 www.elsevier.com/locate/archoralbio 7

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2700**, excluding taxes. Learn more about

Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information.

Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes

suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

AUTHOR INFORMATION PACK 12 Jun 2019 www.elsevier.com/locate/archoralbio 8

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To minimize unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above *Results or Findings*

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

AUTHOR INFORMATION PACK 12 Jun 2019 www.elsevier.com/locate/archorallbio 9

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.
Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author

actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may

be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DEAEcellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible.

AUTHOR INFORMATION PACK 12 Jun 2019 www.elsevier.com/locate/archoralbio
10

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy];

the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the

names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly.

For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

AUTHOR INFORMATION PACK 12 Jun 2019 www.elsevier.com/locate/archoralbio
11

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes

below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological

Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be [ordered online](#) or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article.

Journal of Scientific Communications, 163, 51–59.
<https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

AUTHOR INFORMATION PACK 12 Jun 2019 www.elsevier.com/locate/archoralbio
 12

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article.

Heliyon, 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S.

Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing

Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003).
<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1.
<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3:

Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales.

Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies,

New York, NY.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article.

When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#) . For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission.

This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")

