



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

MARISOL MIRANDA GALVIS

**CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS E EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS REGULADORAS DO CICLO CELULAR E INVASÃO
LOCAL NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL EM
PACIENTES JOVENS**

**CLINICOPATHOLOGICAL FEATUTERS AND EXPRESSION OF
REGULATORY PROTEINS OF CELL CYCLE AND LOCAL INVASION
IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA AFFECTING YOUNG
PATIENTS**

Piracicaba

2016

MARISOL MIRANDA GALVIS

**CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS E EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS REGULADORAS DO CICLO CELULAR E INVASÃO LOCAL
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL EM PACIENTES
JOVENS**

**CLINICOPATHOLOGICAL FEATURES AND EXPRESSION OF
REGULATORY PROTEINS OF CELL CYCLE AND LOCAL INVASION
IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN YOUNG PATIENTS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Estomatopatologia, na Área de concentração de Patologia.

Dissertation presented to Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Oral Medicine and Oral Pathology, in Pathology area.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MARISOL
MIRANDA GALVIS E ORIENTADA PELO
PROF. DR. LUIZ PAULO KOWALSKI.

Piracicaba

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 758/2012

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

M672c Miranda-Galvis, Marisol, 1989-
Características clínico-patológicas e expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular e invasão local no carcinoma de células escamosas oral em pacientes jovens / Marisol Miranda Galvis. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Luiz Paulo Kowalski.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Adolescentes. 3. Neoplasias bucais. 4. Sobrevida. 5. Prognóstico. I. Kowalski, Luiz Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Clinicopathological features and expression of regulatory proteins of cell cycle and local invasion in oral squamous cell carcinoma affecting young patients

Palavras-chave em inglês:

Carcinoma, squamous cell

Adolescents

Mouth neoplasms

Survivorship (Public health)

Prognosis

Área de concentração: Patologia

Titulação: Mestra em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Luiz Paulo Kowalski [Orientador]

Fábio de Abreu Alves

Pablo Agustin Vargas

Data de defesa: 23-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2016, considerou a candidata MARISOL MIRANDA GALVIS aprovada.

PROF. DR. LUIZ PAULO KOWALSKI

PROF. DR. FÁBIO DE ABREU ALVES

PROF. DR. PABLO AGUSTIN VARGAS

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho aos meus pais,

Miguel Ángel e Maria Galvis,

meus orientadores na vida.

Pelo amor dado à minha existência

o exemplo de disciplina e dedicação,

e a confiança e apoio em meus projetos profissionais.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me conceder a vida e estar permanentemente ao meu lado, ao guiar meu caminho e colocar as oportunidades certas no momento certo. Por me fortalecer e renovar minha coragem nas adversidades e por permitir que eu possa aprender a ser uma melhor pessoa, mulher, estudante e profissional a cada dia.

A minha mãe **Maria** por seu amor incondicional; por me ensinar a ter fé em mim mesma e em Deus, por estar comigo em todos os momentos, me protegendo, escutando, confortando e animando para realizar tudo o que me proponho. A meu pai **Miguel** por ser meu exemplo de paixão e empenho pela academia. Seus sábios conselhos nunca me deixaram desistir nos momentos difíceis, e suas orientações e apoio, cheios de amor, são guia para minha realização pessoal e profissional. A minha irmã **Sofia** pelo carinho e torcida em meus sonhos, sempre pronta para ajudar independentemente da distância.

A **Fábio Toledo**, pelos momentos compartilhados de felicidade, insônia, ambições e conquistas; o seu carinho, apoio, companhia incondicional e exemplo de paciência foram uma valiosa força para chegar a este objetivo.

À **Universidade Estadual de Campinas** na pessoa de seu reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge** e à **Faculdade de Odontologia**, na pessoa de seu diretor **Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques**, onde me acolheram e concederam todos os recursos necessários para o desenvolvimento do presente trabalho.

À Presidente da **Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, **Profa. Dra. Cínthia Pereira Machado Tabchoury** e ao **Programa de Pós-graduação em Estomatopatologia** na pessoa de seu coordenador

Prof. Dr. Alan Roger Dos Santos Silva, por me dar a oportunidade de fazer parte de sua ilustre equipe de trabalho, e por ter tido sempre uma participação ativa e estimuladora diante de cada passo dessa trajetória; junto a seu corpo docente o **Prof. Dr. Edgar Graner**, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**, **Prof. Dr. Marcio Ajudarte Lopes**, **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida**, **Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas**, **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta** e **Profa. Dra. Tuula Anneli Salo**, por me transmitir seus conhecimentos nas áreas da semiologia, patologia oral e biologia molecular, me fornecendo uma formação integral.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**, por sua significativa contribuição na área da cirurgia de cabeça e pescoço, e me permitir ter a honra de ser sua aluna e receber todos seus ensinamentos. Sua oportunidade, confiança depositada, e seu compromisso contínuo permitiram a execução e conclusão deste projeto.

Ao **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida** quem me acolheu e acompanhou em todo o processo de formação deste mestrado e no desafio da vivência no exterior. O seu exemplo como patologista, docente e pesquisador será sempre um modelo a ser seguido por mim, junto com suas doutrinas da humildade e perseverança na aquisição incessante do conhecimento científico.

Ao **AC Camargo Cancer Center** na pessoa de seu Diretor Vice-presidente **Dr. Ademar Lopes** e o departamento de anatomia patológica, na pessoa de seu diretor **Dr. Fernando Augusto Soares** que disponibilizaram o pessoal, instalações, amostras, materiais e demais recursos para o andamento deste estudo.

Ao **Dr. Clóvis Antonio Lopes Pinto**, médico patologista titular do AC Camargo Cancer Center, pela considerada disposição, capacitação e ensinamentos transmitidos.

À **Prof. Dra. Estela Kaminagakura**, pelos marcantes avanços na área de câncer oral em pacientes jovens, suas pesquisas foram bases chave para o planejamento e elaboração deste estudo. Além disso, uma eterna gratidão por sua generosa ajuda ao me ceder sua base de dados.

À pós-doutoranda **Ana Lucia Noronha Francisco** quem me recebeu no **AC Camargo Cancer Center**, e com sua generosa colaboração me ajudou nos acertos e contratempos ocorridos.

Ao pós-doutorando **Felipe Paiva Fonseca** pesquisador, professor e colega de excelência. Pelo tempo e excelentes contribuições dedicadas ao desenvolvimento da presente pesquisa.

Aos técnicos do **laboratório de Patologia Investigativa do hospital AC Camargo Cancer Center**, em especial ao **Carlinhos, Suely e Severino**, pelo auxílio na elaboração das diversas análises histopatológicas e imuno-histoquímicas.

A **Fabiana Faco Casarotti** pelos conhecimentos e competente ajuda durante a realização das reações imuno-histoquímicas, além da amizade oferecida.

Ao estatístico **Vinicius Calsavara**, pela discussão e realização das análises estatísticas, sempre disposto ao esclarecimento de dúvidas e obtenção de confiáveis resultados.

À equipe da rotina de histopatologia: **Prof. Dr. Oslei Paes, Prof. Dr. Prof. Pablo Vargas, Débora Lima, José Laurentino, Leonardo Reis, Renata Markman e Rodrigo Neves**; pela convivência e trocas de conhecimentos, cada dia é um novo aprendizado com vocês.

À equipe de Orocentro: **Prof. Dr. Marcio Lopes, Rogério de Andrade, José Laurentino, Patrícia Fernandes, Isabel Schausltz, Diego Tetzner, Érika Graf, Fernanda dos Santos, Cida Campion e Danielle Morelli**; pelo trabalho de cada quinta-feira, que sempre traz enriquecedores ensinamentos e gratos momentos de parceria.

A **Alicia Rumayor, Celeste Sánchez e Florence Cuadra**, minha família no Brasil. Pelas sempre relevantes e instigantes discussões sobre patologia, pelo conforto nos momentos difíceis, por me escutar dia a dia e irradiar com sua boa energia e profissionalismo.

A meus amigos e colegas de pós-graduação: **Celeste Sánchez, Ciro Dantas, Débora Lima, Diego Tetzner, Florence Cuadra, Gleyson Kleber, Jessica Montenegro, Leonardo Reis, Mariana Paglioni, Natália Rangel, Patrícia Fernandes, Rebeca Barros, Rodrigo Soares, Alicia Rumayor, Ana Carolina Pellicoli, Camilla Borges, Carolina Carneiro, César Rivera, Elizabete Bagordakis, Fernanda dos Santos, Harim Tavares, Isabel Schausltz, José Laurentino, Juliana de Souza, Juscelino de Freitas, Karina Moraes, Marcondes Sena, Maurício Dourado, Priscilla Barbosa, Renata Markman, Renato Assis, Vinicius Rabelo e Wagner Gomes**; pela grande amizade e experiências compartilhadas.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de Antioquia**, instituição onde realizei minha graduação, em especial às professoras **Gloria Álvarez e Leonor González**, docentes das áreas de Estomatologia e Patologia oral, as quais me apresentaram essas maravilhosas áreas da odontologia, e com suas excelentes aulas e orientações na prática clínica me fizeram apaixonar por ela; além de todo o apoio e estímulo para a realização da minha pós-graduação no Brasil.

Ao meu grande amigo **Andrés Saldarriaga**, o irmão que a graduação me deu, por acreditar sempre em mim, por seu apoio constante e pela forte amizade.

A meus prezados amigos da Colômbia: **Alejandra Fadul, Carlos Ayala, Diego Sánchez, Esteban Alvarez, Johana Rhennals, Maria Isabel Alzate, Melissa Arbeláez, Miguel Madrid, Sara Zuleta e Yenny Montoya**, mesmo à distância sempre estão ao meu lado, são meus cúmplices e as vozes de força nos momentos incertos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES** pelo apoio financeiro concedido.

Por fim, a todas aquelas pessoas e instituições que aportaram seu carinho, tempo, recursos, conhecimentos e trabalho para a elaboração e conclusão da presente pesquisa... **Muito Obrigada!**

Peça a Deus que abençoe seus planos e eles darão certo.

Provérbios 16:3

RESUMO

Introdução: O carcinoma de células escamosas (CCE) oral afeta predominantemente homens entre a quinta e sexta décadas de vida. No entanto, estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado uma maior incidência em pacientes jovens, possivelmente associado a um comportamento clínico mais agressivo. **Objetivo:** Avaliar e comparar o significado clínico-patológico e prognóstico da expressão imuno-Histoquímica de proteínas reguladoras do ciclo celular e invasão local em CCE oral afetando pacientes jovens e pacientes acima da quinta década de vida. **Materiais e métodos:** Foi realizado um estudo retrospectivo caso-controle utilizando 132 CCE oral fixados em formol e incluídos em parafina (61 pacientes jovens ≤ 40 anos de idade e 71 pacientes controles > 47 anos de idade). Os casos foram dispostos em *Tissue Microarray* (TMA) e realizado reações imuno-Histoquímicas para um grande painel de proteínas (Ki67, p53, p16, Bcl-2, Ciclina D1, C-ErbB2, p21, Myc, EGFR, MMP-9, SMA, Catepsina K e FGF-2). Os dados clínico-patológicos foram recuperados dos prontuários médicos dos pacientes, analisados e correlacionados com a expressão de proteínas e a sobrevida. **Resultados:** As características clinico-patológicas de pacientes jovens foram semelhantes aos controles com mais de 47 anos de idade, com exceção de uma maior frequência de metástases linfonodal no último grupo. A sobrevida livre de doença (DFS), sobrevida câncer específica (CSS) e sobrevida global (OS) foi semelhante nos dois grupos ($p = 0,104$; $0,337$ e $0,681$, respectivamente). Houve diferença significativa entre os grupos etários na expressão de EGFR ($p = 0,042$) e MMP-9 ($p = 0,001$), os quais revelaram uma maior expressão nos pacientes jovens. C-erbB2 e SMA foram correlacionados com uma menor DFS no grupo de jovens, Myc influenciou a OS ($p = 0,010$ em jovens e $p = 0,001$ em grupo com idade > 40 anos) e CSS ($p = 0,007$ e $p = 0,001$, respectivamente) em ambos grupos de pacientes; e FGF-2 se correlacionou com uma diminuição na OS dos pacientes jovens ($p = 0,023$) e uma menor DFS nos indivíduos com mais de 40 anos ($p = 0,032$). **Conclusão:** As características clinico-patológica e as taxas de sobrevida dos indivíduos afetados por CCE oral não são significativamente afetados pela idade dos pacientes, embora pequenas diferenças moleculares entre pacientes jovens e naqueles com idade

superior a 40 anos estiveram presentes nessa amostra, sugerindo existência de diferentes mecanismos biológicos envolvidos na patogênese molecular destes tumores

Palavras-chave.

Carcinoma de células escamosa oral, Pacientes jovens, Câncer oral, Sobrevida, Prognóstico, Imuno-Histoquímica.

ABSTRACT

Introduction: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) predominantly affects older patients in the fifth and sixth decades of life. However, recent epidemiological studies have demonstrated a higher incidence of OSCC in young patients, possibly associated with a more aggressive clinical behavior. **Purpose:** To evaluate and compare the clinicopathological and prognostic significance of the immunoexpression of regulatory proteins of cell cycle and local invasion in OSCC affecting young and older patients. **Methods:** A retrospective case-control study was conducted using 132 formalin-fixed, paraffin-embedded OSCC (61 young patients ≤ 40 years-old and 71 controls > 47 years-old). Cases were arranged in tissue microarray (TMA) and submitted to immunohistochemical reactions analyzing a large panel of proteins (Ki67, p53, p16, Bcl-2, Cyclin D1, C-ErbB2, p21, Myc, EGFR, MMP-9, SMA, Cathepsin K and FGF-2). Clinicopathological data were retrieved from patient's medical charts, analyzed and correlated with proteins expression and survival. **Results:** The clinicopathological features of young patients were similar to the controls older than 40 years old, with the exception of an increased frequency of lymph node metastases in the latter. Disease Free Survival (DFS), Cancer Specific Survival (CSS) and Overall Survival (OS) was similar in both groups ($p = .104$, $.337$ and $.681$ respectively). There were significant difference between age groups in EGFR ($p = .042$) and MMP-9 ($p = .001$) expression, revealed an increased expression in young patients. C-ErbB2 and SMA correlated with a lower DFS in the young group, Myc influenced the OS ($p = .010$ in young and $.001$ in group > 40 years old) and CSS ($p = .007$ and $p = .001$ respectively) in both groups of patients; and FGF-2 determined a lower OS in the young patients ($p = .023$) and a decreased in DFS in subjects older than 40 years old ($p = .032$). **Conclusion:** Clinicopathological features and survival rates of patients affected by OSCC are not significantly affected by patients' age, but slight molecular differences between young and older than 40 years old were present in this sample suggesting that exist different biological mechanisms involved in the molecular pathogenesis of these tumors.

Keywords.

Oral squamous cell carcinoma, Young patients, Oral cancer, Survival, Prognosis, Immunohistochemistry.

RESUMEN

Introducción: El carcinoma de células escamosas (CCE) oral afecta principalmente a hombres mayores entre la quinta y sexta décadas de la vida. Sin embargo, estudios epidemiológicos recientes han demostrado una mayor incidencia en pacientes jóvenes, posiblemente asociado con un comportamiento clínico más agresivo.

Objetivo: Evaluar y comparar la importancia clínico-patológica y de pronóstico de la expresión inmunohistoquímica de proteínas reguladoras del ciclo celular y la invasión local en CCE oral afectando a pacientes jóvenes y pacientes por encima de la quinta década de vida.

Materiales e métodos: Estudio retrospectivo de casos y controles que se realizó utilizando 132 CCE orales fijados en formol e incluidos en parafina (61 pacientes jóvenes ≤ 40 años y 71 controles > 47 años de edad). Los casos fueron dispuestos en *Tissue Microarray* (TMA) y se sometieron a reacciones de inmunohistoquímicas analizando un gran panel de proteínas (Ki67, p53, p16, Bcl-2, Ciclina D1, C-ErbB2, p21, Myc, EGFR, MMP-9, SMA, Cathepsina K y FGF-2). Los datos clínicopatológicos fueron recuperados de las historias clínicas de los pacientes, analizados y correlacionados con la expresión de las proteínas y la supervivencia. **Resultados:** Las características clínicopatológicas de pacientes jóvenes fueron similares a los individuos con más de 40 años, con la excepción de una mayor frecuencia de metástasis en los ganglios linfáticos en el último grupo. La supervivencia libre de enfermedad (DFS), supervivencia cáncer específica (CSS) y supervivencia global (OS) fueron similar en ambos grupos ($p = 0.104$, 0.337 y 0.681 , respectivamente). Hubo diferencias significativas entre los grupos de edad en la expresión de EGFR ($p = 0,042$) y MMP-9 ($p = 0,001$), que reveló una mayor expresión en pacientes jóvenes. C-ErbB2 y SMA se correlacionó con una menor DFS en el grupo joven, Myc influyó en la OS ($p = 0,010$ en jóvenes y $0,001$ en el grupo con edad > 40 años) y CSS ($p = 0,007$ y $p = 0,001$ respectivamente) en ambos grupos de pacientes; y FGF-2 determinó una menor OS en los pacientes jóvenes ($p = 0,023$) y disminuyó la DFS en pacientes con más de 40 años de edad ($p = 0,032$). **Conclusión:** Las características clínicopatológicas y las tasas de supervivencia de los pacientes afectados por CCE oral no se ven afectados de manera significativa por la edad de los pacientes, sin embargo pequeñas diferencias moleculares entre pacientes jóvenes y aquellos con edad superior a

40 años estaban presentes en esta muestra, lo que sugiere que existen diferentes mecanismos biológicos implicados en la patogénesis molecular de estos tumores.

Palabras clave.

Carcinoma de células escamosas oral, Pacientes jóvenes, Cáncer oral. Supervivencia, Pronóstico, Inmunohistoquímica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 CAPÍTULO I: Prognostic significance of clinicopathological features and cell cycle and local invasion proteins in oral squamous cell carcinoma affecting young patients – a case-control study	29
3 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS.....	63
ANEXO 1 – Tabela 1.....	63
ANEXO 2 –Tabela 2.....	64
ANEXO 3 – Tabela 3.....	68
ANEXO 4 – Figura 1.....	69
ANEXO 5 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	72
ANEXO 6 – Certificado submissão artigo.....	74

INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS, o câncer é a principal causa de morte no mundo, no ano de 2012 foram estimados 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes (World Cancer Report, 2014). O câncer oral é um reconhecido problema de saúde pública global representando a sexta neoplasia mais frequente (Duvvuri e Myers, 2009), porém é a mais prevalente em alguns países Asiáticos como Sri Lanka, Índia, Paquistão e Bangladesh (Warnakulasuriya, 2009) devido ao hábito de mastigação de Sachê de betel (PAAN), um composto de substâncias naturais (Nozes da palmeira areca, folha de betel, cal hidratada e folha de tabaco) (Nair et al., 2004). O Instituto Nacional de Câncer - INCA, do Brasil, através do programa de epidemiologia e vigilância do câncer e seus fatores de risco reportou, no ano de 2013, 5.401 mortes por câncer oral, sendo 4.223 em homens e 1.178 em mulheres e estimou 15.490 novos casos para o ano 2016, afetando 11.140 homens e 4.350 mulheres (INCA, 2014). #mujer jombres

1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DO CÂNCER ORAL

O Carcinoma de Células Escamosas – CCE representa 90% dos tumores malignos localizadas na cavidade oral e 40% das neoplasias de cabeça e pescoço (Kowalski et al., 2000), sendo o subtipo histológico mais comum. O CCE tem origem no epitélio de superfície com invasão ao tecido conjuntivo subjacente, onde as células malignas apresentam diferentes graus de diferenciação escamosa e frequentemente é observado ceratinização com variável formação de pérolas de ceratina (Barnes et al., 2005). As células epiteliais neoplásicas encontram-se em um estado dinâmico inter-relacionado com o microambiente do tumor – MAT, que contém uma variedade de componentes como células não cancerosas: células imunes, fibroblastos e células vasculares angiogênicas; matriz extracelular: fibras de colágeno e fibronectina; e fatores

solúveis: enzimas, fatores de crescimento e quimiocinas; assim, o MAT é considerado parte do tecido canceroso (Salo et al., 2014).

Segundo a OMS (2005) o grau de diferenciação, considerando a semelhança do tecido tumoral com o de origem, é o fator avaliado para a classificação histológica dos tumores em: **i)** Bem diferenciado, assemelha-se morfológica e funcionalmente ao epitélio normal, **ii)** Moderadamente, pleomorfismo celular com moderada atividade mitótica, e **iii)** Pobremente diferenciado, células imaturas, numerosas mitoses atípicas e escassa ceratinização.

Clinicamente o CCE oral afeta principalmente a língua e o assoalho da boca, embora outros locais podem se ver afetados como a mucosa bucal, a área retromolar, a gengiva, o palato mole e duro. Apresentam-se como lesões eritroleucoplasicas assintomáticas em fases iniciais, e como úlceras ou nódulos doloridos com margens endurecidas e irregulares em estágios mais avançados (Bagan et al., 2010). Observa-se propensão para numerosas metástases locais em linfonodos cervicais (Barnes et al., 2005) e escassas metástases a distância, as quais quando presente afetam o pulmão, linfonodos não loco regionais, pele, ossos e fígado (Sumioka et al., 2013).

A literatura científica tem demonstrado o seguinte perfil dos pacientes portadores de CCE oral: predomínio em homens (proporção homens-mulheres 1.3:1), com idade entre a quinta e sexta década de vida e com abuso de consumo de tabaco e álcool (Iamaroon et al., 2004). No século passado, o CCE oral era considerado uma doença incomum em pacientes jovens menores de 40 anos, representando só 4% de todos os casos (Cusumano e Persky, 1988); entretanto recentes estudos epidemiológicos vêm demonstrado uma maior prevalência neste grupo etário, alcançando taxas de incidência de 7,2, 8,2, 18 e 18,7% em países como China (Sun et al., 2015), Espanha (Martin et al., 1997), EUA (Myers et al., 2000) e Brasil (Pontes et al., 2011), respectivamente.

Como consequência do aumento no número de casos afetando pacientes jovens e com o objetivo de uma melhor compreensão do comportamento clínico e biológico desses tumores, diferentes autores tem investigado este grupo específico de indivíduos, com resultados controversos (Kuriakose et al., 1992; Ribeiro et al., 2009; Kaminagakura et al., 2010; Kaminagakura et al., 2011; Van Monsjou et al., 2013; Hilly et al., 2013).

Ribeiro et al. (2009) estudaram em uma análise retrospectiva o CCE oral em uma amostra de pacientes com idade menor ou igual a 45 anos, onde demonstraram que as características clínico-patológicas no grupo de indivíduos jovens são iguais às encontradas na população em geral: pacientes de raça branca, do sexo masculino, com relato de consumo de tabaco e álcool. O assoalho da boca foi local mais afetado seguido pela língua, e os tumores foram principalmente bem diferenciados histologicamente e diagnosticados em estádios clínicos avançados (III/IV). Em relação ao prognóstico Kaminagakura et al. (2010) relatou que a taxa de recidiva é maior nos pacientes mais jovens, porém, sem diferença significativa na taxa de sobrevida global. Os pacientes mais jovens diagnosticados após o 1990 tinham tumores em estágio clínico menos avançado; e com um aumento do uso de combinação da cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a taxa de sobrevida global foi melhorada.

Em contrapartida, Kuriakose et al. (1992) mostraram uma maior frequência de mulheres jovens afetadas por CCE oral, com poucos fatores etiológicos evidentes e tumores invasivos que afetam a língua; ao contrário dos pacientes maiores de 60 anos onde a maioria foram homens, com histórico de consumo de cigarro e/ou álcool lesões exofíticas na mucosa oral ou gengiva. Neste cenário Hilly et al. (2013) avaliaram a sobrevida em pacientes com idade menor de 30 anos, e encontraram uma apresentação mais agressiva da doença nos jovens do que nos pacientes de idade mais avançada, com maiores taxas de metástases cervicais regionais e doença recorrente com uma taxa de letalidade de 100%.

1.3 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO CÂNCER ORAL EM PACIENTES JOVENS

O consumo sinérgico de tabaco e álcool são considerados os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do CCE oral (Barnes et al., 2005), no entanto, o papel destes agentes em pacientes jovens é incerto, devido à ausência do hábito ou a exposição por curto período de tempo na maioria dos casos. Existe um subgrupo de pacientes com predileção pelo sexo feminino, não tabagistas e não etilistas, HPV negativos, cuja etiologia é desconhecida, e Toner e E. O'Regan (2009) sugeriram diversos mecanismos que podem ajudar a compreender a etiologia nestes indivíduos. Cita-se a

variação de cada indivíduo quanto à capacidade de se desintoxicar dos hidrocarbonetos (produtos do tabaco e do álcool) mediante a função das glutathione transferases - GST, ou seja, uma exposição ambiental ao fumo do tabaco pode desempenhar um papel importante em alguns pacientes jovens não tabagistas com o genótipo nulo GSTM1 e GSTT1 (associação encontrada no carcinoma de pulmão e CCE oral). Outra consideração é o consumo de álcool como um fator independente (e não um co-fator do cigarro) relacionado com a ingestão de bebidas alcoólicas, mediante seu mecanismo facilitador da absorção de substâncias cancerígenas para dentro das células.

O papel do vírus do papiloma humano – HPV também têm sido pesquisado neste grupo de pacientes. O HPV é um vírus de DNA, da família Papovaviridae e aproximadamente 100 subtipos foram descobertos até hoje, os quais são classificados como de baixo risco (HPV-6 e HPV-11, envolvidos nas lesões benignas) e de alto risco (HPV-16 e HPV-18, conhecidos carcinogênicos), o último fortemente relacionado com CCE de tonsila (Syrjänen, 2005). Segundo Kaminagakura et al. (2012) a presença do HPV-DNA de alto risco em CCE oral é baixa representado o 19,2% dos casos, embora, quando é feita a análise por idade, 68,2% são pacientes menores de 40 anos, sugerindo a possibilidade de ser um fator contribuinte na carcinogênese oral nos indivíduos mais jovens.

Evidencia científica sugere que os pacientes jovens podem ter uma maior instabilidade genômica devido à alta presença de tumores anaploides e tetraploides em comparação com uma baixa prevalência dessas alterações nos tumores de pacientes acima de 50 anos (Santos-Silva et al., 2011). Por outro lado, alterações genéticas, avaliadas por hibridização genômica, encontradas nestes pacientes, na maioria tabagistas, não tem sido achadas nos jovens não fumantes, por exemplo 3p, 9p21, 11q13, 7p12, 10q23.3 (Toner e E. O'Regan, 2009). Além disso, quando algum tipo de susceptibilidade hereditária estiver relacionado à etiologia, os antecedentes de doenças familiares devem ser considerados importantes, indicando aumento no risco de câncer em parentes de primeiro grau. A história familiar pode estar associada a um início precoce do CCE oral juntamente com outros fatores de risco como a anemia de Fanconi, a síndrome de Bloom, imunossupressão, desnutrição, consumo de drogas e desordenes potencialmente malignas (Toner e E. O'Regan, 2009; Van Monsjou et al., 2013).

1.4 PATOGÊNESE MOLECULAR DO CÂNCER ORAL

O CCE oral é o resultado de múltiplos eventos moleculares que se desenvolvem na combinação de predisposições genéticas individuais, exposição a agentes carcinogênicos ambientais e/ou uma função reduzida dos fatores intrínsecos de proteção do DNA, os quais em interação promovem um comportamento maligno das células epiteliais com consequentes modificações fenotípicas (Vairaktaris et al., 2008).

As alterações genéticas envolvidas na transformação neoplásica incluem a ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes são genes normais que codificam proteínas que regulam a proliferação e a diferenciação celular. Os proto-oncogenes podem sofrer mutações, aumento de expressão gênica, translocações cromossômicas ou inserção retroviral, e transformar-se em oncogenes. Com sua ativação, as proteínas produto dos oncogenes se transformam em um agente indutor de tumores, os quais favorecem a proliferação e sobrevivência celular anormal e consequente tumorigênese. Ao contrário dos oncogenes, os genes supressores de tumores modulam negativamente a transformação neoplásica codificando proteínas que inibem a progressão nos *checkpoints* do ciclo celular, nos casos em que se apresente alguma alteração no DNA, e proteínas que promovem a apoptose. Os genes supressores de tumores podem sofrer perdas de função e consequentemente favorecer o desenvolvimento de tumores através do bloqueio de sua função inibitória (Choi et al., 2008; Colomba et al., 2009).

Essas alterações genéticas no processo de carcinogênese oral levam a perda dos mecanismos de controle do ciclo celular, permitindo a transformação e proliferação de células tumorais malignas (Todd et al., 2002). Análises moleculares têm demonstrado que as alterações mais frequentemente encontradas nos CCE oral e classificados segundo suas funções, são em:

Receptores de fatores de crescimento: A família dos receptores ErbB são proteínas transmembranais tirosina-quinases (TK), que se ligam ao fator de crescimento epidérmico – EGF e a outras moléculas semelhantes. Está composta por 19 subclasses, das quais quatro receptores se relacionam com os processos de carcinogênese: c-erbB-1 (EGFR), c-erbB-2 (Neu /HER-2), c-erbB-3 (HER-3) e c-erbB-4 (HER-4). Quando ativos,

esses receptores unem-se em dímeros, se transfosforilam, e passam a ser importantes mediadores do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (Roskoski, 2014).

Receptor do fator de crescimento epidérmico - EGFR: O EGFR é uma glicoproteína transmembranal de 170 kDa composta por uma região de ligação extracelular, um segmento transmembranal hidrofóbico e uma região intracelular de TK. Ao EGFR se liga o EGF, o fator de crescimento transformante – TGF alfa, e a outras proteínas reguladoras, com consequente fosforilação da TK e ligação de proteínas citoplasmáticas, que ativam uma complexa cascata de sinalização intracelular através de diversas vias: **i).** Proteína quinase mitogênica ativada RAS-RAF, **ii).** fosfatidilinositol-3-quinase (pi3k)/proteína quinase b (Akt), **iii).** Fosfolipase C γ . **iv).** Transdutores de sinais e ativadores da via transcrição. **v).** Src quinase. Como resultado desses sinais a célula começa uma forte atividade mitótica que influencia a proliferação celular normal e a diferenciação. O EGFR tem um papel importante na patogênese e progressão de vários carcinomas por meio da proliferação celular, inibição da apoptose, promoção da angiogênese e metástase (Scaltriti e Baselga, 2006).

Diversos estudos relatam uma alta imunoexpressão de EGFR em CCE oral que varia entre 73,4 (Laimer et al., 2007), 92,3 (Hiraishi et al., 2006) e 98% (Monteiro et al., 2010) e sua expressão tem sido correlacionada com tumores T3/T4, estágios avançados da doença, uma alta incidência de metástase cervical (Kusukawa et al., 1996), diminuição na sobrevida global (Laimer et al., 2007) e pior prognóstico em pacientes tratados com quimioterapia ou radioterapia. (Lothaire et al., 2006).

C-ErbB2: A glicoproteína C-ErbB2 (185 kDa) apresenta semelhanças com EGFR, e da mesma forma está composta por três regiões: o domínio extracelular onde está localizado o terminal amino para a ligação do ligante, a área hidrofóbica transmembranal e a região citoplasmática que contém o terminal carboxi com atividade tirosina quinase que media a interação com moléculas de sinalização intracelular. A ligação dos diversos fatores a seus receptores, induz a autofosforilação e subsequente ativação de quinases que servem de locais de união de várias proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinais intracelulares, com consequências na transcrição de genes reguladores da progressão do ciclo celular (Béguelin et al., 2010).

A expressão aberrante de vários receptores e ligantes C-ErbB2 perpetua sinais que estimulam a divisão celular, e induz respostas com diversas influências nas funções biológicas envolvidas na patogênese e progressão de tumores malignos. Slamon et al. (1987), demonstraram a correlação entre a amplificação do C-ErbB2 e uma diminuição na sobrevida global junto a uma maior recidiva em pacientes portadores de carcinoma de mama. Com relação ao CCE oral, Ibrahim et al. (1997) relataram a imunexpressão do C-ErbB2 em 88% dos casos e Parise et al. (2004) relataram a relação entre a expressão desta glicoproteína com dados clínico-patológicos e prognóstico, sugerindo C-ErbB2 pode estar envolvida com a carcinogênese destes tumores.

Transdutores de sinais intracelulares:

p21: O produto proteico do oncogene H-ras: p21 WAF1 / Cip1, pertencente à família do Cip/Kip, é regulado por p53 e desempenha suas funções biológicas através da ligação e inibição das atividades das quinases dependentes de ciclina – CDKs, com especial função nos *checkpoints* das fases do ciclo celular, sendo um regulador negativo. A expressão de p21 correlaciona-se positivamente com a supressão de genes que são importantes para a progressão do ciclo celular e a indução de genes associados à senescência, como são E2F1, STAT3 e Myc (Abbas e Dutta, 2009). Além dessas funções inibidoras de crescimento, p21 tem uma função oncogênica mediante sua capacidade de proteger as células da apoptose mediante diversas interações moleculares; entre eles estão a ligação de procaspase 3 e a inibição da sua conversão para amadurecer caspase 3, interações com as caspases 8 e 10, inibidores de quinases reguladoras da apoptose (SAPKs e ASK1), e inibição de fatores de transcrição de estimulação de apoptose tais como Myc e E2F (Roninson, 2002).

Mutações no gene H-ras estão presentes 35% de pacientes com CCE oral (Hardisson, 2003). Essas mutações resultam em uma mudança na sequência de aminoácidos da proteína impedindo a hidrólise de GTP em GDP, o que faz que com a célula receba estímulos contínuos de proliferação (Coletta et al., 2002). Ng et al. (1999) acharam uma alta expressão do p21 em 82,4% dos casos, sendo maior nos pacientes mais velhos e do sexo feminino. Da mesma forma, Tatemoto et al. (1998) correlacionaram a expressão de p21 com a metástase a linfonodos, sugerindo eles como marcadores prognósticos úteis no CCE oral.

Fatores de transcrição:

Myc: Os fatores de transcrição são proteínas com a capacidade de se ligar a regiões promotoras do DNA e desencadear diversas funções que alteram a proliferação celular. O gene Myc está localizado no cromossomo 8 e apresenta 4 alelos: b-myc, c-myc, n-myc e l-myc (Coletta et al., 2002); os quais diversos sinais mitogênicos (Wnt, Shh e EGF, da via MAPK/ERK) conseguem ativar e produzir uma variedade de efeitos biológicos: **i)** Ativação das Ciclinas e inibição do p21, estimulando a replicação celular. **ii)** Aumento na taxa do RNA e proteínas ribossomais, regulando o crescimento celular. **iii)** Inibição da Bcl-2, com consequências no controle da apoptose. **iv)** Diferenciação celular (Conacci et al., 2010).

Alta expressão de Myc muda a regulação de muitos genes e contribui para a transformação maligna de tumores. O nível de amplificação do gene Myc em CCE de cabeça e pescoço tem sido relatada e a frequência de hiperexpressão nesta localização varia de 9 a 48% (Hardisson, 2003) e tem sido correlacionado com um comportamento mais agressivo e prognóstico desfavorável (Baral et al., 1998).

Reguladores do ciclo celular:

Ciclina D1: A Ciclina D1 é uma proteína produto do gene CCND1 localizado no gene 11q13, e uma subunidade reguladora de quinases dependentes de ciclina CDK4 e CDK6. Em resposta a mitógenos extracelulares, a Ciclina D1 é sintetizada e acumulada no núcleo na fase G1 do ciclo celular, onde dimeriza com CDK4 e CDK6, permitindo a progressão à fase S do ciclo celular, onde posteriormente é degradada (Baldin et al., 1993).

Nos cânceres de cabeça e pescoço, foi relatada a hiper expressão de Ciclina D1 em 36% dos tumores mediante a técnica de hibridização in situ, e de 12% a 68% com técnica de imuno-histoquímica, e sua alta expressão tem sido significativamente correlacionada com a extensão do tumor, metástase em linfonodos regionais, estágio clínico avançado e como um marcador de prognóstico de sobrevida livre de doença e sobrevida global (Gleich e Salamone, 2002; Lothaire et al., 2006).

Envolvidos na inibição da apoptose:

Bcl-2: O proto-oncogene Bcl-2 produz uma família de proteínas mitocondriais Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein*) que se encontram localizadas no envelope nuclear, retículo endoplasmático e membrana mitocondrial externa; e tem função no controle da via mitocondrial da apoptose e na via extrínseca do receptor de morte celular. Diversos estímulos ativam a Bcl-2 e, mediante supressão da peroxidação lipídica, inibe a morte celular programada; razão pelo qual, sua hiper expressão prolonga a sobrevivência de células malignas (Birchall, 1997).

Sulkowska et al. (2003) obtiveram relação entre a expressão de Bcl-2 em CCE oral com estádios clínicos avançados, margens cirúrgicas comprometidas, maior índice tumoral e maior índice de mitoses atípicas. Os seus resultados sugeriram que a expressão de Bcl-2 é um fator importante na presença de características histopatológicas desfavoráveis no CCE oral. Por outro lado, Popovic et al. (2007) relataram uma correlação entre a baixa expressão de Bcl-2 e uma melhor taxa de sobrevida.

Genes supressores de tumores:

p53: O gene supressor de tumor p53 encontra-se localizado no cromossomo 17p13.1. Seu produto é uma fosfoproteína nuclear com uma massa molecular de 53 kDa. As duas funções principais da proteína p53 no ciclo celular são: **i)** Transcrição e interação com vários outros genes, entre eles a ativação de p21. Também denominado WAF1, o produto proteico de p21 faz um *check point* no ciclo celular na fase G1, antes que ocorra a fase S de replicação do DNA; com esse controle evita-se a duplicação de um DNA danificado. **ii)** Regulação positiva da transcrição de proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Caspase-2 (Vojtěšek et al., 1992). Uma mutação ou deleção no p53 irá aumentar a probabilidade de formação de um tumor, pois ele codifica proteínas citoplasmáticas que possuem importante papel na regulação do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose, inibindo a formação de tumores.

No contexto dos oncogenes e genes supressores de tumor, a mutação do p53, é uma das alterações genéticas mais comuns associados a uma vasta gama de neoplasias malignas. Sua hiper expressão está envolvida em 85% dos cânceres de cabeça e pescoço (Edstrom et al., 2001), sua positividade imuno-Histoquímica é conhecida como sendo um marcador útil na avaliação do prognóstico ao estar associada com o desenvolvimento precoce e recorrência de tumores primários (Hassan et al., 2008).

p16: p16 é uma CDK codificada pelo gene CDKN2A, que atua mediante a ligação a CDK4/6 impedindo a sua interação com Ciclina D. A interação CDK4/6 com Ciclina D forma um complexo que fosforila a proteína do retinoblastoma resultando na liberação de E2F e nova transcrição de genes reguladores do ciclo celular. Assim p16 apresenta um importante papel na regulação do ciclo celular, especialmente na proibição da progressão da fase G1 para a fase S (Stone et al., 1995; Liggett e Sidransky, 1998).

Uma análise imuno-Histoquímica de p16, junto com Rb e ciclina D1 foi realizada por Nakahara et al. (2000) em CCE oral, leucoplasias e mucosa oral normal. Os resultados indicaram que a alteração da via de Rb (Rb, p16 e Ciclina D1) ocorre numa fase precoce de desenvolvimento de neoplasias, não como um evento tardio. Além disso, uma forte relação recíproca entre a expressão de Rb e p16 foi observada em CCE oral, e todos estes casos tem, pelo menos, uma das alterações na via de Rb sugerindo que a alteração da via de Rb, por p16, é um evento frequente de carcinogênese oral. A sua imunoe expressão é encontrada no 43% dos CCE nesta localização (Abraham et al., 2011).

Envolvidas no microambiente do tumor:

Metaloproteinases de matriz extracelular - MMPs: Em diversos processos fisiológicos e patológicos, específicos fatores de crescimento e citocinas, como interleucina 1, fator de crescimento tumoral - α e fator de transformação do crescimento - α , estimulam as células inflamatórias, como leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, assim como a queratinócitos e fibroblastos para produzir MMPs. As MMPs são enzimas proteolíticas (endopeptidases) que possuem função na degradação e remodelação dos componentes da matriz extracelular (Colágeno, elastina, fibronectina, laminina e proteoglicanos) e da membrana basal (Birkedal, 1993).

As MMPs modulam diversos tópicos da tumorigênese ao facilitar a invasão das células tumorais, e conseqüentemente a metástase aos órgãos distantes mediante a quebra da membrana basal e a degradação do estroma intersticial (Rosenthal e Matrisian, 2006). Estudos tem demonstrado que MMP-2 e MMP-9 desempenham um papel importante na invasão e metástases do CCE de cabeça e pescoço, ao degradar o colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal (Thomas et al., 2005). Com especial interesse, no 92% dos CCE oral a MMP-9 se encontra altamente expressa (Nathan et al., 2002) e é correlacionada com o grau histológico, estágio avançado e metástases em

linfonodos (Kurahara et al., 1999; O-Charoenrat et al., 2001). Além disso, Yorioka et al. (2012) sugeriram que a medição de MMP-9, junto com MMP-2, pode ser útil para prever o período de sobrevida livre de doença nos pacientes acometidos por esses tumores.

Actina de músculo liso - SMA: Os miofibroblastos são células mesenquimais especializadas com um fenótipo intermediário entre fibroblastos e células de músculo liso, que se encontra presente em diversos tecidos normais e de granulação, onde produzem e secretam proteínas da matriz celular e participam no processo da cicatrização. Imuno-Histoquimicamente caracteriza-se pela expressão de SMA (Martinez, 2008).

Nos carcinomas, os miofibroblastos foram identificados adjacentes aos ninhos de células tumorais e reconhecidos por atuar como uma estrutura de orientação que dirige as células invasoras de tumor ao liberar numerosos fatores, como as proteinases proinvasivas, fatores angiogênicos, e componentes da matriz extracelular, que em conjunto promovem o crescimento de células epiteliais neoplásicas, invasão tumoral e metástases (Udyavara et al., 2013). Entretanto, Fonseca et al. (2014) compararam o componente estromal miofibroblástico de CCE oral de pacientes jovens menores de 40 anos com o de pacientes maiores de 40 anos, sem achar diferença estaticamente significativa e propondo que a rede miofibroblástica presente no estroma não são os responsáveis pelo diferente comportamento biológico tumoral entre esses dois grupos.

Catepsina K: A Catepsina K é uma protease lisossomal integrante da família de proteínas C1-peptidase expressa, predominantemente, por osteoclastos e com função na remodelação e reabsorção óssea por sua capacidade enzimática para catabolizar elastina, colágeno e gelatina (Inaoka et al., 1995).

Estudos de hibridização in situ e imuno-Histoquímica detectaram a presença de Catepsina K em tumores primários de câncer mamário e suas metástases ósseas, representando o potencial invasivo das células tumorais mediante a expressão de Catepsina K pela degradação das proteínas da matriz óssea (Littlewood et al., 1997), e sendo um potencial alvo de novos fármacos na terapia do câncer de mama (Le et al., 2007). Além disso, a Catepsina K é expressa no microambiente tumoral de carcinomas em pele e, recentemente, Bitu et al. (2013) descreveram a sua expressão no epitélio e no

microambiente tumoral de CCE de língua, embora sugiram que apresenta uma função protetora na progressão desses carcinomas.

Fator de crescimento fibroblástico – FGF: Os fatores de crescimento fibroblástico ácido (FGF1) e básico (FGF2) são polipeptídios que estruturalmente apresentam homologia no 53% da sequência dos seus aminoácidos com atividades biológicas similares, embora sejam produtos de diferentes genes. FGF-2 apresenta receptores de alta afinidade por componentes da matriz extracelular e desempenha uma importante função mitogênica em uma diversidade de tipos celulares tais como queratinócitos, fibroblastos, condroblastos, osteoblastos e células endoteliais, além de atuar intracelularmente para acelerar o crescimento celular (Myoken et al., 1994; Alves et al., 2010).

Hase et al. (2006) analisaram em um modelo in vitro de CCE como FGF-2 promove a invasão de células epiteliais neoplásicas e a proliferação fibroblástica e, em contraste, os anticorpos anti-FGF-2 inibem a invasão do CCE. Os resultados sugeriram que uma maior capacidade de invasão de células do CCE está associada com uma maior produção de FGF-2, que atua de uma maneira autócrina. O mesmo autor relatou um estudo imuno-histoquímico de tecido de CCE onde a expressão ou não expressão de FGF-2 em fibroblastos encontra-se associada com a invasão tumoral, a metástase à distância e o prognóstico.

Neste cenário, a análise de marcadores moleculares que são determinantes das propriedades neoplásicas contribuíra para uma melhor compressão das bases moleculares do CCE oral afetando pacientes jovens; além poderá determinar a existência de diferenças significantes entre pacientes jovens e pacientes acima da quinta década de vida afetados por esta neoplasia maligna.

Assim, o objetivo desta pesquisa é avaliar e comparar as características clínicas e o significado prognóstico da imunoexpressão de um grande painel de proteínas reguladoras envolvidas no controle do ciclo celular e invasão local neoplásico em CCE oral de pacientes jovens e pacientes com idade superior a 47 anos.

2 CAPITULO I

Artigo submetido na revista Oral Oncology

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF CLINICOPATHOLOGICAL FEATURES AND CELL CYCLE AND LOCAL INVASION PROTEINS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA AFFECTING YOUNG PATIENTS – A CASE-CONTROL STUDY

Marisol Miranda Galvis, *DDS*¹

Alan Roger Santos-Silva, *DDS, PhD*¹

Felipe Paiva Fonseca, *DDS, PhD*¹

Marcio A. Lopes, *DDS, PhD*¹

Oslei P. Almeida, *DDS, PhD*¹

Clóvis A. Lopes Pinto, *MD, PhD*²

Estela Kaminagakura, *DDS, PhD*³

Paul M. Speight, *DDS, PhD*⁴

Iris Sawazaki-Calone, *DDS, PhD*⁵

Luiz Paulo Kowalski, *MD, PhD*⁶

¹Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, Brazil.

²Department of Anatomic Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.

³Department of Bioscience and Oral Diagnosis, Science and Technology Institute, UNESP- Univ Estadual Paulista, São José dos Campos, Brazil.

⁴Academic Unit of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Clinical Dentistry, The University of Sheffield, Sheffield, UK.

⁵Oral Pathology and Oral Medicine, Dentistry School, Western Paraná State University, Cascavel, Brazil.

⁶Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.

Correspondence

Dr. Luiz Paulo Kowalski - Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology - AC Camargo Cancer Center. Rua Professor Antônio Prudente, 211, São Paulo 01509-900, Brazil . Tel: +55-11-2189-5172 - Fax: +55-11-2189-5172 - e-mail: lp_kowalski@uol.com.br

Abstract

Introduction: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) predominantly affects males in the fifth and sixth decades of life. However, a higher incidence in young patients has been reported. **Purpose:** To evaluate and compare the clinicopathological features and prognostic significance of the immunoexpression of regulatory proteins of cell cycle and local invasion in OSCC affecting young and older patients. **Patients and methods:** One hundred thirty two formalin-fixed paraffin-embedded OSCC (61 young ≤ 40 years-old and 71 older > 47 years-old) were arranged in tissue microarray (TMA) and submitted to immunohistochemical reactions: Ki67, p53, p16, Bcl-2, Cyclin D1, C-ErbB2, p21, Myc, EGFR, MMP-9, SMA, Cathepsin K and FGF-2. **Results:** The clinicopathological features and survival was similar in both groups. There were significant in EGFR ($p = .042$) and MMP-9 ($p = .001$) expression, revealed an increased expression in young patients. C-ErbB-2 and SMA correlated with a lower DFS in the young group, Myc influenced the OS ($p = .010$ in young and $.001$ in control patients) and CSS ($p = .007$ and $p = .001$ respectively) in both groups of patients; and FGF-2 determined a lower OS in the young patients ($p = .023$) and a decreased in DFS in control patients ($p = .032$). **Conclusion:** Clinicopathological features and survival rates of patients affected by OSCC are not significantly affected by patients' age, but slight molecular differences between young and older than 40 years old were present in this sample suggesting that exist different biological mechanisms involved in the molecular pathogenesis of these tumors.

Keywords

Oral squamous cell carcinoma, Young patients, Oral cancer, Survival, Prognosis, immunohistochemistry.

Introduction

Oral cancer is a recognized global public health issue, representing the sixth most prevalent human cancer worldwide¹, but it is the most common malignancy in some Asian countries² due to local cultural and social habits³. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common histological subtype (over 90% of the cases), typically affecting males in the fifth and sixth decades of life with a strong association with tobacco and alcohol synergistic use⁴. OSCC affecting patients younger than 40 years old was uncommon, accounting for no more than 4% of patients⁵; however, recent epidemiological studies have demonstrated a higher incidence in this age group achieving up to 7.2, 8.2, 18 and 18.7% in countries like China⁶, Spain⁷, USA⁸ and Brazil⁹, respectively.

Different authors have investigated the clinical and behavioral characteristics of these tumors in this specific group of individuals with the assumption that they would behave more aggressively with a worse prognosis¹⁰. Nevertheless, widely divergent results have been described and in spite of a number of reviews suggesting that clinicopathological features and survival of young patients would be the same as those found in elderly^{11,12}, other studies described important differences between both groups^{13,14}.

A better understanding of the molecular basis of OSCC affecting young patients would significantly contribute to sharply delineate their biological profile. Hence, the analysis of molecular markers known to be determinants of neoplastic properties would not only contribute to further understand these tumors, but also to determine if any significant difference would in fact exist between neoplasms affecting young patients and patients with common age.

Therefore, the aim of this study is to evaluate and compare the clinicopathological features and the prognostic significance of the immunoexpression of a large panel of regulatory proteins involved in the cell cycle control and neoplastic local invasion in OSCC affecting young and older patients.

Patients and methods

Tissue samples: Fifty patients younger than 40 years old diagnosed with OSCC and a control group of seventy-one older than 47 years-old, matched by tumor site and stage of disease at diagnosis, were retrospectively retrieved from the archives of the A.C. Camargo Cancer Center (São Paulo - Brazil) over a 43-year period from 1968 to 2011. In addition, there were included eleven young patients previously described by Santos-Silva et al. (2011)¹⁵. Original diagnoses were confirmed by reviewing 5- μ m-thick, H&E-stained slides and clinical data were retrieved from patient's medical charts.

Clinical stage was obtained according to Greene et al.¹⁶ and grouped as early (I and II) or advanced (III and IV) and the histological differentiation was determined according to Barnes et al.⁴ as well-differentiated (grade I), moderately differentiated (grade II) and poorly differentiated (grade III) tumors.

Tissue Microarray (TMA) construction: TMAs were created using the Tissue Microarrayer Beecher Instruments®, model MTA-I. (Silver Springs, MD, USA). Tumor areas of the invasion front were selected and representative cylindrical cores of 1.0 mm diameter were taken from each tissue block and arranged sequentially into a recipient paraffin block in duplicate¹⁷.

Immunohistochemistry: Sections were de-waxed with xylene and then re-hydrated in ethanol series. After antigen retrieval endogenous peroxidase activity was blocked using 3% hydrogen peroxide. Slides were incubated overnight with primary antibodies at 4°C. Antibodies clone, dilution, antigen retrieval, source and positive control are show in **Table 1**. Slides were subsequently exposed to either Post Primary Block (NovoLink Max Polymer Leica Biosystems, UK) for 30 minutes at 37°C, or to avidin-biotin complex and horseradish peroxidase reagents (LSAB Kit, DakoCytomation, USA). DAB chromogen (Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, Sigma, St Louis, USA) was used to visualize the reaction, counterstained with Carazzi's hematoxylin. The negative control was obtained by omitting the primary specific antibody.

Immunohistochemical analysis: Slides were scanned into high-resolution images using the Aperio Scanscope CS® Slide Scanner (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA). All digital images obtained in .svs format were visualized with ImageScope software (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA). Nuclear markers (Ki67, p53, Cyclin D1, p21 and Myc) were analyzed using the Nuclear Staining V9 Algorithm and

the positive nuclear staining was expressed in percentage. The expression of nuclear markers was defined following the literature as positive expression when more than 10% of cells displayed nuclear staining and negative expression when there was no stained nuclei or the immunoexpression was present in less than 10% of tumor cells¹⁸.

Membrane (C-ErbB2 and Epidermal Growth Factor Receptor- EGFR) and cytoplasmic (Bcl-2, Matrix Metalloproteinase 9 - MMP-9, Cathepsin K and Fibroblast Growth Factors 2 - FGF-2) markers were analyzed using the PixelCount V9 Algorithm and staining was automatically quantified according to previously established input parameters¹⁹. For statistical purposes, the median value of the final immunostaining results was used to split cases into two groups, below and above the median, representing low and high expression levels respectively of each membrane and cytoplasmic marker analyzed²⁰.

Semiquantitative analysis of Anti-alpha Smooth Muscle Actin - SMA was jointly carried out by two observers and each case was classified as negative (0) (0 to 5% of stromal positivity) or positive (1) (>5% of stromal positivity)²¹.

Statistical analysis: Absolute and relative frequencies were established for clinicopathological features. Chi-square and Fisher tests were used to compare clinicopathological features between groups and the nonparametric Mann-Whitney test to compare the variables. Log-rank test was carried out to evaluate the prognostic significance of clinicopathological features and proteins expression. Survival curves were acquired using the Kaplan-Meier method. Software SPSS statistics, version 23.0 was employed for data analyses and a p value < 0.05 was considered statistically significant.

Ethical statement: The current study was carried out in accordance with the ethical guidelines of the Human Research Ethics Committees of participating institutes.

Results

Sociodemographic and clinicopathological features: Sixty-one patients younger than 40 years old and a control group of 71 patients older than 41 years old diagnosed with OSCC were retrieved. Sociodemographic and clinicopathological features are shown in **Table 2**. In both groups males were more affected (73.8% in young and 78.9% in older)

($p = .490$), with mean ages of 34.1 years and of 61.2 years ($p = .001$). Tobacco use and alcohol consumption were reported by 72.1% and 60.7% young, respectively, whereas these habits were present in 78.9% and 59.2% older patients ($p = .139$ and $.552$ respectively). In both groups, oral tongue and floor of the mouth were the most affected sites ($p = .520$), with large tumors (T3/T4) affecting 57.4% of young patients and 57.7% of older subjects ($p = .966$). There was a significantly more lymph node metastases in older (93%) than in the young subjects (78.7%) ($p = .016$). Advanced clinical stage (III and IV stages) accounted for 70.5% of the young patients and for 81.7% in the older patients ($p = .130$).

Regarding histological features, tumors were predominantly well differentiated followed by moderately differentiated and poorly differentiated in both groups (59.3%, 30.5% and 10.2%, respectively, in young and 54.5%, 39.4% and 6.1%, respectively, in the older patients) ($p = .477$). Among young patients, 15.2% of surgical specimens had positive margins, whereas only 8.7% of cases affecting older patients demonstrated positive surgical margins ($p = .261$). Surgery was the most common form of treatment (98% in young and 86% in older patients), representing the only management in 36% of young patients and in 32.4% of older individuals (**Table 2**).

Survival analysis: Recurrences were more frequent in the young patients (57.1% vs 48.7%) ($p = .166$), but disease-free survival (DFS) rate did not demonstrate a significant difference between both groups (27.3% in the young patients and 43.4% in the control patients) ($p = .104$). In the young patients, recurrence time ranged from 0 to 41 months, with a mean time of 8.41 months, while in the control patients recurrence time ranged from 0 to 163 months, with a mean time of 17.64 months. Young patients with T3/T4 lesions demonstrated an inferior 5-year DFS rate, whereas control patients with tumors located in other sites different from the tongue and floor of the mouth, with T3/T4 lesions, with poorly differentiated tumors and with positive surgical margins demonstrated an inferior DFS rate. Considering all the patients, those with T3/T4 lesions and positive margins demonstrated an inferior 5-years DFS rate (**Table 3**).

49.2% of young and 41.8% of control patients died due to tumor recurrence ($p = .337$) and the 5-years cancer specific survival (CSS) rate was 85.5% in the young group and 83.8% in the control group ($p = .701$). Metastatic lymph nodes in young patients

and increased tumor size, positive surgical margins in young and control group were associated with decreased in CSS, whereas this inferior CSS was found considering all the patients with tumors located in other sites different from the tongue and floor of the mouth, large tumors (T3/T4), positive lymph nodes, advanced clinical stage and surgical margins compromised (**Table 3**).

The 5-years overall survival (OS) rate was 46.6% in the young group and 44.5% in the control group ($p = .681$). In the young group, the mean survival was of 27.45 months (Range 1-128 months), and in the control group was of 27.84 months (Range 0-172 months). Patients with tumors located in other site different from the tongue and floor of the mouth, with T3/T4 lesions, with positive lymph nodes, advanced stage tumors and with positive margins demonstrated an inferior 5-years OS rate. Regarding young patients only, those using tobacco, with T3/T4 lesions, advanced stage tumors and with positive margins demonstrated an inferior 5-year OS rate. Considering control patients only, those affected by tumors located in other sites different from the tongue and floor of the mouth, with T3/T4 lesions and with positive surgical margins demonstrated an inferior OS rate (**Table 3**).

Immunohistochemical expression of proteins: The immunohistochemical expression data of the all proteins evaluated and comparison between groups of young and older patients are presented in **Figure 1**. There were significant differences between young and control patients in the expression of EGFR ($p = .042$) and MMP-9 ($p = .001$).

Reactions for EGFR was expressed in the membrane and cytoplasm of neoplastic cell with a median positivity of 174.95, with young patients demonstrating a higher expression of the protein than older patients (61.3 vs 40.7% respectively) ($p = .042$). (**Figure 1**). EGFR was correlated with patients whose reported alcohol consumption ($p = .009$) (**Table 4**), but it did not influence survivals in the studied sample (**Table 5**).

The MMP-9 expression in the cytoplasm of neoplastic cell presented a medium of 107.97 and young patients revealed a significantly higher expression than older patients (68 vs 34.5% respectively) ($p = .001$) (**Figure 1**). Considering all the patients, higher expression of MMP-9 was associated with anatomical site, tumor size, metastatic lymph nodes and clinical stage. Only young patients was associated with tumors located in the

tongue, tumor size and advanced clinical, whereas in the control subjects was associated with tumor size (**Table 4**). MMP-9 did not correlate with survival rates (**Table 5**).

Although there was no significant differences between young and control groups in the expression of C-ErbB2, Myc, SMA and FGF-2, this expression was correlated with the survival. C-ErbB2 and SMA were determined lower DFS in the young group ($p = .048$ and $p = .018$ respectively), Myc influenced the OS ($p = .010$ in young and $p = .001$ in control patients) and CSS ($p = .007$ and $p = .001$ respectively) in both groups of patients; and FGF-2 determined a lower OS in the young patients ($p = .023$) and a decreased in DSF in control patients ($p = .032$ (**Table 5**).

The other proteins that are not described here did not show difference between age groups and not influence the survival, its results are show in **Figure 1**, **Table 4** and **Table 5**.

Discussion

A higher incidence of OSCC among young people has been recently reported in different countries worldwide⁶⁻⁹ nevertheless, the clinical and biological behavior of these tumors is still a matter of discussion. Therefore, researches that analyze the clinicopathological features and the molecular basis of OSCC affecting this specific population are of utmost importance.

As demonstrated in the present sample, OSCC affects mainly male patients, what has also been true for young patients^{12,23}, possibly due to the higher use of tobacco and alcohol by males⁴. However, when these social habits are absent, young females were demonstrated to be more affected^{13,15}, what could also be exemplified in our sample.

Tobacco and alcohol synergistic consumption are considered the main etiologic agents associated with the development of OSCC²³; however, the role of these factors in young patients is controversial due to the eventually absence of these habits or the short time of exposure in this population. However, this assumption may be taken with care, since our sample of young patients showed a high prevalence of these habits; suggesting a significant increase of smokers and drinkers in the youth population, in agreement with Ribeiro et al.¹¹. On the other hand, oral cancer is a recognizable multifactorial disease

and other etiological agents might be playing important roles in cases not associated with well known environmental factors. Moreover, our group has previously demonstrated a higher frequency of DNA ploidy abnormalities in young patients¹⁵, suggesting that an increased genomic instability is present in these individuals if compared to older ones²⁴.

In addition to determine the distribution of OSCC among young and older patients, we looked forward to characterizing the clinicopathological factors that could influence the survival rates of this group. We identified that advanced tumor size (T3/T4) was significantly correlated with decreased DSF and OS, while positive surgical margins determined an inferior OS rate only in both groups. These results are in agreement with previous reports^{25,26} and highlight the importance of OSCC early diagnosis and appropriate surgical management of tumors in any population. Nevertheless, the presence of lymph node metastases and advanced clinical stage tumors (III/IV) determined a worse OS in the young patients only, probably because of the presence of comorbidities in old patients that may influence OS rates.

Considering cellular processes that allow neoplastic onset and development, the fundamental feature of cancer cells is the dysregulated and sustained proliferative potential that provides the neoplastic progression and invasion²⁷. In this study, there was no difference in the proliferative activity of OSCC of younger and older subjects, what has previously been reported by Deyhimi et al.²⁸.

p53, p16 and p21 proteins are present in the G1 phase checkpoint before DNA replication, avoiding damaged DNA duplication²⁹. Alterations in p53 was reported in 85% of head and neck cancers³⁰, its positive immunohistochemical expression demonstrates a prognostic potential and associated with neoplastic early development and recurrences³¹. However, the present investigation did not show a significant correlation of p53 expression with survival rates, clinicopathological feature and patients age what is in agreement with other reports³² and further illustrates the high heterogeneity of this disease.

Although the correlation between human papilloma virus (HPV) and positive p16 in OSCC is controversial³³, some authors report an important relation^{34,35}. In this study p16 was weakly expressed in both young and older patients without difference between groups, hence it is possible that HPV was not important in the tumors studied in our

sample. Interestingly p16 was correlated with a higher expression in women patients and also failed to correlate with survival rates of our sample, what is supported by Nakahara et al.³⁶ that demonstrated p16 increased expression in early stage of carcinogenesis. Similarly, p21 had no difference expression between young and control patients, influence in clinicopathological parameters and survival rates.

Tumor cells require mechanisms to evade activating signaling pathways that induce apoptosis³⁷ and Bcl-2 is a key factor to provide this ability by controlling the apoptosis³⁸ contrary to our results where Bcl-2 over-expression has not been correlated with a worse prognosis. In contrast with Ibrahim et al.³⁹ we found extremely low expression with no significant difference between young and control patients concerning Bcl-2 expression, suggesting that this anti-apoptotic marker is similarly regulated in both groups and that other molecules might be influencing the anti-apoptotic potential of this tumor.

Kaminagakura et al.⁴⁰ described an important role played by Cyclin D1 in OSCC cases affecting young patients, however, in the findings of the present work there was no differences between groups. Could be important differences in the technique and methodology to analyze the immunohistochemistry reactions. An interesting result in our sample when consider all the patients together, was significantly correlated between Cyclin D1 and metastatic lymph nodes demonstrating that Cyclin D1 may play an important function in progression of OSCC, although further studies are necessary to better clarify the role of this protein in the carcinogenesis and metastasis.

Despite the lack of significant differences between age groups in the immunohistochemical expression, the over-expression of C-ErbB2 protein determined a lower DFS in young individuals. Aberrant expression of several receptors and ligands C-ErbB2 perpetuates signals which stimulate cell division and induces responses with different influences on biological functions involved in the pathogenesis and progression of malignant tumors⁴¹. According to Parise et al.⁴² there is a relationship between the expression of C-ErbB2 and prognosis of patients affected by OSCC.

Myc is a transcription factor with the ability of binding to the promoter regions of DNA and initiate a variety of biological effects including cellular replication,

differentiation and control of apoptosis⁴³. Baral et al.⁴⁴ demonstrated that Myc overexpression was associated with an unfavorable prognosis for patients affected by OSCC and interestingly, in the current study the protein exhibited a prognostic potential in OS and CSS in the groups evaluated although was not found relation in the Myc expression between age groups.

EGFR plays an important role in the pathogenesis and progression of several carcinomas by promoting cellular proliferation, angiogenesis and metastasis⁴⁵. A high expression of EGFR in OSCC has been correlated with an advanced stage of the tumor, a high incidence of cervical metastasis^{46, 47} and lower overall survival⁴⁸. In this work, the expression of EGFR did not correlated with survival in both groups but the immunoexpression was higher in the young patients than in the older ones suggesting that in young people EGFR intervene in the biological mechanisms involved in the development of these tumors.

Matrix Metalloproteinases (MMPs) are proteolytic enzymes that degrade and remodel the extracellular matrix components and basement membrane reason by can facilitate the invasion of tumor cells and consequently metastasis to distant organs⁴⁹. MMP-9 is overexpressed in 92% of OSCC⁵⁰ and it was correlated with histological grade of the tumor, advanced stage diseases and presence of lymph node metastases^{51, 52}. The present investigation found a significantly higher expression of MMP-9 in young patients than in older ones, what might lead to the higher rate of recurrences found in these patients. Also MMP-9 was correlated with anatomical site, tumor size and clinical stage in young patients, while in control subjects only was correlated with tumor size, results that increased the relevance of this MMPs in the development and dissemination of cancer cells in tumors affecting young patients.

Cathepsin K is a lysosomal protease predominantly expressed by osteoclasts, important to bone remodeling potential⁵³ and it was recently described in the epithelium and stroma of SCC affecting the tongue⁵⁴. We have also observed Cathepsin K expression in our samples, but there was no significant difference between young and control patients, and the protein did not demonstrate a prognostic potential in the studied sample.

FGF-2 has a high affinity for receptors of the extracellular matrix components, playing an important mitogenic function in a variety of cell⁵⁵ and played an important role

in the invasive potential of neoplastic cells and of fibroblasts⁵⁶. We observed that the increased expression of FGF-2 is associated with a lower OS of young patients and with a lower DFS of older patients, demonstrating therefore, an important prognostic potential. Also, no difference could be observed in FGF-2 expression between groups, but was correlated with positive surgical margins in young subjects, showing the importance of future research to analyze in detail the role of FGF-2 in OSCC affecting young people.

Myofibroblasts have been identified in carcinomas adjacent to nests of tumor cells and are recognized to act as a guide in the invading of tumor cells by the secretion of the numerous factors which promote the growth of neoplastic cells, tumor invasion and metastasis⁵⁷. Similar to the reported by Fonseca et al.²¹ we don't found difference significant in the expression of SMA between young and control patients affected by OSCC, however was correlated with DFS and tumor size in young people, whereas in control patients no determined any survival but was associated with positive lymph nodes.

Conclusion

We demonstrated that patients younger than 40 years-old have similar survival rates of patients older than 40 years, confirming that OSCC behavior is not influenced by the age of the affected patients, as originally suggested. However, some slight different molecular abnormalities can be found between these groups (EGFR and MMP-9) and they might be associated with the unusual early development of the neoplasia in young patients. These results demand, therefore, additional investigations to better characterize these molecular differences and to further understand the factors triggering OSCC onset in young individuals, especially those not under risk social habits.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

References

1. Duvvuri U, Myers JN. **Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide.** *Curr Probl Surg.* 2009;46(2):114-7.
2. Warnakulasuriya S. **Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer.** *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16.
3. Nair U, Bartsch H, Nair J. **Alert for an epidemic of oral cancer due to use of the betel quid substitutes gutkha and pan masala: a review of agents and causative mechanisms.** *Mutagenesis.* 2004;19(4):251-62.
4. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.** *IARC Press, Lyon.* 2005.
5. Cusumano RJ, Persky MS. **Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in young adults.** *Head Neck Surg.* 1988;10(4):229-34.
6. Sun Q, Fang Q, Guo S. **A comparison of oral squamous cell carcinoma between young and old patients in a single medical center in China.** *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(8):12418-23.
7. Martin-Granizo R, Rodriguez-Campo F, Naval L, Diaz Gonzalez FJ. **Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients younger than 40 years.** *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;117(3 Pt 1):268-75.
8. Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. **Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes.** *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000; 122(1):44-5.1.
9. Pontes FSC, Carneiro JT, Fonseca FP, Silva TSP, Pontes HAR, Pinto DS. **Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth: Analysis of survival rate and independent prognostic factors in the Amazon region.** *J Craniofac Surg.* 2011; 22 (3): 925-930.
10. Sarkaria JN, Harari PM. **Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy.** *Head Neck.* 1994;16(2):107-11.
11. Ribeiro AC, Silva AR, Simonato LE, Salzedas LM, Sundefeld ML, Soubhia AM. **Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians.** *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2009;47(2):95-8.

12. Kaminagakura E, Vartanian JG, da Silva SD, dos Santos CR, Kowalski LP. **Case-control study on prognostic factors in oral squamous cell carcinoma in young patients.** *Head Neck.* 2010;32(11):1460-6.
13. Kuriakose M, Sankaranarayanan M, Nair MK, Cherian T, Sugar AW, Scully C, Prime SS. **Comparison of oral squamous cell carcinoma in younger and older patients in India.** *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1992;28B(2):113-20.
14. Hilly O, Shkedy Y, Hod R, Soudry E, Mizrachi A, Hamzany Y, Bachar G, Shpitzer T. **Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: comparison with patients older than 60 years.** *Oral Oncol.* 2013;49(10):987-90.
15. Santos-Silva AR, Ribeiro AC, Soubhia AM, Miyahara GI, Carlos R, Speight PM, Hunter KD, Torres-Rendon A, Vargas PA, Lopes MA. **High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study.** *Histopathology.* 2010;58(7):1127-35.
16. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM. **AJCC cancer staging handbook.** Springer Verlag. 2002.
17. Radhakrishnan R, Solomon M, Satyamoorthy K, Martin LE, Lingen MW. **Tissue microarray - a high-throughput molecular analysis in head and neck cancer.** *J Oral Pathol Med.* 2008 Mar;37(3):166-76.
18. Iamaroon A, Khemaleelakul U, Pongsiriwet S, Pintong J. **Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma.** *J Oral Pathol Med.* 2004;33(1):30-6.
19. Fonseca FP, de Andrade BA, Rangel AL, Della Coletta R, Lopes MA, de Almeida OP, Vargas PA. **Tissue microarray is a reliable method for immunohistochemical analysis of pleomorphic adenoma.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;117(1):81-8.
20. Kelner N, Rodrigues PC, Bufalino A, Fonseca FP, Santos-Silva AR, Miguel MC, et al. **Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma.** *Head Neck.* 2015;37: 479–486.
21. Fonseca FP, Coletta RD, Azevedo MB, Prado Ribeiro AC, Pires Soubhia AM, Miyahara GI, Carlos R, et al. **Stromal myofibroblasts in squamous cell carcinoma**

- of the tongue in young patients - a multicenter collaborative study.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;118(4):483-9.
22. Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak S, Prapayasadok S, Jittidecharaks S, Chitapanarux I, Lorvidhaya V. **Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people.** *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(1):84-8.
 23. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. **Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer.** *Cancer Res.* 1988;48(11):3282-7.
 24. Toner M, O'Regan EM. **Head and neck squamous cell carcinoma in the young: a spectrum or a distinct group? Part 2.** *Head Neck Pathol.* 2009;3(3):249-51.
 25. Tralongo V, Rodolico V, Luciani A, Marra G, Daniele E. **Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. A review of the literature.** *Anticancer Res.* 1999; 19(4C):3503-10.
 26. Jadhav KB, Gupta N. **Clinicopathological prognostic implicators of oral squamous cell carcinoma: need to understand and revise.** *N Am J Med Sci.* 2013; 5(12):671-9.
 27. Evan GI, Vousden KH. **Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.** *Nature.* 2001;411(6835):342-8.
 28. Deyhimi P, Torabinia N, Torabinia A. **A comparative study of histological grade and expression of Ki67 protein in oral squamous cell carcinoma in young and old patients.** *Dent Res J.* 2013;10(4):514-7.
 29. Heinzl PA, Balaram P, Bernard HU. **Mutations and polymorphisms in the p53, p21 and p16 genes in oral carcinomas of Indian betel quid chewers.** *Int J Cancer.* 1996;68(4):420-3.
 30. Edstrom S, Cvetkovska E, Westin T, Young C. **Overexpression of p53-related proteins predicts rapid growth rate of head and neck cancer.** *Laryngoscope.* 2001;111(1):124-30.
 31. Hassan NM, Tada M, Hamada J, Kashiwazaki H, Kameyama T, Akhter R, Yamazaki Y, Yano M, Inoue N, Moriuchi T. **Presence of dominant negative mutation of TP53 is a risk of early recurrence in oral cancer.** *Cancer Lett.* 2008; 270(1):108-19.

32. Chandra A, Singh A, Sebastian BT, Agnihotri A, Bali R, Verma PK. **Oral squamous cell carcinomas in age distinct population: a comparison of p53 immunoexpression.** *J Cancer Res Ther.* 2013;9(4):587-91.
33. Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Márton IJ. **Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(3):344-52.
34. Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, Nishimoto IN, Rocha R, Kowalski LP. **High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients.** *Int J Cancer.* 2012;130(8):1726-32.
35. Geißler C, Tahtali A, Diensthuber M, Gassner D, Stöver T, Wagenblast J. **The role of p16 expression as a predictive marker in HPV-positive oral SCCHN - a retrospective single-center study.** *Anticancer Res.* 2013;33(3):913-6.
36. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T. **Alterations of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas.** *Cancer Lett.* 2000; 160(1):3-8.
37. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. **Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities.** *J Cell Biochem.* 2008; 104(4):1124-49.
38. Birchall MA. **Apoptosis, Mitosis, PCNA 3. and bcl-2 in normal, leukoplakic and malignant epithelia of the oral cavity: Prospective, in vivo study.** *Oral Oncol,* 1997; 33(6):219-27.
39. Ibrahim SO, Vasstrand EN, Liavaag PG, Johannessen AC, Lillehaug JR. **Expression of c-erbB proto-oncogene family members in squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Anticancer Res.* 1997; 17(6D):4539-46.
40. Kaminagakura E, Werneck da Cunha I, Soares FA, Nishimoto IN, Kowalski LP. **CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients.** *Head Neck.* 2011;33(10):1413-9.
41. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** *Science.* 1987;235(4785):177-82.

42. Parise Junior O, Carvalho LV, Miguel RE, Kowalski LP. **Prognostic impact of p53, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor on head and neck carcinoma.** *Sao Paulo Med J.* 2004; 122(6):264-8.
43. Conacci-Sorrell M, Ngouenet C, Eisenman RN. **Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation.** *Cell.* 2010;142(3):480.
44. Baral R, Patnaik S, Das BR. **Co-overexpression of p53 and c-myc proteins linked with advanced stages of betel- and tobacco-related oral squamous cell carcinomas from eastern India.** *Eur J Oral Sci.* 1998;106(5):907-13.
45. Scaltriti M, Baselga J. **The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy.** *Clin Cancer Res.* 2006; 12(18):5268-72.
46. Monteiro LS, Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Forteza J, Fraga M. **EGFR and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma using tissue microarray technology.** *J Oral Pathol Med.* 2010;39(7):571-8.
47. Kusukawa J, Harada H, Shima I, Sasaguri Y, Kameyama T, Morimatsu M. **The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity.** *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996;32B(4):217-21.
48. Laimer K, Spizzo G, Gastl G, Obrist P, Brunhuber T, Fong D, Barbieri V, Jank S, Doppler W, Rasse M, Norer B. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol.* 2007 Feb;43(2):193-8.
49. Rosenthal EL, Matrisian LM. **Matrix metalloproteases in head and neck cancer.** *Head Neck.* 2006; 28(7):639-48.
50. Nathan CO, Amirghahri N, Rice C, Abreo FW, Shi R, Stucker FJ. **Molecular analysis of surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma patients.** *Laryngoscope.* 2002;112(12):2129-40
51. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, Takeuchi H, Shirasuna K. **Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis.** *Head Neck.* 1999;21(7):627-38.

52. O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. **Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127(7):813-20.
53. Inaoka T, Bilbe G, Ishibashi O, Tezuka K, Kumegawa M, Kokubo T. **Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 206(1):89-96.
54. Bitu CC, Kauppila JH, Bufalino A, Nurmenniemi S, Teppo S, Keinänen M, Vilen ST, Lehenkari P, Nyberg P, Coletta RD, Salo T. **Cathepsin K is present in invasive oral tongue squamous cell carcinoma in vivo and in vitro.** *PLoS One.* 2013;8(8):e70925.
55. Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Takada K. **Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC).** *J Oral Pathol Med.* 1994;451-6.
56. Hase T, Kawashiri S, Tanaka A, Nozaki S, Noguchi N, Kato K, Nakaya H, Nakagawa K. **Correlation of basic fibroblast growth factor expression with the invasion and the prognosis of oral squamous cell carcinoma.** *J Oral Pathol Med.* 2006;35:136-139.
57. Udyavara S, Choudaha N, Kasetty S, Satish P J, Kallianpur S, and Tijare M. **Stromal myofibroblasts in nonmetastatic and metastatic oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study.** *Oral Maxillofac Pathol.* 2013;17(2): 190–194.

Table 1 Antibodies used for the immunohistochemical analysis

<i>Antibody</i>	<i>Clone</i>	<i>Dilution</i>	<i>Antigen retrieval</i>	<i>Source</i>	<i>Positive control</i>
Ki67	MIB-1	1:300	Citric acid	Dako	Tonsil
p53	DO-7	1:300	Citric acid	Dako	Carcinoma
p16	E6H4	Ready	CC1	Ventana*	Cervical carcinoma
Bcl-2	124	1:50	Citric acid	Dako	Tonsil
Cyclin D1	RBT14	Ready	EDTA/Tris	Biosb	Tonsil
C-ErbB2		1:1500	Citric acid	Dako	Breast Carcinoma
p21	SX118	1:50	EDTA/Tris	Dako	Breast Carcinoma
Myc	9E.10.3	1:50	EDTA/Tris	Thermo	Burkitt lymphoma
EGFR	EGFR.25	1:50	Citric acid	Leica	Placenta
MMP-9		1:200	Citric acid	Thermo	Placenta
SMA	1A4	1:400	Citric acid	Dako	Endometrium
Cathepsin K	3F9	1:500	Citric acid	Biovendor	OSCC
FGF-2		1:500	Citric acid	Chemicon	Colon tumor

*Automated immunohistochemistry

Table 2. Sociodemographic and clinicopathological features.

<i>Feature</i>	<i>Young</i>	<i>Control</i>	<i>p value</i>
	<i>n (%)</i>		
Age			
Mean	34.1	61.2	.001*
Median	36	59	
Range	16-40	47-80	
Sex			
Male	45 (73.8)	56 (78.9)	.490
Female	16 (26.2)	15 (21.1)	
Tobacco consumption			
Yes	44 (72.1)	56 (78.9)	.139
No	14 (23.0)	8 (11.3)	
NA	3 (4.9)	7 (9.9)	
Alcohol consumption			
Yes	37 (60.7)	42 (59.2)	.552
No	21 (34.4)	22 (31.0)	
NA	3 (4.9)	7 (9.9)	
Anatomical site			
Tongue	33 (54.1)	35 (49.3)	.520
Floor of the mouth	16 (26.2)	16 (22.5)	
Other	12 (19.7)	20 (28.2)	
T classification			
T1/T2	26 (42.6)	30 (42.3)	.966
T3/T4	35 (57.4)	41 (57.7)	
N classification			
N0	13 (21.3)	5 (7.0)	.016*
N1-N3	48 (78.7)	66 (93.0)	
Clinical stage			
I/II	18 (29.5)	13 (18.3)	.130
III/IV	43 (70.5)	58 (81.7)	
Histological differentiation			
I	35 (59.3)	36 (54.5)	.477
II	18 (30.5)	26 (39.4)	
III	6 (10.2)	4 (6.1)	
Surgical margins			
Negative	39 (84.8)	42 (91.3)	.261
Positive	7 (15.2)	4 (8.7)	
Treatment			
Surgery	18 (36.0)	23 (32.4)	ND
Radiotherapy	1 (2.0)	10 (14.1)	
Surgery + radiotherapy	29 (58.0)	30 (42.3)	
Surgery + radiotherapy + chemotherapy	2 (4.0)	8 (11.3)	
Recurrence			
Yes	24 (57.1)	31 (43.7)	.166
No	18 (42.9)	40 (56.3)	

Abbreviations: NA, not available; ND, not determined.

*Statistically significant difference.

Table 3. Correlations between clinicopathological features and 5 years- survival.

<i>Variable</i>	<i>Young</i>			<i>Control</i>			<i>All</i>		
	<i>OS</i>	<i>DFS</i>	<i>CSS</i>	<i>OS</i>	<i>DFS</i>	<i>CSS</i>	<i>OS</i>	<i>DFS</i>	<i>CSS</i>
Sex	.059	.255	.187	.663	.964	.964	.350	.184	.420
Tobacco consumption	.034*	.765	.130	.622	.534	.526	.090	.899	.192
Alcohol consumption	.678	.763	.890	.753	.867	.973	.701	.899	.885
Anatomical site	.919	.276	.616	.010*	.038*	.006	.043*	.197	.015*
T classification	.001*	.040*	.001*	.001*	.028*	.001*	.001*	.001*	.001*
N classification	.001*	.465	.001*	.744	.324	.917	.003*	.686	.007*
Clinical stage	.001*	.829	.008*	.078	.183	.124	.001*	.237	.004*
Histological differentiation	.088	.914	.635	.663	.001*	.150	.119	.119	.097
Surgical margins	.001*	.129	.001*	.001*	.002*	.001*	.001*	.001*	.001*

Abbreviations: OS: Overall survival, value p; DFS: Disease free survival, value p; CSS: Cancer specific survival, value p

*Statistically significant difference.

Table 4. Correlation between expression of proteins and clinicopathological features.

<i>Group</i>	<i>Protein</i>	<i>Sex</i>	<i>Tobacco</i>	<i>Alcohol</i>	<i>Anatomical site</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>Clinical stage</i>	<i>Histological Differentiation</i>	<i>Surgical margins</i>
<i>Young</i>	Ki 67	.159	.356	.662	.424	.091	.350	.228	.311	.455
<i>Control</i>		.528	.362	.786	.016*	.096	.542	.197	.288	.607
<i>All</i>		.181	.116	.691	.013*	.018*	.217	.065	.197	.705
<i>Young</i>	p53	.938	.280	.360	.693	.922	.926	.202	.602	.061
<i>Control</i>		.432	.627	.850	.629	.965	.538	.913	.078	.289
<i>All</i>		.859	.448	.440	.419	1	.564	.441	.124	.311
<i>Young</i>	p16	.011*	.548	.289	.77	.883	.142	.350	.579	.680
<i>Control</i>		.026*	.706	.788	.238	.884	.004*	.128	.852	.298
<i>All</i>		.001*	.952	.378	.581	1	.008*	.096	.937	.330
<i>Young</i>	Bcl-2	.975	.855	.567	.990	.324	.538	.801	.271	.467
<i>Control</i>		.049*	.739	.782	.989	.449	.959	.762	.403	.258
<i>All</i>		.213	.813	.565	.983	.939	.703	.755	.990	.199
<i>Young</i>	Cyclin D1	.718	.823	.620	.882	.772	.053	.169	.648	.660
<i>Control</i>		.037*	.826	.214	.336	.883	.099	1	.624	1
<i>All</i>		.088	.802	.207	.534	.749	.004*	.302	.475	.859
<i>Young</i>	C-erbB2	.825	.598	.737	.576	.866	.785	.562	.156	.678
<i>Control</i>		.197	.380	.762	.129	.688	.087	.085	.158	.835
<i>All</i>		.476	.232	.951	.822	.680	.338	.074	.047*	.664
<i>Young</i>	p21	.285	.228	.559	.515	.064	.459	.242	.537	.27
<i>Control</i>		.363	.234	.564	.930	.067	.476	.525	.949	.315
<i>All</i>		.950	.834	.134	.729	.207	.556	.726	.407	.667
<i>Young</i>	Myc	1	.787	.285	.550	.322	.504	.801	.025*	.436
<i>Control</i>		.618	.712	.456	.311	.434	.846	.703	.483	.706
<i>All</i>		1	.744	.565	.402	.629	.339	.765	.044*	.549
<i>Young</i>	EGFR	.109	.322	.317	.950	.319	.942	.920	.248	.136
<i>Control</i>		.804	.451	.009*	.190	.288	.082	.903	.224	.316
<i>All</i>		.095	.362	.232	.241	.145	.182	.790	.176	.690
<i>Young</i>	MMP-9	.597	.434	.798	.010*	.010*	.136	.028*	.286	.912
<i>Control</i>		.688	.543	.941	.446	.040*	.640	.947	.817	.788
<i>All</i>		.250	.088	.847	.035*	.001*	.025*	.022*	.951	.707
<i>Young</i>	SMA	.071	.566	.259	.096	.013*	.283	.189	.259	.289
<i>Control</i>		.074	.571	.375	.714	.097	.011*	.487	.362	.474

<i>All</i>		.003	.088	.128	.085	.002*	.019*	.053	.295	.216
<i>Young</i>	Cathepsin	.475	.841	.501	.045*	.082	.514	.666	.642	.302
<i>Control</i>	K	.887	.824	.391	.736	.575	.217	.176	.262	.868
<i>All</i>		.438	.734	.797	.184	.126	.725	.777	.144	.487
<i>Young</i>	FGF-2	.375	.644	.975	.001*	.090	.775	1	.302	.044*
<i>Control</i>		.910	.894	.064	.006*	.110	.182	.841	.868	.249
<i>All</i>		.473	.560	.184	.019*	1	.504	.789	.487	.023*

**Statistically significant difference.*

Table 5. Correlation between expression of proteins and 5-years survival.

<i>Protein</i>	<i>OS</i>	<i>DFS</i>	<i>CSS</i>	<i>OS</i>	<i>DFS</i>	<i>CSS</i>	<i>OS</i>	<i>DFS</i>	<i>CSS</i>
Ki67	.332	.900	.661	.969	.902	.525	.714	.845	.660
p53	.395	.235	.929	.543	.875	.781	.933	.672	.903
p16	.280	.927	.566	.788	.862	.257	.633	.945	.912
Bcl2	.597	.684	.170	.751	.766	.839	.846	.875	.755
Cyclin D1	.871	.990	.550	.307	.330	.512	.503	.489	.954
C-ErbB2	.192	.048*	.203	.707	.345	.572	.281	.058	.719
p21	.343	.508	.236	.166	.253	.172	.776	.744	.925
Myc	.010*	.372	.007*	.001*	.812	.001*	.001*	.425	.001*
EGFR	.873	.225	.217	.640	.238	.989	.877	.860	.753
MMP-9	.764	.939	.238	.655	.886	.985	.598	.696	.851
SMA	.251	.018*	.283	.147	.291	.349	.138	.441	.174
Cathepsin K	.854	.733	.756	.431	.324	.994	.459	.376	.851
FGF-2	.023*	.161	.841	.367	.032*	.480	.386	.376	.305

Abbreviations: *OS*: Overall survival, value *p*; *DFS*: Disease free survival, value *p*; *CSS*: Cancer specific survival, value *p*

*Statistically significant difference.

FIGURE 1. Differences in the immunohistochemical expression of proteins between age groups. **(A)** Nuclei markers. **(B)** Membrane and cytoplasmic markers.

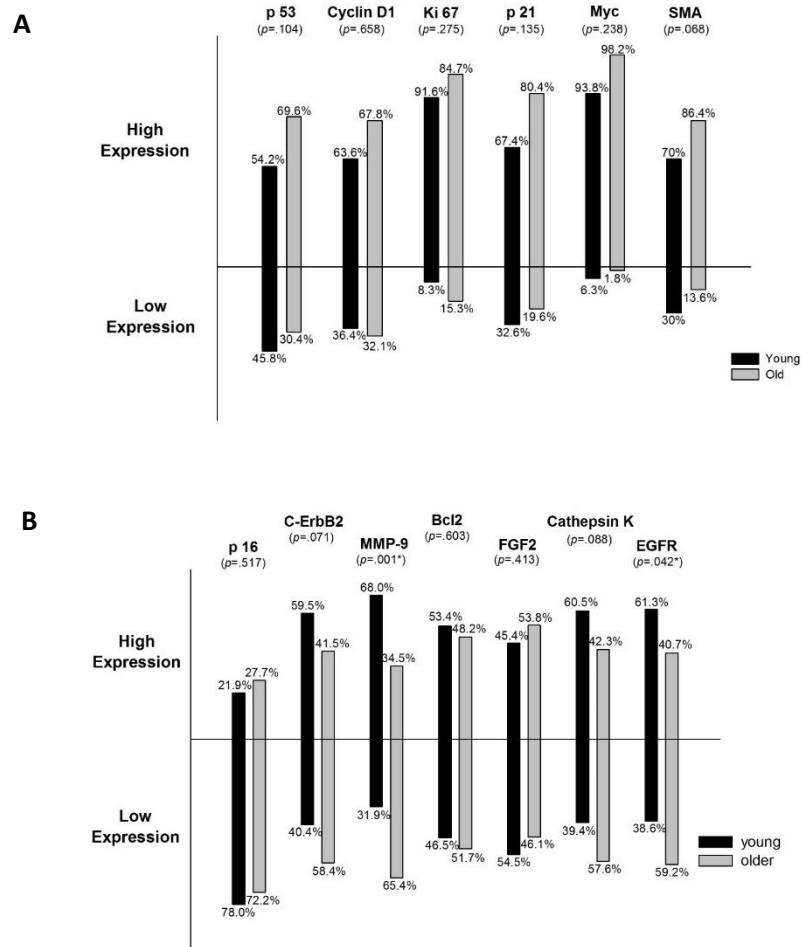
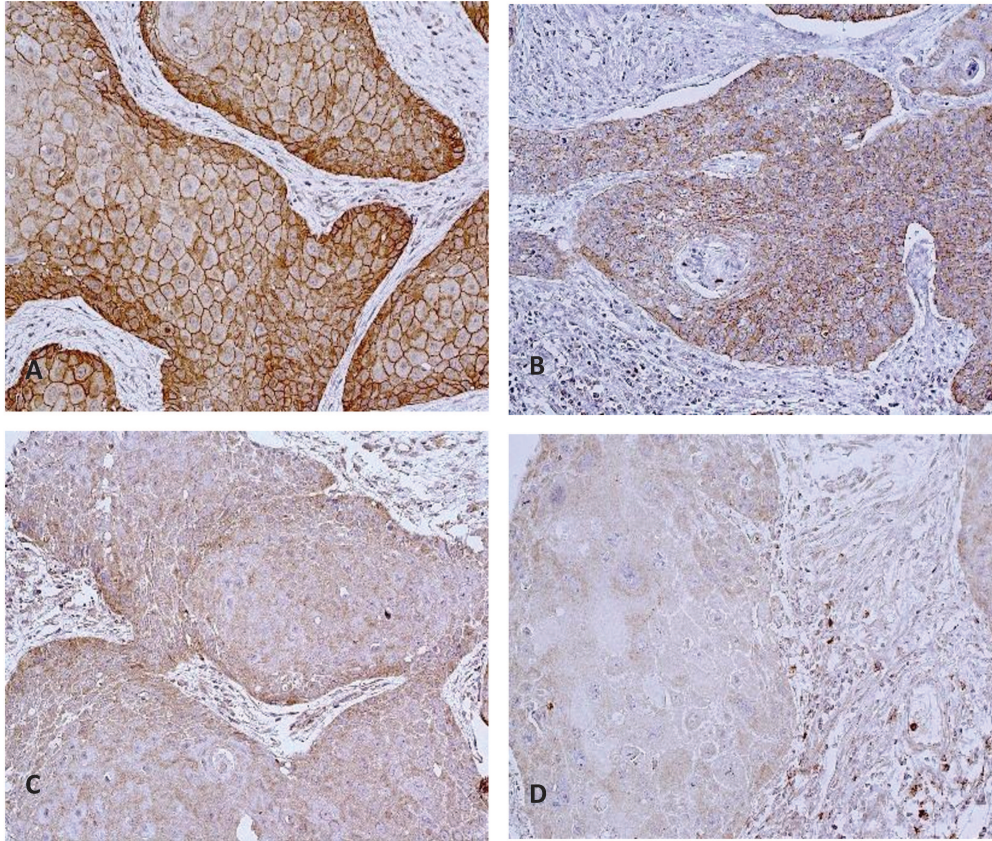


FIGURE 2. Immunohistochemical expression of EGFR in membrane and cytoplasm of neoplastic epithelial cells showing a strong positivity in young (A) and moderate positivity in control patients (B). MMP-9 immunopositivity was observed in cytoplasm of tumor cells with a moderate reactivity in young (C) and weak reactivity in controls (D).



3 CONCLUSÕES

-CCE oral afetando pacientes jovens, menores de 40 anos, apresentam iguais características clinico-patológicas e taxas de sobrevida encontradas nos pacientes acima da quinta década de vida com mesmo diagnóstico, confirmando que o comportamento do CCE oral não é influenciado pela idade.

-Foi identificado uma maior expressão das proteínas EGFR e MMP-9 nos tumores dos pacientes jovens em comparação com os pacientes controle, o que poderia estar associado com o desenvolvimento precoce de CCE oral em indivíduos jovens. Entretanto, o papel biológico dessas proteínas nesse específico grupo etéreo não está completamente estabelecido e precisa posteriores análises com técnicas mais sensíveis à utilizada.

-A expressão das proteínas C-ErbB2 e SMA foram correlacionadas com a sobrevida livre de doença só dos pacientes jovens, sugerindo que podem estar envolvidas no processo de crescimento tumoral neste grupo de indivíduos. Embora, se requer estudos adicionais que identifiquem alterações de proteínas grupais para estabelecer um perfil de expressão proteica que permita um melhor entendimento dos fatores desencadeantes e responsáveis pelas recorrências em pacientes jovens, especialmente aqueles que não apresentam os fatores de risco de tabaco e álcool.

REFERÊNCIAS*

- Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jun;9(6):400-14.
- Abrahao AC, Bonelli BV, Nunes FD, Dias EP, Cabral MG. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res*. 2011 Jan;25(1):34-41.
- Alves R, Raposo K, Correia R, Dantas E, Pereira L, Barboza R. The cytokines and the periodontium: the role of growth factors in periodontal health. *Int J Dent*. 2010. Jan; 9(1):38-43.
- Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*. 2010 Jun;46(6):414-7.
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*. 1993. May;7(5):812-21.
- Baral R, Patnaik S, Das BR. Co-overexpression of p53 and c-myc proteins linked with advanced stages of betel- and tobacco-related oral squamous cell carcinomas from eastern India. *Eur J Oral Sci*. 1998 Oct; 106(5):907-13.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press; 2005.
- Béguelin W, Díaz Flaqué MC, Proietti CJ, Cayrol F, Rivas MA, Tkach M, et al. Progesterone receptor induces ErbB-2 nuclear translocation to promote breast cancer growth via a novel transcriptional effect: ErbB-2 function as a coactivator of Stat3. *Mol Cell Biol*. 2010 Dec;30(23):5456-72.
- Birchall MA. Apoptosis, Mitosis, PCNA 3. and bcl-2 in normal, leukoplakic and malignant epithelia of the oral cavity: Prospective, in vivo study. *Oral Oncol*, 1997;33(6):219-27.
- Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993 May;64: 474-84.
- Bitu CC, Kauppila JH, Bufalino A, Nurmenniemi S, Teppo S, Keinänen M, et al. Cathepsin K is present in invasive oral tongue squamous cell carcinoma in vivo and in vitro. *PLoS One*. 2013 Aug;8(8):e70925.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Coletta RD, Graner E, Lopes MA. Avanços da biologia molecular e o câncer bucal. *Rev Assoc Paul Cir Dent*, 2002; 56:62-67.
- Colomba J, Rahal P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2009; 55(2): 165-174.
- Conacci-Sorrell M, Ngouenet C, Eisenman RN. Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation. *Cell*. 2010 Aug;142(3):480-93.
- Cusumano RJ, Persky MS. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in young adults. *Head Neck Surg*. 1988 Mar-Apr;10(4):229-34.
- Duvvuri U, Myers JN. Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide. *Curr Probl Surg*. 2009 Feb;46(2):114-7.
- Edstrom S, Cvetkovska E, Westin T, Young C. Overexpression of p53-related proteins predicts rapid growth rate of head and neck cancer. *Laryngoscope* 2001 Jan;111(1):124-30.
- Fonseca FP, Coletta RD, Azevedo MB, Prado Ribeiro AC, Pires Soubhia AM, Miyahara GI, et al. Stromal myofibroblasts in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients - a multicenter collaborative study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 Oct;118(4):483-9.
- Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer control* 2002 Sep;9(5):369-78.
- Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003 Oct; 260(9):502-8.
- Hase T, Kawashiri S, Tanaka A, Nozaki S, Noguchi N, Kato K, et al. Correlation of basic fibroblast growth factor expression with the invasion and the prognosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2006 Mar;35(3):136-9.
- Hase T, Kawashiri S, Tanaka A, Nozaki S, Noguchi N, Kato K, et al. Fibroblast growth factor-2 accelerates invasion of oral squamous cell carcinoma. *Oral Sci Int*. 2006 Aug;3:1-9,
- Hassan NM, Tada M, Hamada J, Kashiwazaki H, Kameyama T, Akhter R, et al. Presence of dominant negative mutation of TP53 is a risk of early recurrence in oral cancer. *Cancer Lett*. 2008 Oct;270(1):108-19.
- Hilly O, Shkedy Y, Hod R, Soudry E, Mizrahi A, Hamzany Y, et al. Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: comparison with patients older than 60 years. *Oral Oncol*. 2013 Oct; 49(10):987-90.
- Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2006;12(2):87-91.

- Ibrahim SO, Vasstrand EN, Liavaag PG, Johannessen AC, Lillehaug JR. Expression of c-erbB proto-oncogene family members in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res.* 1997 Nov;17(6D):4539-46.
- Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak S, Prapayasatok S, Jittidecharaks S, et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jan;33(1):84-8.
- Inaoka T, Bilbe G, Ishibashi O, Tezuka K, Kumegawa M, Kokubo T. Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jan; 206(1):89-96.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014.
- Kaminagakura E, Vartanian JG, da Silva SD, dos Santos CR, Kowalski LP. Case-control study on prognostic factors in oral squamous cell carcinoma in young patients. *Head Neck.* 2010 Nov;32(11):1460-6.
- Kaminagakura E, Werneck da Cunha I, Soares FA, Nishimoto IN, Kowalski LP. CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Head Neck.* 2011;33(10):1413-9.
- Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int J Cancer.* 2012 Apr;130(8):1726-32.
- Kowalski LP, Nishimoto IN. Epidemiologia do câncer de boca. In: Parise Jr. O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000.
- Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, et al. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck.* 1999 Oct;21(7):627-38.
- Kuriakose M, Sankaranarayanan M, Nair MK, Cherian T, Sugar AW, Scully C, et al. Comparison of oral squamous cell carcinoma in younger and older patients in India. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1992; 28B(2):113-20.
- Kusukawa J, Harada H, Shima I, Sasaguri Y, Kameyama T, Morimatsu M. The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996 Jul;32B(4):217-21.
- Laimer K, Spizzo G, Gastl G, Obrist P, Brunhuber T, Fong D, et al. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol.* 2007 Feb;43(2):193-8.

- Le Gall C, Bellahcène A, Bonnelye E, Gasser JA, Castronovo V, Green J, et al. A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res.* 2007 Oct;67(20):9894-902.
- Liggett WH Jr, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol.* 1998 Mar;16(3):1197-206.
- Littlewood-Evans AJ, Bilbe G, Bowler WB, Farley D, Wlodarski B, Kokubo T, Inaoka T, Sloane J, Evans DB, Gallagher JA. The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 1997 Dec;57(23):5386-90.
- Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck.* 2006 Mar;28(3):256-69.
- Martin-Granizo R, Rodriguez-Campo F, Naval L, Diaz Gonzalez FJ. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients younger than 40 years. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997 Sep;117(3 Pt 1):268-75.
- Martinez E. Estudo da expressão da α -actina de músculo liso em cultura de células de polpas dentárias e gengivas humanas tratadas com o fator de transformação de crescimento b1(TGF- β 1) [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.
- Monteiro LS, Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Forteza J, Fraga M. EGFR and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma using tissue microarray technology. *J Oral Pathol Med.* 2010 Aug; 39(7):571-8.
- Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000 Jan;122(1):44-51.
- Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Takada K. Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC). *J Oral Pathol Med.* 1994 Nov;23(10):451-6.
- Nair U, Bartsch H, Nair J. Alert for an epidemic of oral cancer due to use of the betel quid substitutes gutkha and pan masala: a review of agents and causative mechanisms. *Mutagenesis.* 2004 Jul;19(4):251-62.
- Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T. Alterations of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett.* 2000 Nov 10;160(1):3-8.

- Nathan CO, Amirghahri N, Rice C, Abreo FW, Shi R, Stucker FJ. Molecular analysis of surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Laryngoscope*. 2002 Dec; 112(12):2129-40.
- Ng IO, Lam KY, Ng M, Regezi JA. Expression of p21/waf1 in oral squamous cell carcinomas correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. *Oral Oncol*. 1999 Jan;35(1):63-9.
- O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001 Jul;127(7):813-20.
- Parise Junior O, Carvalho LV, Miguel RE, Kowalski LP. Prognostic impact of p53, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor on head and neck carcinoma. *Sao Paulo Med J*. 2004 Nov;122(6):264-8.
- Pontes FSC, Carneiro JT, Fonseca FP, Silva TSP, Pontes HAR, Pinto DS. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth: Analysis of survival rate and independent prognostic factors in the Amazon region. *J Craniofac Surg*. 2011 May;22 (3): 925-930.
- Popović B, Jekić B, Novaković I, Luković LJ, Tepavcević Z, Jurisić V, Vukadinović M, Milasin J. Bcl-2 expression in oral squamous cell carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jan;1095:19-25.
- Ribeiro AC, Silva AR, Simonato LE, Salzedas LM, Sundefeld ML, Soubhia AM. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Mar; 47(2):95-8.
- Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett*. 2002 May;179(1):1-14.
- Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28(7):639-48.
- Roskoski R Jr. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*. 2014 Sep; 87:42-59.
- Salo T, Vered M, Bello IO, Nyberg P, Bitu CC, Zlotogorski Hurvitz A, et al. Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call for new therapeutic approaches. *Exp Cell Res*. 2014 Jul;325(2):58-64.
- Santos-Silva AR, Ribeiro AC, Soubhia AM, Miyahara GI, Carlos R, Speight PM, et al. High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. *Histopathology*. 2011 Jun;58(7):1127-35.

- Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res.* 2006 Sep;12(18):5268-72.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987 Jan 9; 235(4785):177-82.
- Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report 2014.* Lyon: IARC Press; 2014.
- Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, et al. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res.* 1995 July;55(14): 2988–94.
- Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S, Reszeć J, Koda M, Baltaziak M, Kańczuga-Koda L. Correlation between Bcl-2 protein expression and some clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma. *Pol J Pathol.* 2003;54(1):49-52.
- Sumioka S, Sawai NY, Kishino M, Ishihama K, Minami M, Okura M. Risk factors for distant metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Jul;71(7):1291-7.
- Sun Q, Fang Q, Guo S. A comparison of oral squamous cell carcinoma between young and old patients in a single medical center in China. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Aug 15;8(8):12418-23.
- Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol.* 2005 Mar;32 Suppl 1:S59-66.
- Tatemoto Y, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T, Ueta E, Kimura T. Expression of p53 and p21 proteins in oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and response to chemoradiotherapy. *Pathol Res Pract.* 1998;194(12):821-30.
- Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol* 2005 Dec;86(6):347-63.
- Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, et al. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(1):51-61.
- Toner M, O'Regan EM. Head and neck squamous cell carcinoma in the young: a spectrum or a distinct group? Part 1. *Head Neck Pathol.* 2009 Sep;3(3):246-8.
- Toner M, O'Regan EM. Head and neck squamous cell carcinoma in the young: a spectrum or a distinct group? Part 2. *Head Neck Pathol.* 2009 Sep; 3(3):249-51.
- Udyavara S, Choudaha N, Kasetty S, Satish P J, Kallianpur S, Tijare M. Stromal myofibroblasts in nonmetastatic and metastatic oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *Oral Maxillofac Pathol.* 2013 May; 17(2): 190–194.
- Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, et al. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol.* 2008 Apr;44(4):315-24.

- Van Monsjou HS, Wreesmann VB, Van den Brekel MW, Balm AJ. Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oral Oncol.* 2013 Dec; 49(12):1097-102.
- Vojtěšek B, Bártek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* 1992 Jul; 151:237-44.
- Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol.* 2002 Jan;20(1):189-94.
- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):309-16.

ANEXOS

1 -TABELA 1. CORRELAÇÕES ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E A SOBREVIDA DE 5 ANOS.

Variable	Category	Young						Control						All					
		OS (%)	p value	DFS (%)	p value	CSS (%)	p value	OS (%)	p value	DFS (%)	p value	CSS (%)	p value	OS (%)	p value	DFS (%)	p value	CSS (%)	p value
Sex	Male	39.7	.059	23.5	.255	50.7	.187	50.4	.663	60.7	.964	50.7	.964	42.5	.350	31.6	.184	52	.420
	Female	66.7		40.4		66.7		45.7		64.3		64.3		55.8		60.3		65.6	
Tobacco consumption	Yes	39.8	.034*	26.9	.765	51.6	.130	62.5	.622	45.2	.534	49.5	.526	45.7	.090	38.3	.899	51.4	.192
	No	64.3		20		64.3		41.3		50		71.4		63.6		35		66.7	
Alcohol consumption	Yes	42.4	.678	24.8	.763	56.3	.890	37.1	.753	39.9	.867	45.1	.973	51.3	.701	34.2	.899	51.3	.885
	No	50		26.5		46.6		52.8		50.4		60.3		40.1		40.7		56.2	
Anatomical site	Tongue	47.8	.919	17.1	.276	53	.616	55.2	.010*	58.8	.038*	63.9	.006	49.4	.043*	46.2	.197	58.7	.015*
	Floor	61.1		33.2		66.2		61.7		53.5		76.4		57.2		43		72.2	
	Other	45.8		28.1				30.3		0.85		13.3		25.5		16		30.2	
T classification	T1/T2	74.3	.001*	53.5	.040*	80.4	.001*	75.2	.001*	58	.028*	77.8	.001*	74.9	.001*	57	.001*	79.7	.001*
	T3/T4	24.7		19.7		34.7		22.8		33		33.6		23.9		26.8		34.3	
N classification	N0	84.6	.001*	0	.465	92.3	.001*	60	.744	0	.324	60	.917	77.8	.003*	75	.686	83.3	.007*
	N1-N3	35.1		27.9		44.1		43.5		42.7		53.5		40.1		37.2		50	
Clinical stage	I/II	77.8	.001*	21.4	.829	77.8	.008*	72.5	.078	68.8	.183	79.1	.124	75.9	.001*	49.2	.237	78.7	.004*
	III/IV	31.9		29.7		45.4		38		39		47.8		35.6		35.4		46.9	
Histological differentiation	I	50.1	.088	31.1	.914	55.2	.635	40.3	.663	37.9	.001*	42.3	.150	46.2	.119	35.6	.119	57.9	.097
	II	53.3		17.5		31		54.1		55.6		46.2		53.3		45.5		58.2	
	III	0		40		13.8		37.5		0		11.5		16.7		17.1		0	
Surgical margins	Negative	45.4	.001*	33	.129	57.3	.001*	59.1	.001*	53.5	.002*	72.1	.001*	52.1	.001*	44.5	.001*	65	.001*
	Positive	0		0		0		0		37.5		0		0		23.1		0	

Abreviações: OS: Sobrevida geral; DFS: Sobrevida livre da doença; CSS: Sobrevida câncer específica.

*Diferenças estatisticamente significativas.

2 – TABELA 2. CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS E AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS.

Group	Protein	Sex		Tobacco		Alcohol		Anatomical site			T		N		Clinical stage		Histological Differentiation			Surgical margins		
		Male	Female	No	Yes	No	Yes	Tongue	Floor mouth	Other	T1/ T2	T3/ T4	N0	N1- N3	I/ II	III/ IV	I	II	III	Negative	Positive	
Young	Ki67	Low	12.1	0	0	6.2	6.2	3.4	4.0	16.7	9.1	0	13.8	0	10	0	11.1	13.3	0	0	7.1	16.7
		High	87.9	100	100	93.8	93.8	96.4	96.0	83.3	90.9	100	86.2	100	90	100	88.9	86.7	100	100	92.9	83.3
		p value	.159		.356		.662		.424		.091		.350		.228		.311		.455			
		Low	16.7	9.1	0	16.3	16.7	13.9	7.1	41.7	10.5	4.8	21.1	0	15.8	0	17.6	17.9	4.5	25	6.3	0
		High	83.3	90.9	100	83.7	83.3	86.1	92.9	58.3	89.5	95.2	78.9	100	84.2	100	82.4	82.1	95.5	74	93.8	100
		p value	.528		.362		.786		.016*		.096		.542		.197		.288		.607			
All	Ki67	Low	92.3	73.4	0	12.3	11.8	9.2	5.7	20.2	10	2.5	17.9	0	13.4	0	14.9	15.5	3.1	10	6.7	10
		High	7.7	26.6	100	87.7	88.2	90.8	94.3	70.8	90	97.5	82.1	100	86.6	100	85.1	84.5	96.9	90	93.3	90
		p value	.181		.116		.691		.013*		.018*		.217		.065		.197		.705			
Young	p53	Low	45.5	46.7	33.3	51.5	37.5	51.7	45.8	53.8	36.4	45	46.4	44.4	46.2	30.8	51.4	38.7	50	60	32.1	83.3
		High	54.5	53.3	66.7	48.5	62.5	48.3	54.2	46.2	63.6	55	53.6	55.6	53.8	69.2	48.6	61.3	50	40	67.9	16.7
		p value	.938		.280		.360		.693		.922		.926		.202		.602		.061			
		Low	32.6	20	20	30.4	27.8	30.3	26.9	41.7	27.8	30	30.6	50	29.6	28.6	30.6	15.4	42.9	50	34.5	0
		High	67.4	80	80	69.6	72.2	69.7	73.1	58.3	72.2	70	69.4	50	70.4	71.4	69.4	84.6	57.1	50	65.5	100
		p value	.432		.627		.850		.629		.965		.538		.913		.078		.289			
All	p53	Low	76.9	75.4	29.4	39.2	32.4	40.3	36	48	31	37.5	37.5	45.5	36.5	30	39.3	28.1	45.2	55.6	33.3	50
		High	23.1	24.6	70.6	60.8	67.6	59.7	64	52	69	62.5	62.5	54.5	63.4	70	60.7	71.9	54.8	44.6	66.7	50
		p value	.859		.448		.440		.419		1		.564		.441		.124		.311			
Young	p16	Low	78.1	21.9	72.7	81.5	69.2	84	81	70	80	80	76.9	57.1	82.4	66.7	81.3	72	88.9	80	75	66.7
		High	33.3	66.7	27.3	18.5	30.8	16	19	30	20	20	23.1	42.9	17.6	33.3	18.8	28	11.1	20	25	33.3
		p value	.011*		.548		.289		.77		.883		.142		.350		.579		.680			
		Low	87.2	60	80	72.1	70.6	74.2	61.5	83.3	81.3	60	79.4	0	76.5	50	76.1	72	65	75	75	50
		High	12.8	40	20	27.9	29.4	25.8	38.5	16.7	18.8	40	20.6	100	23.5	50	23.9	28	35	25	25	50
		p value	.026*		.706		.788		.238		.884		.004*		.128		.852		.298			
All	p16	Low	83.1	50	75	75.7	70	78.6	70.2	77.3	80.8	68.6	78.3	40	78.8	58.8	78.2	72	72.4	77.8	75	60
		High	16.9	50	25	24.3	30	21.4	29.8	22.7	19.2	31.4	21.7	60	21.2	41.2	21.8	28	27.6	22.2	25	40
		p value	.001*		.952		.378		.581		1		.008*		.096		.937		.330			
Young	Bcl-2	Low	70	69.6	50	46.7	53.3	44	47.6	45.5	45.5	56.3	40.7	57.1	44.4	50	45.5	43.3	71.4	25	42.3	60
		High	30	30.4	50	53.3	46.7	56	52.4	54.5	54.5	43.8	59.3	42.9	55.6	50	54.5	56.7	28.6	75	57.7	40
		p value	.975		.855		.567		.990		.324		.538		.801		.271		.467			
		Low	72.4	92.6	60	52.2	55.6	51.5	52	50	52.6	45	55.6	50	51.9	57.1	51	51.9	40	75	44.8	75
		High	27.6	7.4	40	47.8	44.4	48.5	48	50	47.4	55	44.4	50	48.1	42.9	49	48.1	60	25	55.2	25
		p value	.049*		.739		.782		.989		.449		.959		.762		.403		.258			

All		Low	71.4	82	53.3	50	54.5	48.3	50	47.8	50	50	49.2	55.6	48.9	52.9	48.8	47.4	48.1	50	43.6	66.7
		High	28.6	18	46.7	50	45.5	51.7	50	52.2	50	50	50.8	44.4	51.1	47.1	51.2	52.6	51.9	50	56.4	33.3
		p value	.213		.813		.565			.983		.939		.703		.755			.990		.199	
Young		Low	34.5	40	41.7	37.9	43.8	36	39.1	36.4	30	38.9	34.6	66.7	28.6	54.5	30.3	33.3	50	40	37.5	50
		High	65.5	60	58.3	62.	56.3	64	60.9	63.6	70	61.1	65.4	33.3	71.4	45.5	69.7	66.7	50	60	62.5	5
		p value	.718		.823		.620			.882		.772		.053		.169			.648		.660	
Control	Cyclin D1	Low	26.1	60	16.7	35.6	44.4	27.3	37.5	15.4	30	33.3	31.4	100	29.6	28.6	32.7	30.8	42.9	25	36.7	25
		High	73.9	40	83.3	64.4	55.6	72.7	62.5	84.6	70	66.7	68.6	0	70.3	71.4	67.3	69.2	57.1	75	63.3	75
		p value	.037*		.826		.214			.336		.883		.099		1			.624		1	
All		Low	64.7	80.3	33.6	36.5	44.1	31	38.3	25	34.5	35.9	32.8	72.7	29.2	44.4	31.7	32.1	45.2	33.3	37	40
		High	35.3	19.7	66.7	63.5	55.9	69	61.7	75	65.5	64.1	67.2	24.3	70.8	55.6	68.3	67.9	54.8	66.7	63	60
		p value	.088		.802		.207			.534		.749		.004*		.302			.475		.859	
Young		Low	68.4	71.4	36.4	45.5	46.7	41.4	47.8	30.8	36.4	38.9	41.4	44.4	39.5	33.3	42.9	38.7	20	75	40.7	50
		High	31.6	28.6	63.6	54.5	53.3	58.6	52.2	69.2	63.6	61.1	58.6	55.6	60.5	66.7	57.1	61.3	80	25	59.3	50
		p value	.825		.598		.737			.576		.866		.785		.562			156		.678	
Control	C-erbB2	Low	77.4	90.9	40	60.5	55.6	60	45.8	81.8	61.1	55	60.6	0	60.8	28.6	63	50	50	100	44.4	50
		High	22.6	9.1	60	39.5	44.4	40	54.2	18.2	38.9	45	39.4	100	39.2	71.4	37	50	50	0	55.6	50
		p value	.197		.380		.762			.129		.688		.087		.085			.158		.835	
All		Low	74	80	37.5	53.9	51.5	50.8	46.8	54.2	51.7	47.4	51.6	36.4	51.7	31.6	54.3	43.6	40	87.5	42.6	50
		High	26	20	62.5	46.1	48.5	49.2	53.2	45.8	48.3	52.6	48.4	63.6	48.3	68.4	45.7	56.4	60	12.5	57.4	50
		p value	.476		.232		.951			.822		.680		.338		.074			.047*		.664	
Young		Low	37.5	21.4	16.7	35.5	35.3	26.9	25	41.7	40	16.7	42.9	22.2	35.1	18.2	37.1	34.5	22.2	50	26.9	50
		High	62.5	78.6	83.3	64.5	64.7	73.1	75	58.3	60	83.3	57.1	77.8	64.9	81.8	62.9	65.5	77.8	50	73.1	50
		p value	.285		.228		.559			.515		.064		.459		.242			.537		.27	
Control	p21	Low	17.4	30	40	19.6	33.3	15.2	19.2	16.7	22.2	20	19.4	0	20.4	28.6	18.4	20	18.2	25	20.7	0
		High	82.6	70	60	80.4	66.7	84.8	80.8	83.3	77.8	80	80.6	100	79.6	71.4	81.6	80	81.8	75	79.3	100
		p value	.363		.234		.564			.930		.067		.476		.525			.949		.315	
All		Low	76.9	76.3	23.5	26	34.3	20.3	22	29.2	28.6	18.4	29.7	18.2	26.4	22.2	26.2	27.8	19.4	40	23.6	30
		High	23.1	23.7	76.5	74	65.7	79.7	78	70.8	71.4	81.6	70.3	81.8	73.6	77.8	73.8	72.2	80.6	60	76.4	70
		p value	.950		.834		.134			.729		.207		.556		.726			.407		.667	
Young		Low	6.1	6.7	8.3	6.1	11.8	3.6	8.3	0	9.1	10.5	3.4	11.1	5.1	7.7	5.7	0	22.2	20	6.9	16.7
		High	93.9	93.3	91.7	93.9	88.2	96.4	91.7	100	90.9	89.5	96.6	88.9	94.9	92.3	94.3	100	77.8	80	93.1	83.3
		p value	1		.787		.285			.550		.322		.504		.801			.025*		.436	
Control	Myc	Low	2.2	0	0	2.2	0	3	0	0	5.9	0	2.9	0	1.9	0	2	0	4.8	0	3.4	100
		High	97.8	100	100	97.8	100	97	100	100	94.1	100	97.1	100	98.1	100	98	100	95.2	100	96.6	0
		p value	.618		.712		.456			.311		.434		.846		.703			.483		.706	
All		Low	75	75	5.6	38	5.7	3.3	3.9	0	7.1	5	3.1	9.1	3.2	5	3.6	0	10	11.1	5.2	10
		High	25	25	94.4	96.2	94.3	96.7	96.1	100	92.9	95	96.9	90.9	96.8	95	96.4	100	90	88.9	94.8	90
		p value	1		.744		.565			.402		.629		.339		.765			.044*		.549	
Young		Low	82.4	59.3	25	41.4	26.7	42.3	36.4	41.7	40	29.4	44.4	37.5	38.9	40	38.2	44.8	12.5	40	33.3	66.7
		High	17.6	40.7	75	58.6	73.3	57.7	63.6	58.3	60	70.6	55.6	62.5	61.1	60	61.8	55.2	87.5	60	66.7	33.3

Control	EGFR	<i>p value</i>	.109		.322		.317		.950		.319		.942		.920		.248		.136			
		Low	84.4	81.8	75	55.6	82.4	43.8	45.8	66.7	72.2	50	64.7	0	61.5	57.1	59.6	65.4	42.1	75	51.9	25
		High	15.6	18.2	25	44.4	17.6	56.3	54.2	33.3	27.8	50	35.3	100	38.5	42.9	40.4	34.6	57.9	25	48.1	75
All		<i>p value</i>	.804		.451		.009*		.190		.288		.082		.903		.224		.316			
		Low	83.7	69.4	37.5	50	56.3	43.1	41.3	54.2	60.7	40.5	55.7	30	52.3	47.1	50.6	54.5	33.3	55.6	43.1	50
		High	16.3	30.6	62.5	50	43.8	56.9	58.7	45.8	39.3	59.5	44.3	70	47.7	52.9	49.4	45.5	66.7	44.4	56.9	50
<i>p value</i>			.095		.362		.232		.241		.145		.182		.790		.176		.690			
Young		Low	73.3	65.6	18.2	30.3	25	28.6	13	61.5	36.4	10.5	46.4	11.1	36.8	7.7	41.1	38.7	11.1	40	35.7	33.3
		High	26.7	34.4	81.8	69.7	75	71.4	87	38.5	63.6	89.5	53.6	88.9	63.2	92.3	58.8	61.3	88.9	60	64.3	66.7
		<i>p value</i>	.597		.434		.798		.010*		.010*		.136		.028*		.286		.912			
Control	MMP-9	Low	83.3	78.9	50	65.2	64.7	63.6	57.7	66.7	76.5	47.4	75	50	66	66.7	65.3	64	66.7	50	57.1	50
		High	16.7	21.1	50	34.8	35.3	36.4	42.3	33.3	23.5	52.6	25	50	34	33.3	34.7	36	33.3	50	42.9	50
		<i>p value</i>	.688		.543		.941		.446		.040*		.640		.947		.817		.788			
All		Low	80.4	70.6	26.7	50.6	45.4	47.5	36.7	64	60.7	28.9	62.5	18.2	53.8	26.3	55.4	50	50	44.4	46.4	40
		High	19.6	29.4	73.3	49.4	54.5	52.5	63.3	36	39.3	71.1	37.5	81.8	46.2	73.7	44.6	50	50	55.6	53.6	60
		<i>p value</i>	.250		.088		.847		.035*		.001*		.025*		.022*		.951		.707			
Young		Low	21.4	50	36.4	26.9	40	22.7	43.5	11.1	12.5	50	13.6	44.4	25.8	45.5	24.1	36	25	0	22.7	0
		High	78.6	50	63.6	73.1	60	77.3	56.5	88.9	87.5	50	86.4	55.6	74.2	54.5	75.9	64	75	100	77.3	100
		<i>p value</i>	.071		.566		.259		.096		.013*		.283		.189		.259		.289			
Control	SMA	Low	8.3	37.5	40	11.1	21.4	11.	17.4	12.5	7.7	25	7.1	100	11.6	25	12.5	9.5	23.5	0	14.8	0
		High	91.7	62.5	60	88.9	78.6	88.9	82.6	87.5	92.3	75	92.9	0	88.4	75	87.5	90.5	76.5	100	85.2	100
		<i>p value</i>	.074		.571		.375		.714		.097		.011*		.487		.362		.474			
All		Low	50	83.3	37.5	17.5	31	16.3	30.4	11.8	95	38.2	10	50	17.6	40	17.4	23.9	24	0	18.4	0
		High	50	16.7	62.5	81.3	69	83.7	69.6	88.2	90.5	61.8	90	50	82.4	60	82.6	76.1	76	100	81.6	100
		<i>p value</i>	.003		.088		.128		.085		.002*		.019*		.053		.295		.216			
Young		Low	80	69.6	33.3	37	42.9	31.8	17.6	54.5	60	21.4	50	28.6	41.9	33.3	41.4	38.5	57.1	33.3	43.5	25
		High	20	30.4	66.7	63	57.1	68.2	82.4	45.5	40	78.6	50	71.4	58.1	66.7	58.6	61.5	42.9	66.7	56.5	75
		<i>p value</i>	.475		.841		.501		.045*		.082		.514		.666		.642		.302			
Control	Cathepsin K	Low	83.3	81.8	60	54.8	47.1	60	56	50	64.7	52.6	60.6	100	56	83.3	54.3	56	68.4	25	64.3	75
		High	16.7	18.2	40	45.2	52.9	40	44	50	35.3	47.4	39.4	0	44	16.7	45.7	44	31.6	75	35.7	25
		<i>p value</i>	.887		.824		.391		.736		.575		.217		.176		.262		.868			
All		Low	82.2	75.6	42.9	47.8	45.2	48.1	40.5	52.4	63	39.4	56.1	44.4	50.6	53.3	49.3	47.1	65.4	28.6	54.9	50
		High	17.8	24.4	57.1	52.2	54.8	51.9	59.5	47.6	37	60.6	43.9	55.6	49.4	46.7	50.7	52.9	34.6	71.4	45.1	50
		<i>p value</i>	.438		.734		.797		.184		.126		.725		.777		.144		.487			
Young		Low	62.5	75	60	51.6	53.3	53.8	81	15.4	50	70.6	44.4	50	55.6	54.5	54.5	57.1	55.6	20	48.1	0
		High	37.5	25	40	48.4	46.7	46.2	19	84.6	50	29.4	55.6	50	44.4	45.5	45.5	42.9	44.4	80	51.9	100
		<i>p value</i>	.375		.644		.975		.001*		.090		.775		1		.302		.044*			
Control	FGF-2	Low	89.3	82.1	50	46.5	64.7	36.7	26.1	41.7	76.5	31.6	54.5	100	48	50	45.7	50	42.1	50	56	25
		High	16.7	17.9	50	53.5	35.3	63.3	73.9	58.3	23.5	68.4	45.5	0	52	50	54.3	50	57.9	50	44	75
		<i>p value</i>	.910		.894		.064		.006*		.110		.182		.841		.868		.249			

All	Low	72.9	79.2	57.1	48.6	59.4	44.6	52.3	28	66.7	50	50	40	51.2	52.9	49.4	53.8	46.4	33.3	51.9	11.1
	High	27.1	20.8	42.9	51.4	40.6	55.4	47.7	72	33.3	50	50	60	48.8	47.1	50.6	46.2	53.6	66.7	48.1	88.9
	<i>p value</i>	<i>.473</i>		<i>.560</i>		<i>.184</i>		<i>.019*</i>		<i>1</i>		<i>.504</i>		<i>.789</i>		<i>.487</i>		<i>.023*</i>			

**Diferenças estatisticamente significativas.*

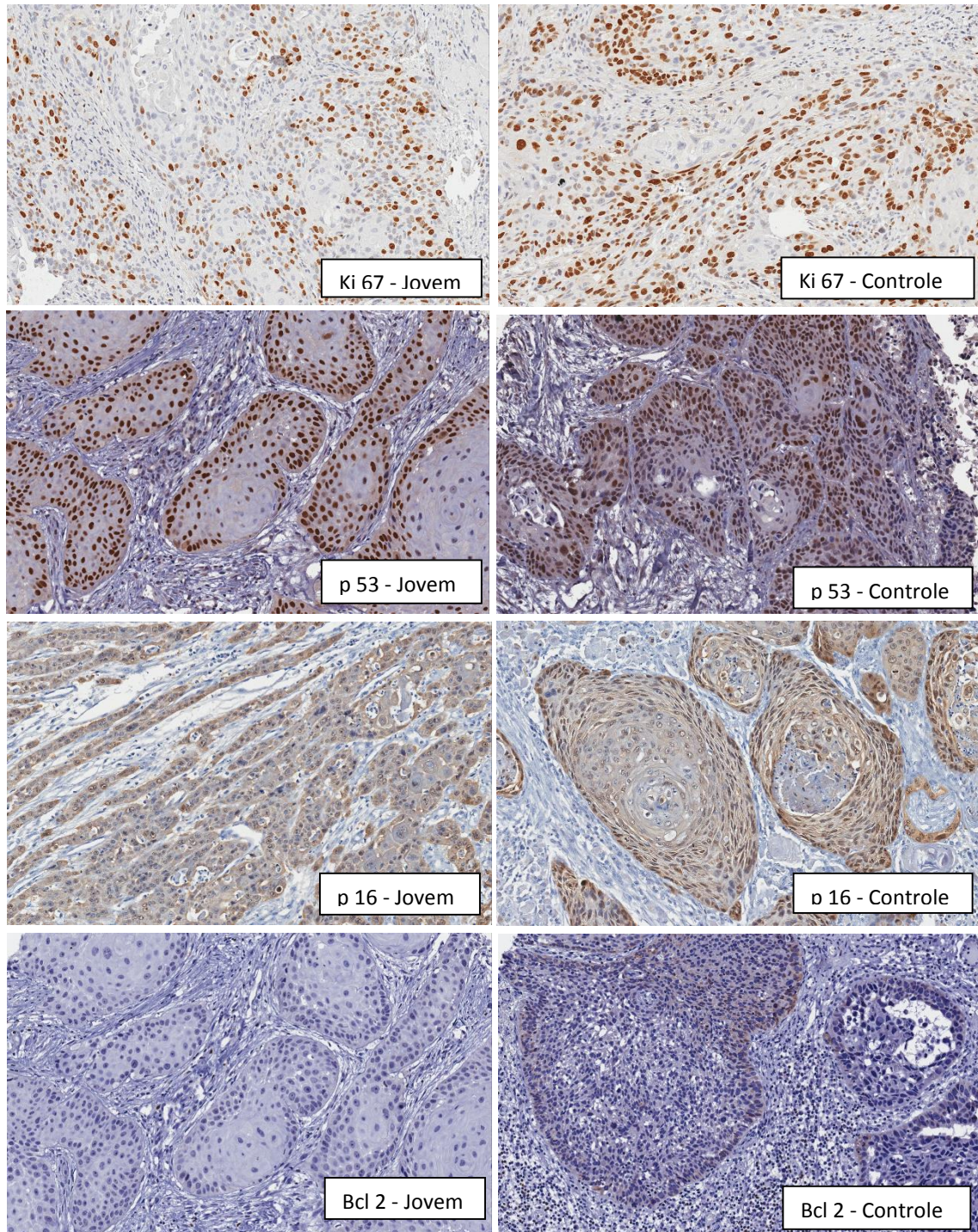
3 – TABELA 3. CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS E A SOBREVIDA DE 5 ANOS.

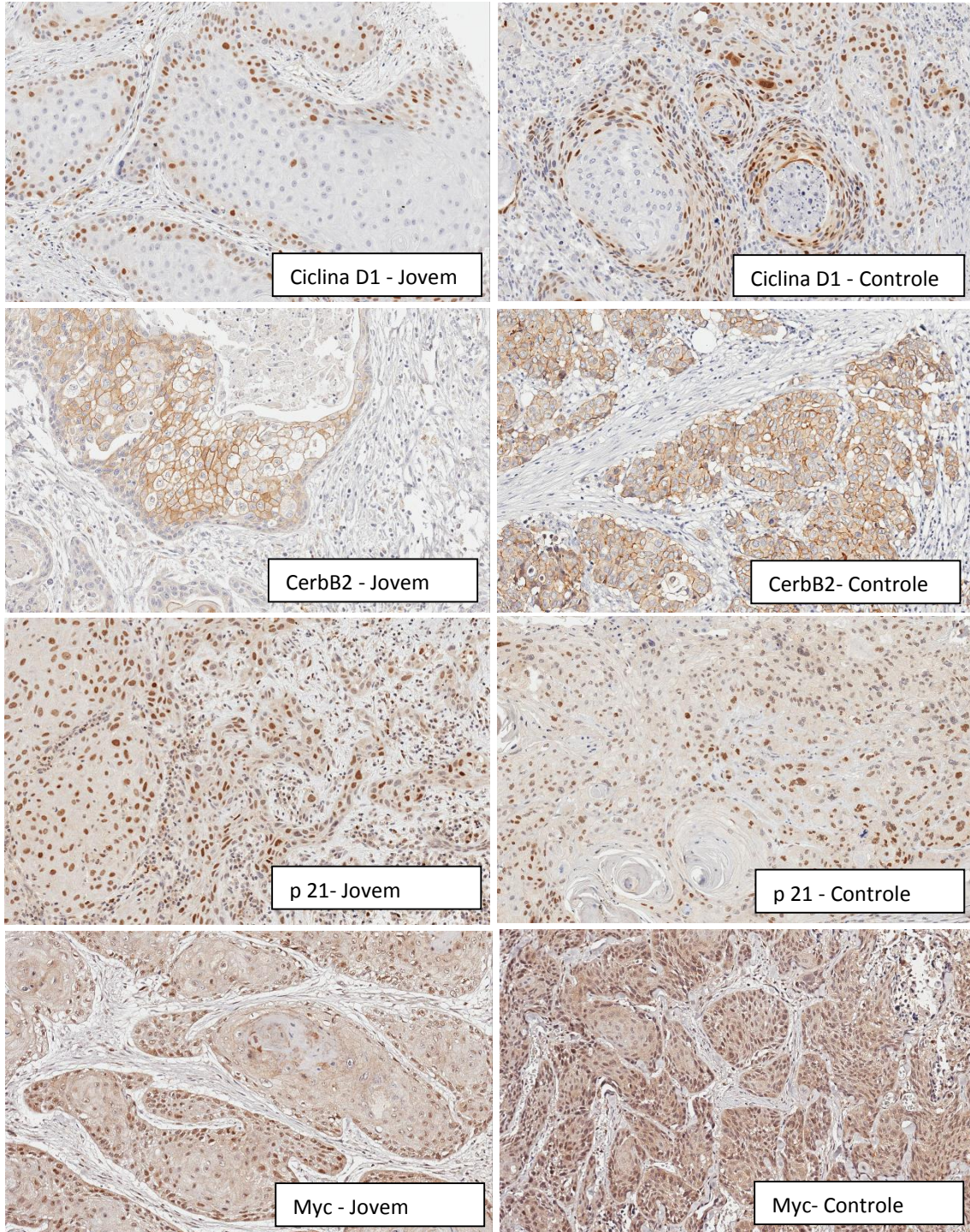
Protein	Category	Young						Control						All					
		OS (%)	p value	DFS (%)	p value	CSS (%)	p value	OS (%)	p value	DFS (%)	p value	CSS (%)	p value	OS (%)	p value	DFS (%)	p value	CSS (%)	p value
Ki67	Low	25	.332	33.3	.900	50	.661	41.7	.969	41.5	.902	56.3	.525	36.9	.714	35.3	.845	52.5	.660
	High	45.6		23.8		54.4		41.2		39		47.6		43.1		33.3		50.8	
p53	Low	38.8	.395	24.8	.235	56.5	.929	42	.543	44	.875	44.8	.781	40.1	.933	35.8	.672	50.8	.903
	High	52.4		30.4		54.9		42.4		39.3		53.5		46.3		36.1		54.4	
p16	Low	37.5	.280	24.7	.927	84.6	.566	39.7	.788	33.2	.862	85.9	.257	38.5	.633	30	.945	49.1	.912
	High	62.5		0		66.7		44.4		52.7		-		49.7		44.7		51.8	
Bcl2	Low	34.2	.597	33.8	.684	77.8	.170	39.3	.751	38.5	.766	81.3	.839	37.1	.846	36.6	.875	48	.755
	High	47.8		30.3		-		40.7		35.5		90.9		44.3		33.7		52	
Cyclin D1	Low	42.9	.871	33.8	.990	42.9	.550	49.7	.307	55	.330	55.9	.512	45.7	.503	43.2	.489	49.5	.954
	High	48.5		20.7		62.2		35.9		29.1		44.2		41		26.6		52.4	
C-ErbB2	Low	26.9	.192	0.8	.048*	-	.203	36.5	.707	30.6	.345	87.5	.572	32.7	.281	23.3	.058	48.6	.719
	High	60.2		43.4		78.6		53.2		51.5		79.5		56.7		48.7		58.3	
p21	Low	32	.343	20.8	.508	40	.236	47.1	.166	54.5	.253	53	.172	39.2	.776	34.3	.744	48	.925
	High	51.2		32.3		61.1		37.9		33.5		46		42.7		33.1		51.8	
Myc	Low	0	.010*	-	.372	0	.007*	0	.001*	-	.812	0	.001*	0	.001*	0	.425	0	.001*
	High	47.6		25		57.1		44.9		43.4		53.2		46		36.6		55.3	
EGFR	Low	44.9	.873	41.7	.225	-	.217	39.7	.640	32.3	.238	79.6	.989	42.1	.877	35.3	.860	51.6	.753
	High	46.8		0		81.8		50.9		59.6		80.8		48.6		37.5		54.7	
MMP-9	Low	40	.764	32.9	.939	-	.238	33.7	.655	39.2	.886	84	.985	34.8	.598	37.1	.696	46.5	.851
	High	48.3		26.4		78.6		61.8		55.3		85.7		53.3		37.2		57.8	
SMA	Low	63.6	.251	37.5	.018*	66.7	.283	66.7	.147	75	.291	66.7	.349	64.7	.138	55.6	.441	66.7	.174
	High	42.5		26		54.6		44		38.3		47.1		43.3		33.7		50.5	
Cathepsin K	Low	48.1	.854	32.4	.733	85.7	.756	33.4	.431	42.9	.324	77.9	.994	38.7	.459	38.5	.376	51.3	.851
	High	47.6		31.3		77.8		53.2		33.7		77.9		50		33.9		54.1	
FGF-2	Low	55.9	.023*	46.2	.161	83.3	.841	36.1	.367	22.6	.032*	88.9	.480	41	.386	31.7	.376	51.4	.305
	High	33.3		14.3		85.7		49.1		52		91.7		42.6		38.6		49.3	

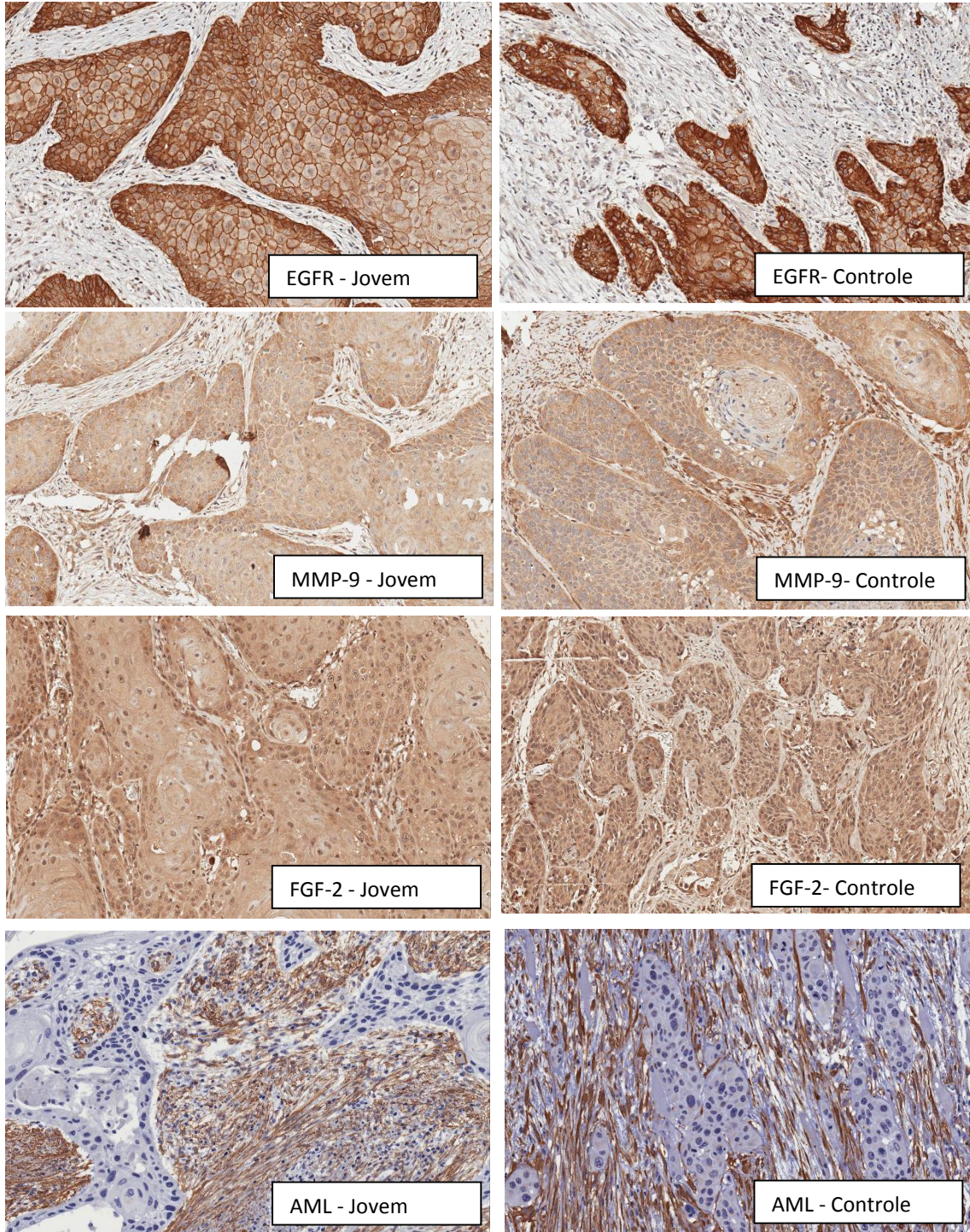
Abreviações: OS: Sobrevida geral; DFS: Sobrevida livre da doença; CSS: Sobrevida câncer específica.

*Diferenças estatisticamente significativas.

4 – FIGURA 1. EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS ESTUDADAS.







5 - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**A.C. Camargo
Cancer Center**

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 18 de novembro de 2014.

Ao
Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski.

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1957/14
"Análise das características clinicopatológicas, imunexpressão de proteínas do ciclo celular e invasão local, ploidia do DNA e prevalência de HPV-DNA, no carcinoma de células escamosas de boca em pacientes jovens"

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/11/2014, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 09/09/2014, aprovaram a realização do projeto (datado de 2014) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP);
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Câncer de Barretos;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Cronograma do Estudo.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

Atenciosamente,


Dr. Antônio Hugo José Frões Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Rua Professor Antônio Prudente, 211 • Liberdade • São Paulo / SP • CEP 01509-900
 (11) 2189-5000 • www.accamargo.org.br



A.C. Camargo
Cancer Center

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 31 de julho de 2015.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Sra. Marisol Miranda Galvão, é co-pesquisadora do Projeto: "Análise das características clinicopatológicas, imunexpressão de proteínas do ciclo celular e invasão local, ploidia do DNA e prevalência de HPV-DNA, no carcinoma de células escamosas de boca em pacientes jovens", aprovado neste CEP sob o Registro nº 1957/14, em reunião de 11/11/2014, tendo como pesquisador responsável: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski.

Atenciosamente,



Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

6 – CERTIFICADO SUBMISSÃO DO ARTIGO

Dear Miss. Miranda,

Your submission entitled "Immunohistochemical expression of regulatory proteins of cell cycle and local invasion in oral squamous cell carcinoma affecting young patients." has been received by journal Oral Oncology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial Systems as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/oo/>.

Your username is: m.miranda.galvis@gmail.com

If you need to retrieve password details please go to: http://ees.elsevier.com/oo/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Oral Oncology