

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DO BCL-2 COM PARÂMETROS CLÍNICO-MORFOLÓGICOS NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA DE PACIENTES JOVENS E IDOSOS

Aristócles Hitallo Bezerra (1); Paulyanna Farias Trajano (1); Jéssica Sousa Brito (1); Pollianna Muniz Alves (2)

1. Alunos de iniciação científica/ Curso de Odontologia, Campus I, UEPB
2. Professora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

EMAIL: hitallo95@gmail.com

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) corresponde a 95% das neoplasias malignas da cavidade oral, acometendo preferencialmente indivíduos entre a quinta e sétima década de vida. No entanto, a incidência do CCEO em pacientes jovens tem aumentado nos últimos anos, demonstrando comportamento biológico mais agressivo. Sendo assim, o estudo avaliou a imunexpressão do Bcl-2 em casos de CCE de língua (CCEL) em jovens e idosos, associando-a com parâmetros clínico-morfológicos. A amostra foi constituída de 55 casos de CCEL, diagnosticados nos dois hospitais de referência em oncologia da Paraíba, nos últimos 16 anos, dividida em grupos: jovens (≤ 45 anos) ($n=25$) e idosos (≥ 60 anos) ($n=30$). Os parâmetros clínicos foram obtidos através dos prontuários médicos. Para análise morfológica, utilizou-se os Sistemas de Gradação Histopatológico de Malignidade (SGHM), propostos por Bryne et al, (1992) e pela OMS (2005). Em seguida, foi realizada a técnica da imunistoquímica objetivando-se avaliar quantitativamente a imunexpressão do Bcl-2 nas células neoplásicas. Para análise estatística foram utilizados os testes Qui-quadrado e Mann-Whitney, com valor de $p < 0,05$. Quanto aos parâmetros clínicos, observamos que 65,4% dos casos ($n=36$) acomete homens. Quanto ao estadiamento clínico e aos SGHM, 58,1% ($n=32$) apresentava-se em estágios I/II, classificados como Moderado/ pobremente diferenciados ($n=37$; 67,2%) e com Alto grau de malignidade ($n=40$; 72,7%). Para imunomarcagem do Bcl-2, houve diferença estatisticamente significativa entre os casos de CCEL em jovens e idosos ($p=0,046$). A maior imunexpressão do Bcl-2 ocorreu em indivíduos idosos, sugerindo comportamento biológico mais agressivo, podendo estar relacionada à maior sobrevivência das células neoplásicas.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas, indivíduos jovens, estadiamento clínico, apoptose, imunistoquímica.

INTRODUÇÃO

O Carcinoma de Células Escamos Oral (CCEO) representa 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral. Usualmente esta neoplasia atinge preferencialmente indivíduos do sexo masculino, entre a quinta e oitava década de vida, no entanto observou-se um aumento da incidência do CCEO em indivíduos jovens,

corresponde de 4% a 13% de todos os casos, o qual sugere um padrão diferenciado quanto à etiopatogênese, ao comportamento biológico e ao prognóstico quando comparado ao câncer em pacientes idosos (FALAKI et al., 2011, KNOPF et al., 2015). Achados na literatura tem demonstrado que a língua, seguida da gengiva, assoalho e mucosa bucal são os locais mais acometidos pelo CCE em

pacientes jovens (FAN et al., 2014; MESQUITA et al., 2014; BLANCHARD et al., 2016). Em alguns estudos a língua é o sítio mais acometido por este tipo de neoplasia independente da idade dos pacientes (ALVES et al., 2011; SUN et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

A etiologia do CCEO é multifatorial, resultante da interação entre diversos fatores de risco, tais como: tabaco, álcool, radiação solar, dieta, infecções da cavidade oral e deficiência imunológica (OLIVEIRA et al., 2013). Estudos relacionados tem demonstrado que os fatores de risco mais influentes correspondem ao consumo de tabaco isoladamente ou concomitante ao uso de álcool, sugerindo que quanto maior consumo, piores são as condições prognósticas para o câncer (SANTOS, R.A. et al., 2012). No entanto, Sun et al.,(2015) observaram que o grupo mais jovem tinha uma percentagem mais elevada de indivíduos não fumantes do que no grupo de indivíduos mais velhos. Outros estudos demonstraram que o CCEO em pacientes jovens pode estar associado a outros fatores de risco, tais com a exposição ao vírus do papiloma humano ou a outras infecções virais (SALEM et al., 2010; UDEABOR et al., 2012; THOMAS et al., 2012).

Sun et al., (2015) sugeriram que os pacientes jovens com carcinoma de células

escamosas de língua (CCEL) tendiam a ter um pior prognóstico do que pacientes com o tumor em outros locais, e que o curso clínico e o prognóstico foram semelhantes entre os dois grupos estudados (jovens e idosos), porém os jovens são mais propensos a ter uma recorrência. Com isso, pode-se perceber que o comportamento biológico do CCEO em jovens ainda é controverso, sendo assim, novos estudos estão sendo realizados, utilizando-se da imunistoquímica, com o intuito de identificar outros indicadores do comportamento biológico que sugiram um melhor prognóstico para estes pacientes.

Entre os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese, defeitos na regulação da morte celular programada podem contribuir para a patogênese e progressão tumoral. Membros da família Bcl-2 são proteínas reguladoras de apoptose, que se dividem em proteínas anti-apoptose (Bcl-2, Bcl-X) e proteínas pro-apoptóticas (por exemplo, Bax e Bak), e o equilíbrio entre elas determina o destino da célula (CAMISASCA et al., 2009). Na literatura, estudos comparando comportamento biológico tumoral em pacientes jovens e idosos ainda são escassos. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar por meio da imunistoquímica, a imunexpressão do Bcl-2 em uma série de casos de CCEL em pacientes jovens e idosos, relacionando a

imunomarcação com parâmetros clínico-morfológicos.

Pretende-se, com esta pesquisa, contribuir com mais esclarecimentos a respeito do comportamento biológico dessas lesões em pacientes mais jovens, fornecendo subsídios para uma possível aplicação do marcador de apoptose estudado, como indicador prognóstico para o CCEL em pacientes com idade inferior a 45 anos.

METODOLOGIA

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), conforme parecer de nº 634.714. O presente estudo consistiu em uma pesquisa retrospectiva, transversal e observacional, caracterizada pela análise de parâmetros clínicos e morfológicos e pela análise quantitativa do Bcl-2, por meio de imunistoquímica, em uma série de casos de CCEL em pacientes jovens e idosos.

A amostra foi constituída por 55 casos de CCEL, sendo 25 casos em pacientes jovens (idade inferior ou igual à 45 anos) e 30 casos em idosos (idade superior ou igual à 60 anos) diagnosticados em dois hospitais de referência em Oncologia da Paraíba, Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB e Hospital da FAP/ Campina Grande – PB, nos últimos 16 anos (1999 a 2015). Foram incluídos na amostra, apenas os casos de CCEL tratados

por excisão cirúrgica, e que no bloco parafinado continham material suficiente que possibilitasse a avaliação do *front* de invasão tumoral e cujas fichas clínicas dos pacientes possuíam informações relativas à faixa etária, sexo e estadiamento clínico (TNM) das lesões. E foram excluídos da amostra, os casos em que o paciente recebeu tratamento prévio de radioterapia e/ou quimioterapia e os blocos parafinados que apresentavam quantidade insuficiente de material biológico para realização das análises SGHM e imunistoquímica.

a. Análise Morfológica

Os casos selecionados, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, submetidos a cortes com 5µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), dois examinadores previamente treinados realizaram a análise da gradação histológica de malignidade, de acordo com o sistema proposto por Bryne et al., (1992) no qual considera-se as características da região do *front* de invasão tumoral, determinando quatro parâmetros para a classificação: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário; cada parâmetro possui um

escore, que varia de 1 a 4, a soma final destes escores determina o grau de malignidade do tumor. Sendo assim, lesões que apresentam escore final entre 4 e 8 são classificados como de baixo grau de malignidade, por vez, as que apresentam escore final igual ou superior a 9, são classificados como de alto grau de malignidade (SILVEIRA et al., 2007). Já de acordo com o sistema proposto pela OMS (CARDESA et al., 2005), o tumor é classificado como sendo bem diferenciado (arquitetura tecidual semelhante a um padrão normal de epitélio escamoso), moderadamente (padrão intermediário entre as demais classificações, correspondendo a certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca ceratinização) e pobremente diferenciado (predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima ceratinização, com características notavelmente distintas do epitélio normal).

b. Análise Imunoistoquímica

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3 μ m de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente limpas e desengorduradas e preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase

pela técnica baseada em polímeros de dextrano (Polymer/HRP) utilizando o anticorpo monoclonal primário anti-bcl-2.

A análise da imunomarcagem do anti-bcl-2 foi realizada por dois patologistas, de forma quantitativa. Foram consideradas imunomarcadas as células que apresentaram citoplasma acastanhado, independentemente da intensidade de coloração. Primeiramente, ao longo do *front* de invasão tumoral, sob aumento de 100X, foram selecionadas 10 áreas de maior imunorreatividade ao anticorpo estudado. Sob aumento de 400X, cada uma destas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa *ImageJ*® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um dos campos fotomicrografados, foi realizada a contagem das células positivas e negativas, e em seguida dividida quantidade de células imunopositivas por 1000 e em seguida multiplicando este valor por 100, estabelecendo assim o índice de positividade (IP) para cada caso.

c. Análise Estatística

Após a contagem das células imunomarcadas, os resultados obtidos foram digitados em planilha eletrônica Excel

(Microsoft Office 2007®) e, posteriormente, exportados para o programa *SPSS* (Statistical Package for the Social Sciences), versão 17.0; Os testes utilizados foram Qui-quadrado e *Mann-Whitney*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 55 casos de CCEL avaliados, os indivíduos eram 65,4% ($n=36$) do sexo masculino enquanto o sexo feminino correspondeu a 34,5% ($n=19$) dos casos. Quanto à faixa etária, houve maior prevalência dos casos de CCEL corresponde aos pacientes idosos ($n=30$; 54,5%) (Tabela 1).

Estudos recentes têm demonstrado que a incidência de CCEO em indivíduos jovens tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas MESQUITA et al., 2014; KNOPF et al., 2015; SANTOS et al., 2016; BLANCHARD et al., 2016). Santos et al., (2016) realizaram um levantamento epidemiológico do período de 15 anos, em um estado brasileiro e observaram que em sua população de 2311 casos registrados de CCEO, 76 (3,3%) corresponderam a pacientes jovens (≤ 45 anos de idade). Embora essa frequência varia de 1,4 a 13% de todos os casos de CCEO (RIBEIRO et al., 2009; SOUDRY et al., 2010; PATEL et al., 2011; TROELTZCH et al., 2014;

KOMOLMALAI et al., 2015; SUN et al., 2015).

Alguns estudos demonstraram que o CCEL que acomete estes indivíduos jovens, apresenta um fenótipo mais agressivo com um alto índice de metástase linfonodal no momento do diagnóstico, no entanto, ainda existem controvérsias sobre o prognóstico desses pacientes (SUN et al., 2015; SHAKEEL UZ, ADEEL, SUHAIL, 2016). Os mecanismos moleculares subjacentes ao comportamento agressivo do tumor ainda permanecem obscuros quando comparados à incidência em pacientes jovens e idosos.

Independente das faixas etárias pode se observar que a maioria dos casos de CCEL acometeram homens, semelhantemente aos estudos de Sun et al., (2015). Pesquisas direcionadas a pacientes jovens também confirmaram a predominância de CCEO em indivíduos do sexo masculino (UDEABOR et al., 2012; FAN et al., 2014; SHAKEEL UZ, ADEEL, SUHAIL, 2016). No entanto, Pires et al., (2013) afirmaram que as mudanças nas atividades sociais e de estilo de vida da mulher na atualidade estão tornando-a mais expostas a agentes carcinogênicos, o que sugere um aumento da incidência de câncer nessas pacientes. Sendo assim, em outros estudos esse padrão de predominância pode ser diferente para pacientes jovens, no qual se observa uma maior prevalência do sexo

feminino (SOUDRY et al., 2010; HARRIS et al., 2011; KAMINAGAKURA et al., 2011).

Com relação ao estadiamento clínico, constatou-se que 58,1% (n=32) dos casos encontrava-se em estágios iniciais I/II. Através do SGHM, pela OMS (CARDESA et al., 1992), observou-se maior frequência de CCEL com padrão de moderado a pobremente diferenciado (n=37; 67,2 %), estando o padrão bem diferenciado representado em apenas 19% dos casos (n=8) (Figs. 1A e 1B). Na análise do *front* de invasão tumoral, proposto por Bryne et al., (1992) 40 casos (72,7%) foram classificados como de alto grau de malignidade e apenas 15 casos (27,2 %) como de baixo grau de malignidade. (Tabela 1) (Figs. 1C e 1D).

No tocante ao estadiamento clínico, nossa pesquisa assemelha-se aos estudos de Soudry et al., (2010), Benevenuto et al., (2012), Mesquita et al., (2014) e Knopf et al., (2015) que observaram que em pacientes jovens, o CCEO apresentou-se em estágios clínicos mais avançados (III/IV). Sugerindo, portanto, não haver diferença quanto aos achados clínicos do CCEO em pacientes mais velhos.

Tabela 1. Distribuições das frequências absolutas e relativas encontradas quanto ao Sexo, Idade, Estadiamento clínico e SGHM (Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2016).

PARÂMETROS	N	%
SEXO		
Masculino	36	65,4
Feminino	19	34,5
IDADE		
Jovem	25	45,4
Idoso	30	54,5
ESTADIAMENTO		
I e II	32	58,1
III e IV	23	41,8
OMS		
Bem Diferenciado	18	32,7
Mod/Pobremente Diferenciado	37	67,2
BRYNE		
Baixo Grau	15	27,2
Alto Grau	40	72,7

Associando-se os parâmetros clínicos e morfológicos com os grupos estudados pode se observar que não houve associação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quanto ao sexo, estadiamento clínico e os SGHM, onde tanto os casos de CCEL em jovens como em idosos foram mais frequentes em homens, diagnosticados em estágios iniciais (I/II) e classificados como moderadamente/pobremente diferenciado e de alto grau de malignidade (Tabela 2).

Tabela 2. Associação absoluta e relativa entre os parâmetros clínico-morfológicos nos casos de CCEL em paciente jovens e idosos (Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2016).

GRUPOS			
PARÂMETROS	JOVENS (≤45 ANOS)	IDOSOS (≥60 ANOS)	P
SEXO			
Masculino	19 (76%)	17 (56,7%)	0,133
Feminino	6 (24%)	13 (43,3%)	
ESTADIAMENTO CLÍNICO			
I/II	12 (48%)	20 (66,7%)	0,162
III/IV	13 (52%)	10 (33,3%)	
OMS categorizado			
Bem diferenciado	8 (32%)	10 (33,3%)	0,916
Mod./Pob. diferenciado	17 (68%)	20 (66,7%)	
BRYNE			
Baixo Grau	8 (32%)	7 (23,3)	0,472
Alto Grau	17 (68%)	23 (76,7)	

Em relação aos parâmetros histopatológicos, nossos resultados corroboram com os achados de estudos anteriores, onde o maior número de casos de CCEL, independente dos grupos etários, é classificado como moderadamente a pobremente diferenciados, bem como sendo de alto grau de malignidade (BENEVENUTO et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2014). No entanto, Sun et al., (2015) observaram que os casos de CCEO em jovens foram classificados em sua maioria como pobremente diferenciados, diferentemente dos casos de CCEO em idosos, sugerindo,

portanto, haver, diferença entre jovens e idosos, quanto ao comportamento biológico.

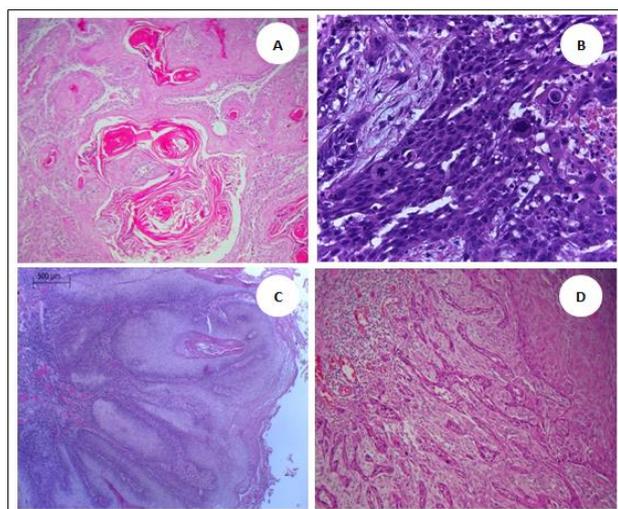


Figura 1. Fotomicrografia representando análise morfológica dos casos de CCEL. **A)** Fotomicrografia de CCEL Bem Diferenciado em paciente jovem (HE, 400X); **B)** Fotomicrografia de CCEL Pobremente Diferenciado em paciente idoso (HE, 400X); **C)** Fotomicrografia de CCEL de Baixo Grau de Malignidade em paciente jovem (HE, 40X); **D)** Fotomicrografia de CCEL de Alto Grau de Malignidade em paciente idoso (HE, 100X).

No que diz respeito à imunomarcagem do Bcl-2, pode se observar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (jovens e idosos) ($p=0,046$) com um maior índice de positividade nos casos de CCEL dos indivíduos idosos (Figs. 2A e 2B). Nos casos de CCEL em indivíduos jovens, a imunomarcagem citoplasmática do Bcl-2 ocorreu em esparsas células neoplásicas dos ninhos tumorais (Fig 2C e 2D). Corroborando, assim, os estudos de Knopf et al., (2015), utilizando o método de PCR, demonstraram menor índice de

imunomarcção do Bcl-2 em pacientes ≤ 45 anos. Diferentemente, Zhang et al., (2012) observaram maior imunexpressão do Bcl-2 em casos de CCEL em indivíduos com idade ≤ 60 anos, sugerindo, assim, um comportamento biológico tumoral mais agressivo nos pacientes jovens em relação aos idosos. Chowdry et al., (2016) observaram que a alta imunexpressão do Bcl-2, em casos de carcinoma de células pequenas do pulmão em jovens, estava relacionada a uma pior sobrevida e ao pior prognóstico desses pacientes.

Correlacionando a imunexpressão do Bcl2 com os parâmetros clínico-morfológicos (Estadimento clínico e os SGHM), mostramos que não houve correlação estatisticamente significativa entre estes parâmetros ($p > 0,05$). No entanto, podemos observar que houve uma maior imunexpressão do Bcl2 nos casos que apresentaram estágios clínicos iniciais (I/II). Quanto aos SGHM proposto pela OMS (CARDESA et al., 2005), o maior índice de positividade do Bcl-2 foi observado nos casos classificados como bem diferenciados, e para o sistema proposto por Bryne et al., (1992) a maior imunomarcção foi nos casos classificados como de Alto grau de malignidade. (Tabela 3).

Zhang et al., (2012) corroboram com nossos resultados, em que os casos de CCEL classificados em estágios clínicos iniciais são

os que demonstraram maior imunexpressão do Bcl-2. Diferentemente dos nossos achados, estudos demonstraram maior imunexpressão desta proteína em casos de CCEO em estágios clínicos III/IV, sugerindo que tumores com alta imunexpressão do Bcl-2 estão correlacionados com pobre prognóstico RAHMANI et al, (2012).

Neste estudo, ressaltamos que os casos classificados com bem diferenciados e de alto grau de malignidade apresentaram os maiores índices de positividade para esta proteína. Corroborando, Zhang et al.,(2012) e Garewal et al., (2014) observaram que a expressão do Bcl-2 é predominante nos casos de CCEO bem diferenciados, sugerindo que a apoptose provavelmente desempenha um papel importante nas fases iniciais da carcinogênese.

Diferindo dos nossos resultados, Rahmani et al., (2012), Janeja et al., (2015) e Knopf et al., (2015) observaram uma alta imunexpressão do Bcl-2 em casos de CCEO classificados com pobremente e moderadamente diferenciados, respectivamente. No que diz respeito ao SGHM proposto por Bryne et al., (1992), nossos resultados corroboram os achados de Rahmani et al., (2012) onde a maior imunomarcção do Bcl-2 foi observada nos casos de CCEO classificados como de alto grau de malignidade.

Tabela 3. Correlação da imunexpressão de Bcl-2 em CCEL em jovens e idosos, estadiamento clínico e os SGHM (OMS (CARDESA et al., 2005) e Bryne et al., 1992) (Campina Grande-PB, Brasil, 2016).

citoplasmática do Bcl-2 em células neoplásicas de CCEL em indivíduo jovem (Advance HRP, 100X e 400X, respectivamente).

Variável	Grupos	N	Mediana (Bcl-2)	Q25-Q75	Média dos Ranks	Soma dos Ranks	U	P
Idade	Jovens	25	8,30	2,05- 16,95	23,28	582,00		
	Idosos	30	13,30	7,47-25,55	31,93	958,00	257,0	0,046*
Estadiamento	I/II	32	11,40	6,02-22,72	28,52	912,50		
	III/IV	23	10,30	4,90-17,60	27,28	627,50	351,5	0,778
OMS	Bem	18	12,45	3,97-26,4	28,22	508,00		
	Mod/Pob	37	11,10	5,75-17,2	27,89	1032,00	329,0	0,943
Bryne	Baixo Grau	15	7,50	3,00-24,1	26,20	393,00		
	Alto Grau	40	11,35	6,15-17,65	28,68	1147,00	273,0	0,610

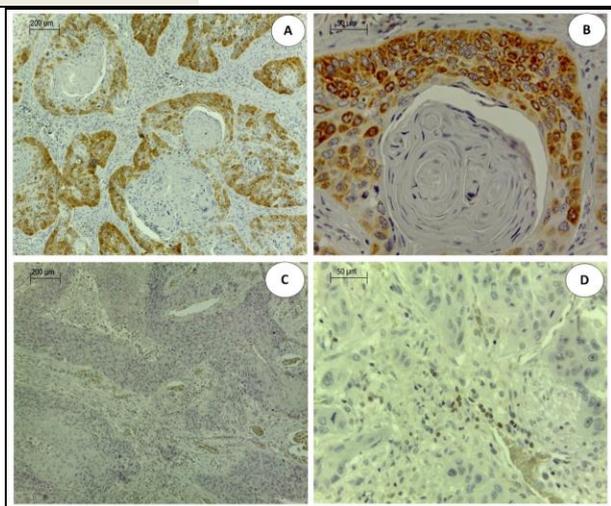


Figura 2. Imunomarcacão para anticorpo Bcl-2. (A e B) Fotomicrografias evidenciando alto índice de positividade citoplasmática do Bcl-2 principalmente nas células da periferia dos ninhos tumorais de CCEL em indivíduo idoso. (Advance HRP, 100X e 400X, respectivamente). (C e D) Fotomicrografias mostrando menor índice de positividade

CONCLUSÕES

Diante dos parâmetros clínico-morfológicos encontrados em nosso estudo, podemos observar que não houve diferença no que diz respeito ao perfil clínico e diferenciação celular entre as faixas etárias estudadas. No entanto, no que diz respeito a maior imunexpressão do Bcl-2 que foi observada em CCEL em indivíduos idosos, pode-se inferir que nesta faixa etária esta neoplasia exibe um comportamento biológico mais agressivo, podendo estar relacionada a uma maior sobrevida das células neoplásicas.

REFERÊNCIAS:

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

1. ALVES, P.M. et al. Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. **Pathology – Research and Practice**, v.207, p. 236–40, 2011.
2. BENEVENUTO, T.G. et al. Immunohistochemical comparative analysis of cell proliferation and angiogenic index in squamous cell carcinomas of the tongue between young and older patients. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 20, n.3, p. 291-7, 2012.
3. BLANCHARD, P. et al. Oral cavity cancers among young people: Clinical results and prognostic analysis. **Cancer Radiother.** 8 Mar 2016.
4. BRANT, J.C.M. **Papel da Apoptose no Infiltrado Inflamatório do Líquen Plano Bucal**. Tese [Universidade Federal de Minas Gerais], Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2012. 59f.
5. BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J Pathol**, v. 166, n.4, p.375-81, 1992.
6. CAMISASCA, D. R. et al. Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.** v.45, n.3, p. 225-33, Mar 2009.
7. CARDESA, A et al. Squamous cell carcinoma. In: BARNES, L. et al. World Health Organization classification of tumor: pathology and genetics of head and neck tumors. **Lyon: IARC Press**, p. 118-121, 2005.
8. CHOWDRY, R.P. et al. Phosphorylated Bcl-2 and Mcl-1 as prognostic markers in small cell lung cancer. **Oncotarget.** Feb. 2016.
9. FALAKI, F. et al. Clinical and histopathological analysis of oral Squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: A retrospective study and review of literatures. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.16, n.4, p.473-7, 2011.
10. FAN, Y. et al. Survival Analysis of Oral Squamous Cell Carcinoma in a Subgroup of Young Patients. **Asian Pac J Cancer Prev.** v.15, n.20, p.8887-8891, 2014.
11. GAREWAL, J.; GAREWAL, R.; SIRCAR, K. Expression of Bcl-2 and MIB-1 Markers in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC)- A Comparative Study. **J Clin Diagn Res.** v. 8, n.7, Jul 2014. HARRIS, S.L. et al. Association of p16INK4a overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. **Head Neck**, v.33, n.11, p.1622-7, 2011.
12. HARRIS, S.L.; THORNE, L.B.; SEAMAN, W.T. et al. Association of p16INK4a overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. **Head Neck.** v.33, n.11, p.1622-7, 2011.
13. JUNEJA, S.; CHAITANYA, N. B.; AGARWAL, M. Immunohistochemical expression of Bcl-2 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Indian J. Cancer.** V.52, n.4, p. 505-10. oct/dec 2015.
14. KAMINAGAKURA, E. et al. CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Head Neck**, v. 33, n.10, p.1413-9, 2011.

15. KNOPF, A. et al. Oncogenes and tumor suppressor genes in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients. **Oncotarget**. v.6, n.5, p.3443–3451, feb 2015.
16. OMOLMALAI, N.; CHUACHAMSAI, S.; TANTIWIPIWIN, S. et al. Ten-year analysis of oral câncer focusing on young people in northern Thailand. **J Oral Sci**, v. 57, n. 4, p. 327-34, 2015.
17. MESQUITA, J.A. et al. Clinical and histopathological evidence of oral squamous cell carcinoma in young patients: systematized review. **J Bras Patol Med Lab**, v. 50, n. 1, p. 67-74, fevereiro 2014.
18. OLIVEIRA, J. M. B. et al. Câncer de boca: avaliação do conhecimento de acadêmicos de Odontologia e Enfermagem quanto aos fatores de risco e procedimentos de diagnóstico. **Rev bras cancerol**. v. 59, n.2, p.211-8, 2013.
19. PATEL, S.C.; CARPENTER, W.R.; TYREE, S.; *et al.* Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. **J Clin Oncol**. v. 29, p.1488–1494, 2011.
20. PIRES, F. R. et al. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single Oral Pathology service during an 8-year period. **J. Appl. Sci Oral**. v.21, n.5, Bauru setembro / outubro 2013.
21. RAHMANI, A. et al. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. **Int J Clin Pathol**. v.5, n.9, p.965-971, 2012.
22. RIBEIRO, A.C.P. et al. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: A descriptive study in Brazilians. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.47, p.95-8, 2009.
23. SALEM, A. Dismissing links between HPV and aggressive tongue cancer in young patients. **Ann Oncol**. v.21, p.13–17, 2010.
24. SANTOS, R.A. et al. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer no trato aerodigestivo superior: relevância dos fatores de risco álcool e tabaco. **Rev bras cancerol**. v.58, n.1, p.21-9, 2012.
25. SANTOS, H. B. P. et al. Clinical findings and risk factors to oral squamous cell carcinoma in young patients: A 12-year retrospective analysis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v.21, n.2, p.151-6, 1 mar 2016.
26. SHAKEEL UZ, Z.; ADEEL, M.; SUHAIL, A. Squamous cell carcinoma of oral tongue in young patients - A 10 years tertiary care experience. **J Pak Med Assoc**. v.66, n.2, p.155-8, Feb 2016.
27. SILVEIRA, E. J. D. et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of the squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int J Surg Pathol**. v. 15, p. 376-83, 2007.
28. SOUDRY, E. et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. **Clin Otolaryngol**, v.35, p.307-12, 2010.
29. 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**. v.8, n.8, p.12418-23, 15 Aug 2015.
30. THOMAS, L. et al. Prognostic features, human papillomavirus status, and epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cell

- carcinoma in young adults. **Am J Otolaryngol.** v.33, p.650–656, 2012.
31. TROELTZSCH, M.; KNÖSEL, T.; EICHINGER, C.; PROBST, F.; TROELTZSCH, M.; WOODLOCK, T. et al. Clinicopathologic features of oral squamous cell carcinoma: do they vary in different age groups? **J Oral Maxillofac Surg,** v. 72, n. 7, p.1291-300, 2014.
 32. UDEABOR, S. E. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. **Head & Neck Oncology,** v.4,n.48, p.2-7,2012.
 33. VASCONCELOS, M. G. et al. Squamous cell carcinoma of the tongue: clinical and morphological analysis of 57 cases and correlation with prognosis. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.50, n.5, Rio de Janeiro Sept./Oct. 2014.
 34. ZHANG, B. et al. The expression and significance of MRP I, LRP, TOPOII β , and BCL2 in tongue squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.** v.41, p.141-148, 2012.