

ALAN ROGER DOS SANTOS SILVA

**ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E DA
PLOIDIA DO DNA EM PACIENTES JOVENS COM CARCINOMA
ESPINOCELULAR DE LÍNGUA: *UM ESTUDO COLABORATIVO
INTERNACIONAL***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Estomatopatologia (Área de concentração em Patologia Oral).

Orientador: Professor Dr. Marcio Ajudarte Lopes

**PIRACICABA
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8a. / 6159

Si38a	Silva, Alan Roger dos Santos. Análise das características clínico-patológicas e da ploidia do DNA em pacientes jovens com carcinoma espinocelular de língua: um estudo colaborativo internacional / Alan Roger dos Santos Silva. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. Orientador: Marcio Ajudarte Lopes. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Boca – Câncer. 2. Aneuploidia. 3. Instabilidade genômica. I. Lopes, Marcio Ajudarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	--

Título em Inglês: clinicopathological features and DNA ploidy analysis of tongue squamous cell carcinoma in young patients: a collaborative international study

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Mouth cancer. 2. Aneuploidy. 3. Genomic instability

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Marcio Ajudarte Lopes, Pablo Agustin Vargas, Ricardo Della Coletta, Glauco Issamu Miyahara, Fabio Daumas Nunes

Data da Defesa: 21-05-2010

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



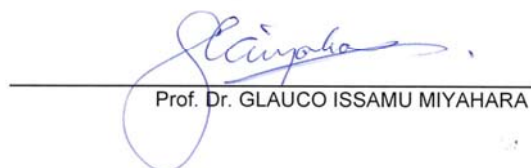
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 21 de Maio de 2010, considerou o candidato ALAN ROGER DOS SANTOS SILVA aprovado.



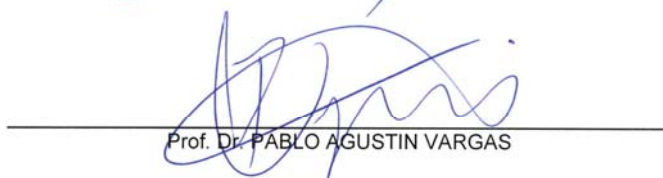
Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES



Prof. Dr. GLAUCO ISSAMU MIYAHARA



Prof. Dr. FÁBIO DAUMAS NUNES



Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS



Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eurípides e Maria, por me ensinarem a importância da educação, da cordialidade e dos valores familiares. Diariamente, diante dos desafios da vida, ponho-me a imaginar como agiriam em situação semelhante, e, então, sigo em frente deixando-me guiar pelas orientações que me passaram e pelas intensas memórias que guardo do período em que vivemos juntos.

Às minhas irmãs Vivian Lara e Michelle, pelas constantes demonstrações de amor, carinho e lealdade. A certeza de que, juntos, podemos disseminar os valores assimilados em nosso lar, continuando os projetos de nossos pais, me fazem sentir conforto singular.

À minha querida Ana Carolina, pela habitual sensatez e serenidade e, acima de tudo, pelo amor e companheirismo incondicionais com que tem conduzido nossas vidas.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Catarina, amorosa sobrinha, por ter renovado a energia da família, plenificando nossas vidas com sua ternura. Aos meus cunhados, João Adriano e Cícero, pelo carinho com que me distinguem e constante dedicação devotada à minhas irmãs.

Aos meus avós, tios e primos, por me acompanharem e apoiarem com privilegiado carinho, fazendo de nossos momentos em família verdadeiras oficinas de alegria e motivação.

À família Prado Ribeiro, com respeito e com gratidão, por me ter acolhido como mais um filho.

Aos inesquecíveis amigos, de fraterna lembrança, Paulo Roberto Gomes Azevedo, Daniel Tirapelli, Breno Moschetta, Thiago Latorre, Angelo Puerro Neto, Arthur Falleiros, Renato Ferraço, Giuliano Rosa, Daniel Bernabé, Luciana Simonato, Rodrigo Borges, Valéria Durão, Tiago Frameschi, Ademar Takahama Junior, Fernanda Mariano, Marco Aurélio Carvalho Andrade, Wilfredo Arriagada, Adriele Gouvêa, Jonatas Vasconcelos, Carolina Cavalcanti Bitu, Mário Romãach e Luiz Gueiros.

AGRADECIMENTOS

A todos os profissionais da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, tomando a liberdade de fazê-lo por meio de seu Diretor, Professor Doutor Francisco Haiter Neto.

Ao Professor Doutor Marcio Ajudarte Lopes, pelos valiosos ensinamentos, mas também pelos momentos de amadurecimento pessoal e profissional proporcionados nestes quatro anos de honroso e intenso trabalho, ensejando-me preciosas lições de organização, objetividade, seriedade e lealdade.

Ao Professor Doutor Pablo Agustin Vargas, pela confiança no meu trabalho, fato que me propiciou oportunidades acadêmicas e pessoais ímpares. Entre elas, a possibilidade de desfrutar de uma rica temporada de estudos e pesquisas na Universidade de Sheffield (Inglaterra).

Ao Professor Doutor Jacks Jorge Júnior, Coordenador dos Cursos de Pós-Graduação, e ao Professor Doutor Ricardo Della Coletta, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo cuidadoso auxílio, pela consideração e pela profícua convivência ao longo destes anos.

Aos Professores Doutores Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner e Oswaldo Di Hipólito Júnior das Áreas de Patologia Oral e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelos exemplos de competência, dedicação, seriedade e cordialidade.

Aos profissionais do OROCENTRO e do Laboratório de Patologia Oral, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo suporte e dedicada atenção durante o desenvolvimento deste trabalho. Em especial aos funcionários Rogério de Andrade Elias, Aparecida Campion, Débora Gazola, João Carlos da Silva Júnior, Fabiana Facco Casarotti, Geovania Almeida e Adriano Luis Martins.

Aos membros das áreas de Semiologia e Patologia Oral, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, e aos colegas pós-graduandos do Programa de Estomatopatologia, pela oportunidade de poder desfrutar de um ambiente de excelência em pesquisa e de intensa interação pessoal, acadêmica, científica e profissional: Ana Terezinha Mesquita, Andréia Aparecida da Silva, Andréia Bufalino, Bruno de Andrade, Camila Beder, Daniel Berreta, Débora Campanella Bastos, Eduardo Baülm Campagnoli, Fabiana Seguin, Guillermo Martínéz Matta, Jorge Esquiche León, Katya Díaz, Kenia Regina Silva, Lays Martin Sobral, Lília Alves Rocha, Lívia Maris Paranaíba, Lucielma Salmito Pinto, Manoela Carrera, Marco Antonio Carvalho, Maria Fernanda Setúbal Destro, Marisol Martinez, Michele Gassen Kellermann, Michelle Agostini, Patrícia Gemma Strappa Abrahão, Rebeca de Souza Azevedo, Renato Hopp, Patrícia Feio, Rogério Gondak, Rose Ortega, Sibeles Aquino e Victor Hugo Toral Rizo.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP) e aos membros do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, especialmente à Professora Doutora Ana Maria Pires Soubhia e ao Professor Doutor Glauco Issamu Miyahara, mestres que me despertaram para o universo do Diagnóstico Bucal e ainda hoje, como diletos amigos, me estimulam a crescer.

Ao Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade de Sheffield (Inglaterra), pela inestimável e calorosa acolhida durante os nove meses em que lá estive como visitante acadêmico, experiência singularmente enriquecida pela honrosa atenção e competência dos Professores Doutores Paul Speight, Keith Hunter, Paula Farthing, Lynne Bingle e Simon Whawell.

À Professora Doutora Ana Maria Pires Soubhia do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP), ao Doutor Román Carlos do Centro Clínico de Cabeza y Cuello (Guatemala) e ao Professor Paul Speight do Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade de Sheffield (Inglaterra) pela colaboração no desenvolvimento deste estudo ao cederem casos clínicos e dividirem comigo suas experiências profissionais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos imprescindíveis auxílios concedidos na forma de bolsa de iniciação científica (Proc. 107951/2004-5), bolsa de mestrado (Proc. 131654/2006-3), bolsa de doutorado (Proc. 140211/2008-0) e projeto de auxílio à pesquisa (Edital Universal, Proc. 470773/2008-1), bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estágio de doutorando no exterior (PDDE, Proc. BEX 4691/08-3).

À Doutora Alica Torres-Rendon e ao seu esposo, John Rush, cujo apoio e dedicação impagáveis revelaram-me amizade pura, bem como às colegas Yonara Marques, Sumita Roy, Abigail Rice e Prachi Stafford pelo auxílio e companheirismo valiosos para a consecução de nossos compromissos em Sheffield.

Ao simpático e distinto casal Patricia Morgan e John Morgan (Sheffield), cuja generosidade simplesmente fez de seu lar uma extensão de minha própria casa.

A todos os profissionais que de diversas maneiras e intensidade contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente a Eurípides Alves da Silva, Ana Carolina Prado Ribeiro, Marco Aurélio Carvalho de Andrade e Adriele Ferreira Gouvêa.

Não se apresse em construir um futuro promissor. Ele se projeta pelas nossas ações no presente, não podemos antecipá-lo. Vivamos o dia a dia com amor e responsabilidade. À seu tempo, o futuro virá.

RPJ

RESUMO

Predominantemente, o carcinoma espinocelular (CEC) de boca afeta pacientes idosos e com frequência se desenvolve em associação com o consumo de fumo e álcool. Todavia, evidências científicas têm sugerido o aumento da incidência desta malignidade em pacientes com menos de 40 anos de idade e não expostos aos tradicionais fatores de risco. Informações disponíveis referentes ao câncer de boca em pacientes jovens são escassas e controversas, dificultando a compreensão da patogênese, do comportamento biológico e do prognóstico destes tumores. Como consequência, seu tratamento tem sido baseado principalmente na experiência profissional de cada centro médico. Este trabalho teve como objetivos estudar as características demográficas, os fatores de risco e os aspectos clínicos no momento do diagnóstico, além do perfil biológico de CECs de língua em pacientes com até 40 anos. Foi realizada uma análise retrospectiva multiinstitucional a fim de se investigar gênero, cor da pele, consumo de tabaco e álcool, tamanho dos tumores, metástase regional e à distância, diferenciação histológica e ploidia do DNA dos tumores por meio de citometria por imagem. Os resultados mostraram que tumores em pacientes jovens foram frequentemente detectados em mulheres e pacientes não fumantes e não etilistas, enquanto em pacientes idosos foram detectados, predominantemente, em homens fumantes e etilistas. Além disso, constatou-se que CECs de língua em jovens não se distinguem quanto ao tamanho, a metástases regionais ou à distância e nem quanto ao grau de diferenciação histológica quando comparados com idosos. Ressalta-se, entretanto, que tumores em jovens apresentaram maiores incidências de aneuploidia, tetraploidia e de outros parâmetros de anormalidades da ploidia do DNA. Concluindo, pacientes jovens com CEC de língua apresentaram perfil clínico e biológico peculiares, favorecendo a hipótese de que pacientes jovens com CEC de boca possuem instabilidade genômica aumentada e indicando uma possível natureza genética diferente entre os CECs de língua de jovens e de idosos.

Palavras-chave: Câncer de boca, Carcinoma espinocelular, Pacientes jovens, Ploidia do DNA, Aneuploidia, Instabilidade genômica.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (SCC) predominately affects elderly patients and frequently develops in association with tobacco and alcohol consumption. However, an increasing of this malignant disease has been observed in patients younger than 40 years of age, who are not exposed to the traditional risk factors. Data regarding oral cancer in young patients are scarce and controversial, making the determination of the pathogenesis, biological behaviour and prognosis of these tumours difficult. As a consequence, treatment has been mainly based on the professional experience of each medical centre. The aims of this work were to study demographic features, risk factors and clinical aspects at the moment of diagnosis as well as the biologic profile of patients of less than 40 years of age with tongue SCC. A multi-centre retrospective analysis was performed to investigate gender, race, tobacco consumption and alcohol intake, size of the tumour, regional and distant metastasis, histological differentiation and DNA ploidy of tumours through image cytometry. Tumours in young patients were frequently detected in females and non-smoking and non-drinking patients while older patients were predominantly smoking and drinking males. In addition, tongue SCC in young patients did not differ in size, regional and distant metastasis or tumour grade of differentiation when compared to those in older patients. This study highlighted that tumours from young patients presented higher incidences of aneuploidy, tetraploidy and other parameters related to DNA ploidy abnormalities. In conclusion, young patients with tongue SCC presented a distinct clinical and biological profile, favouring the hypothesis that young patients with oral SCC may have an increased genomic instability and indicating the possibility of underlying genetic differences between TSCC in young and older patients.

Keywords: Oral cancer, Squamous cell carcinoma, Young patients, DNA ploidy, Aneuploidy, Genomic instability.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1: <i>High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: An international collaborative study</i>	7
CAPÍTULO 2: <i>Carcinoma espinocelular de língua em pacientes jovens não tabagistas e não etilistas. Relato de 03 casos clínicos e revisão da literatura</i>	34
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO	57

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde, por meio da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, estimou que em 2008 ocorreriam 12,4 milhões de casos novos de câncer e 7,6 milhões de óbitos devido a esta doença em todo o mundo. Especificamente para países da América do Sul, América Central e Caribe, foram estimados um milhão de casos novos e 589 mil óbitos (World Cancer Report 2008). No Brasil, em particular, onde as neoplasias malignas já se constituem na segunda causa mais frequente de morte na população - representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida -, estimam-se para este ano de 2010 a ocorrência de nada menos do que 490 mil casos novos. A propósito, os tipos de câncer mais incidentes na população brasileira (desconsiderando o câncer de pele do tipo não melanoma) são os tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil), colo do útero (18 mil) e boca (14 mil) (INCA, 2009).

Este preocupante cenário, agravado pelo contínuo crescimento da população e seu inevitável envelhecimento, tende a afetar de forma significativa o impacto do câncer no mundo, tornando, especialmente o câncer em pacientes jovens, um assunto de preocupação emergente na comunidade científica. Aparentemente, o câncer em pacientes jovens possui características singulares, relacionadas às necessidades emocionais, psíquicas, sociais, médicas e físicas, próprias desta faixa etária. Por esta razão, defende-se a idéia que estes pacientes deveriam ser vistos, estudados e manejados como um grupo distinto. Por enquanto, pouco se conhece a respeito dos agentes etiológicos e dos fatores de risco do câncer em pacientes jovens. Todavia, não haveria exagero em afirmar que poucos casos estariam associados a fatores ambientais ou relacionados a síndromes hereditárias de predisposição ao câncer (Bleyer, 2002).

Apenas recentemente, e ainda assim por influência de agências de beneficência e assistência social, como a “Livestrong” dos Estados Unidos da América e a “Teenage Cancer Trust” do Reino Unido, a problemática do câncer em pacientes jovens tem sido propriamente discutida. Como consequência, investimentos públicos têm permitido a criação de grupos especializados para

pesquisa do assunto, destacando-se, como pioneiros, o grupo britânico “Teenage and Young Adult Clinical Studies Group” (financiado pelo Instituto Nacional de Pesquisa em Câncer) e o grupo norte-americano “The Adolescent and Young Adult Oncology Progress Review Group” (financiado pelo Instituto Nacional do Câncer) (Eden, 2006). Um exemplo importante a ser destacado refere-se ao Instituto Nacional de Câncer, órgão oficial do governo dos Estados Unidos, e seu programa de pesquisa conhecido como “Progress Review Group on Adolescents and Young Adults Oncology”. Este programa, com o mérito de divulgar e estimular fortemente o aprimoramento da compreensão da biologia dos tumores em pacientes jovens com câncer, vem reforçando a necessidade de se investigar as possíveis diferentes bases biológicas do câncer nestes pacientes (Schmidt, 2006; National Institutes of Health, National Cancer Institute, Live Strong Young Adult Alliance, 2006; Bleyer, 2007).

Outra importante referência a respeito dessa problemática vem com a iniciativa do oncologista Archie Bleyer, da Escola Médica de Houston (Universidade do Texas), um dos principais pesquisadores da questão do câncer em jovens. Os estudos conduzidos por sua equipe mostram que no período compreendido entre os anos de 1975 e 2000 a incidência de câncer teria aumentado em todos os grupos de idade abaixo dos 45 anos. Mais especificamente, revelam que o aumento na incidência em pacientes entre 25 e 44 anos se caracterizaria, principalmente, pelo crescente número de sarcomas de tecido mole, linfomas não-Hodgkin e carcinomas de modo geral. Entretanto, ainda de acordo com estes estudos, as taxas de mortalidade teriam diminuído, neste período, em todas as faixas etárias, com exceção dos pacientes diagnosticados com câncer entre os 20 e os 44 anos de idade, faixa em que foram registrados os piores resultados (Bleyer, 2002; Bleyer et al., 2006).

O carcinoma espinocelular (CEC) é uma neoplasia maligna derivada do epitélio de revestimento e é considerada a entidade neoplásica maligna mais frequente em boca, representando mais de 90% dos casos (Scully, Felix, 2006, Siriwardena et al., 2006). Os fatores mais comumente associados à etiologia do CEC de boca são o consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas (Scully e Felix, 2006). Acomete principalmente homens brancos acima dos 60 anos de idade,

tabagistas e etilistas (Hyan et al., 2003; Llewellyn et al., 2004; Sasaki et al., 2005, Scully e Felix, 2006).

Diversos estudos, no entanto, sugerem uma alteração no perfil clínico dos pacientes com câncer de boca nas últimas décadas. Apesar dos primeiros relatos desta possível mudança de paradigma terem sido publicados por volta da década de 70, apenas recentemente verificou-se o aumento do número de investigações pertinentes a este assunto e de resultados efetivos indicando o aumento da incidência de CEC bucal em jovens em diferentes regiões do mundo (Venables, Craft, 1967; Shemen et al., 1984; Depue 1986; Macfarlane et al., 1987; Mackenzie et al., 2000; Wünsch-Filho, Camargo, 2001; Annertz et al., 2002; Iamaroon et al., 2004; Shiboski et al., 2005). Dados afins mostram que, em média, 10% dos casos de CEC bucal afetam pacientes jovens (Iamaroon et al., 2004; Siriwardena et al., 2006; Siriwardena et al., 2007; Ribeiro et al., 2008).

Quando os dados da literatura relacionados ao CEC bucal em jovens são estudados, as divergências ficam claras e têm início no critério utilizado para se definir a idade de um paciente jovem, bem como na identificação da predileção por gênero. Por exemplo, Kuriakose et al. (1992) estudaram pacientes com idade igual ou inferior a 35 anos e encontraram maior prevalência em mulheres, enquanto Sasaki et al. (2005) observaram maior incidência no gênero masculino em pacientes com até 40 anos. Kuriakose et al. (1992) sugeriram, ainda, que o CEC bucal em pacientes jovens tende a ser menos diferenciado histologicamente quando comparado ao CEC bucal que acomete pacientes idosos. Por outro lado, Regezi et al. (1999) ao analisarem os padrões morfológicos de uma amostra de pacientes com idade inferior a 35 anos e compará-los aos padrões morfológicos de pacientes com idade superior a 75 anos, não obtiveram diferenças estatisticamente significantes. Semelhante constatação foi observada com o estudo de Sasaki et al. (2005), ao analisarem pacientes jovens com idade inferior a 40 anos e compará-los com idosos.

Outro indício da falta de consenso no que tange à problemática dos pacientes jovens com CEC de boca surge com o perfil dos pacientes brasileiros, que se encontra publicado na literatura de língua inglesa. Até o início deste ano de 2010, quatro artigos científicos analisando pacientes brasileiros estavam

disponíveis na base de dados *Pubmed (Medline)* (Hirota et al., 2008, Ribeiro et al., 2009; De Paula et al., 2009; Kaminagakura et al., 2010). Interessante ressaltar que os critérios adotados para definir pacientes jovens variaram claramente nestes estudos. Dois estudos analisaram pacientes com até 40 anos de idade, um deles considerando pacientes com até 41 anos de idade e o outro até 45 anos. O tamanho das amostras também variou significativamente; a menor casuística avaliou 13 pacientes e a maior 125. Além disso, 3 estudos foram retrospectivos e apenas um deles caso-controle. Consequentemente, os resultados encontrados foram muito díspares. Como seria de se esperar, a mesma falta de consenso é encontrada nos resultados de estudos oriundos de diversas regiões do mundo.

Sugere-se que tanto a etiologia quanto a patogênese do CEC bucal diferem entre pacientes jovens e idosos, principalmente devido à aparente ausência ou ao curto período de exposição a agentes carcinogênicos nos jovens, à provável ausência de lesões com elevado potencial de malignidade preexistente e ao suposto comportamento biológico mais agressivo dos CECs bucais em pacientes jovens (Regezi et al., 1999, Llewellyn et al., 2001; Llewellyn et al., 2004; Sasaki et al., 2005; Chitapanarux et al., 2006). Provavelmente, a escassez de trabalhos que tentaram caracterizar os tumores deste tipo específico de pacientes, do ponto de vista biológico, perpetua as dificuldades para se entender melhor a etiologia, os fatores de risco e o comportamento clínico dos pacientes em questão.

Autores como Mackenzie et al. (2000) e Porter, Waugh (2000), cientes dos indícios que sugerem que o câncer bucal em pacientes jovens é uma entidade distinta, especialmente pelo seu aparente comportamento biológico mais agressivo e por recentes evidências que sugerem ausência dos tradicionais fatores de risco (como o tabaco e o álcool), enfatizaram a necessidade de estudos mais amplos. Sobretudo envolvendo áreas geográficas distintas para que se pudesse buscar uma melhor caracterização do perfil dos pacientes jovens com câncer de boca. Outro argumento interessante utilizado por estes autores é que a relativa raridade destes tumores em centros de saúde isolados poderia limitar a interpretação dos dados. Desta forma, os estudos multiinstitucionais poderiam reunir casuísticas mais representativas e superar a dificuldade do tamanho reduzido das amostras.

O progresso limitado do tratamento do câncer em pacientes jovens deve-se, em parte, à falta do entendimento das diferenças na biologia das doenças malignas que acometem estes jovens, quando comparadas com malignidades de pacientes mais velhos (Bleyer et al., 2008). Estudos meramente clínicos, na maioria das vezes, não conseguem confirmar diferenças entre a biologia do câncer em jovens e em indivíduos mais velhos, mesmo na presença de evidentes diferenças clínicas e histopatológicas. Assim, comparações moleculares, epidemiológicas e terapêuticas poderiam oferecer informações importantes para a distinção do câncer em pacientes jovens (Bleyer et al., 2008).

Aparentemente não existem estratégias terapêuticas individualizadas para pacientes jovens com CEC de boca, de forma que o tratamento desta população tem seguido o mesmo protocolo aplicado aos pacientes mais velhos. Entretanto, uma elevada incidência de margens cirúrgicas comprometidas em pacientes jovens já foi demonstrada, sugerindo que esta falta de individualização no tratamento poderia gerar impacto negativo no prognóstico e na sobrevida dos pacientes (Mallet et al., 2009). Embora a interpretação destes dados seja considerada complexa, uma das hipóteses para explicar estes resultados poderia ser a influência da pouca idade dos pacientes na tomada de decisão cirúrgica dos médicos, o que poderia gerar tentativas de limitar a ressecção do tumor para preservação da função. Outra hipótese é o pequeno número de casos tratados cirurgicamente por equipes médicas nesta população, o que, por sua vez, limita o treinamento médico. Esta constatação é impactante para a discussão em questão, uma vez que estudos recentes descrevem falhas e limitações no tratamento do CEC de língua em jovens, além de mostrar que os pacientes que não apresentaram uma boa evolução da doença após o tratamento inicial morrem por conta da doença (Mallet et al., 2009).

Infelizmente, os poucos estudos disponíveis não permitem uma avaliação mais profunda neste grupo específico de pacientes, tanto no que diz respeito às características clínicas quanto às bases biológicas da doença, a despeito do crescente número de relatos de CEC bucal em jovens, na forma de pequenas casuísticas. Estes achados contrastantes reforçam a relevância do tema e a necessidade de estudos que busquem compreender melhor a patogênese do CEC

bucal em jovens. Sobretudo quando se tem por meta a obtenção de resultados relacionados às possíveis diferenças no perfil e no comportamento clínico e, também, no padrão biológico dos tumores entre os dois grupos de pacientes.

Este trabalho se fundamenta principalmente na perspectiva do aprimoramento da compreensão do câncer de boca em pacientes jovens, tanto do ponto de vista clínico quanto do ponto de vista biológico. A abordagem aqui proposta buscou uma compreensão das características clínicas, até o momento do diagnóstico, apresentadas nos CECs bucais de pacientes com até 40 anos de idade. Para isto, quatro importantes centros de referência em patologia oral colaboraram com a investigação proposta: dois centros brasileiros, um guatemalteco e um inglês. Foram estudados critérios demográficos, fatores de risco para o câncer bucal, comprometimento clínico da doença (TNM e estadio clínico), grau de diferenciação histológica dos tumores baseado nos critérios propostos por Bryne et al. (1992) e incidência de aneuploidia e de outras anormalidades na ploidia do DNA por meio da citometria por imagem (sistema de imagem celular automatizado, ACISIII, Dako) utilizando histogramas de DNA de alta fidelidade. Os resultados foram então comparados com uma população controle de CEC em pacientes idosos, pareada por sítio anatômico. Amostras de tecidos de mucosa bucal normal também foram utilizadas como referência para comparação dos resultados de ploidia. Finalmente, foi estudada a relação entre os dados demográficos, clínicos e biológicos dos CECs de boca em pacientes jovens com CEC de língua.

CAPITULO 1

Artigo submetido para publicação no periódico *The American Journal of Surgical Pathology*.

High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: An international collaborative study.

Alan Roger dos Santos-Silva¹, Ana Carolina Prado Ribeiro¹, Ana Maria Pires Soubhia², Roman Carlos³, Paul M. Speight⁴, Keith D. Hunter⁴, Alica Torres-Rendon⁴, Pablo Agustin Vargas¹, Marcio Ajudarte Lopes¹

1: Department of Oral Diagnosis, University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba Dental School, Brazil

2: Department of Pathology and Clinical Propedeutic, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba Dental School, Brazil

3: Centro Clinico de Cabeza y Cuello, Guatemala

4: Department of Oral and Maxillofacial Pathology, The University of Sheffield, School of Clinical Dentistry, United Kingdom

High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: An international collaborative study.

ABSTRACT

An increasing incidence of tongue squamous cell carcinoma (TSCC) among young people has been demonstrated worldwide. Previous investigations were mainly based on small study populations with variable criteria, resulting in controversy regarding age, gender predilection, risk factors, outcome and treatment. Although TSCC in young patients is often considered to have a worse prognosis than in older patients, there have been conflicting reports. This multi-centre analysis assessed the DNA content of TSCC in 37 young patients (<40 years) and 28 old patients (>50 years) and determined the correlation of DNA ploidy findings with clinicopathological data. Image cytometry was carried using an automated cellular imaging system (ACIS, Dako) on Feulgen-stained histological sections to obtain high-fidelity DNA histograms. Among young patients, 14 (37.8%) were females compared to 5 (18.7%) in the older group ($p=0.002$). In total, 18 (48.6%) patients were non-smokers and 15 (40.5%) were non-drinkers compared to 3 (10.7%) non-smokers and non-drinkers in the older group ($p<0.0001$). TNM, clinical stage of disease and histological grade of differentiation did not differ between groups. Tumour aneuploidy was detected in 32 (86.5%) and tetraploidy in 9 (24.3%) young patients; this was significantly greater than in the older group where 18 (64.3%) were aneuploid ($p<0.0001$) and 2 (7.2%) tetraploid ($p<0.0001$). The mean values of DNA index (DI) and DNA heterogeneity index (HI) as well as the percentage of cells with DI exceeding 5N (5N-EC) were significantly higher in young patients ($p<0.0001$). Young patients with TSCC possibly represent a distinct clinical entity. The high incidence of DNA ploidy abnormalities favours the hypothesis that they may have increased genomic instability and indicates the possibility of underlying genetic differences between TSCC in young and older patients.

Keywords: Tongue cancer, Squamous cell carcinoma, Young adults, Risk factors, Aneuploidy, DNA-image cytometry, Chromosomal instability.

INTRODUCTION

Cancer in young people has singular features because of special medical, physical, psychological, and social needs (Bleyer et al., 2006). Regarding cancer susceptibility, young patients may have physiology and genomic properties that differ from those of older persons. While most advances in cancer diagnosis and treatment have been achieved through increased understanding of tumour biology, the lack of improvement in survival rates for young people may be partially due to the limited knowledge of tumour biology. If the biology of tumours in young people is different, the optimal treatment may also be different (Eden, 2006; Bleyer et al., 2008).

Interestingly, most cancer cases diagnosed during youth appear to be unrelated to environmental agents or family cancer syndromes. This contrasts with traditional risk factors described for older people, particularly smoking and drinking habits. Considering that the duration of exposure to potential environmental carcinogens is directly proportional to age, it is not surprising that tobacco and alcohol-related cancers are less likely to occur in young subjects than in older persons (Eden, 2006). This lack of association of tobacco and alcohol in younger individuals with cancer raised the possibility of other unidentified aetiological pathways and risk factors. It has been suggested that such patients may exhibit a predisposition to genetic instability (Schantz et al., 1989, Schantz, Liu, 1989, Sorensen et al., 1997, Wang et al., 2001).

The increase of TSCC among young people was first identified during the mid-1970s (Shemen et al., 1984, Depue, 1986). Since then, this peculiar trend of TSCC in younger populations has been demonstrated worldwide (Macfarlane et al., 1987, Wünsch-Filho, de Camargo, 2001, Annertz et al., 2002; Iamaroon et al., 2004, Shiboski et al., 2005). However, these previous investigations had variable criteria and definitions resulting in controversies especially regarding age, gender predilection, risk factors, outcome and best therapeutic approach.

Several sorts of cancers that occur in young patients have a worse survival outcome than the same tumours in older patients, including breast carcinomas, colorectal carcinomas, soft-tissue sarcomas, non-Hodgkin lymphomas and

leukaemia (Bleyer et al., 2008). Although TSCC in young patients is often considered to have a worse prognosis than in older patients, there have been conflicting reports (Sarkaria, Harari, 1994; Annertz et al., 2002; Popovtzer et al., 2004, Siriwardena et al., 2006; Goldenberg et al., 2009).

DNA ploidy abnormalities are considered important indicators of genomic instability and correlate with worse prognosis in a variety of cancers (Kristensen et al., 2003; Fang et al., 2004; Torres-Rendon et al., 2009). However, the predictive value of DNA abnormalities in young patients with oral squamous cell carcinoma (SCC) has not been studied. Therefore, the purpose of this study was to determine the incidence of DNA aneuploidy and other DNA ploidy abnormalities in a cohort of patients aged 40 years or less and to correlate these results with clinicopathological features. This analysis also aimed to better investigate the tumour biology of TSCC in young patients by testing the assumption that such cases would have a higher predisposition to genetic instability.

PATIENTS AND METHODS

This retrospective, multi-centre international collaborative study was designed to compare the clinicopathological profile and the DNA ploidy status of TSCC between patients under the age of 40 years and those over the age of 50. The international approach was carried out to overcome the low incidence of TSCC in young patients and the focus on tongue intended to limit data variability.

Patients and tissue selection

A 20-year retrospective review for the period from 1988 to 2008 was performed for the files of 4 oral pathology centres at University of Campinas (Piracicaba Dental School, Brazil), Univ Estadual Paulista (Araçatuba Dental School, Brazil), Centro Clinico de Cabeza y Cuello (Guatemala), and The University of Sheffield (School of Clinical Dentistry, United Kingdom). All patients 40 years of age and younger who had primary SCC on the lateral border of the tongue were identified and tumour tissue specimens from their incisional biopsies were retrieved. Exclusion criteria were previous treatment by surgery, radiotherapy

or chemotherapy, insufficient tissue for analysis and lack of clinical information. This study was approved by the Ethics Committee for Human Studies, Piracicaba Dental School and the South Sheffield Research Ethics Committee.

Demographic data (age, gender and ethnicity), social habits (tobacco and alcohol consumption), TNM and stage of disease at diagnosis (according to the 2002 UICC TNM classification of malignant tumours) (Sobin et al., 2002) were collected from the patients charts. Results were compared with those of a control group of 28 patients (older than 50 years) selected randomly from the archive of Piracicaba Dental School and matched by tumour site. A second group of 12 samples of normal oral mucosa (NOM) was used as a control reference for the ploidy analysis.

Histological grading

After specimen selection, 5- μ m-thick sections were cut from the paraffin blocks, stained with haematoxylin and eosin (H&E) and re-examined under light microscopy for diagnostic confirmation. Each specimen was histologically graded by two different oral pathologists according to the parameters of Bryne et al. (1992).

DNA ploidy analysis (image cytometry on tissue sections)

Image cytometry was carried out using the ACIS III (Automated Cellular Imaging System, DAKO, Denmark) on Feulgen-stained histological sections to obtain high-fidelity DNA histograms according to previously described methods (Huang et al., 2005; Yu et al., 2007; Hornick et al., 2008).

In brief, 7- μ m sections were cut and stained with Feulgen following the manufacturer's procedures (Blue Feulgen Staining Kit, ScyTek Laboratories Inc., USA). Feulgen-stained slides were then automatically scanned using ACIS III. A quality control set of slides (calibration kit) provided by the manufacturer was run daily in the system to assure optimal function. The area of interest in each sample (the advancing front or deepest part of the tumour) was identified microscopically on H&E sections and the corresponding area was examined on the Feulgen-stained slide. For each specimen, 100 control cells (lymphocytes) and 300

malignant epithelial cells were automatically selected for two independent analyses.

Cell images of all cases were digitised and stored in the system. Then, digital images of the selected nuclei were converted into pixels and quantified with respect to the integrated optical density value (IOD), which integrates the DNA content and morphological features of the target nuclei such as size, shape, contour, granularity and chromatin texture. The mean IOD of the diploid control cells was assigned a DNA index (DI) value of 1, which represents an internal diploid (2N) reference for DI calculations of the malignant epithelial cells (N corresponds to the number of copies of the chromosomes). Subsequently, high-fidelity DNA histograms representing selected cells in the different phases of the cell cycle were created by the system.

Criteria for classification of DNA ploidy (analysis of the high-fidelity DNA histograms)

The DI and coefficient of variation (CV) of each sample were calculated, and cases were defined as diploid or aneuploid. Aneuploid cases were further classified into several categories. The criteria for the evaluation of high-fidelity DNA histograms were recently described by Yu et al. (2007). In brief, the DI of each peak was determined and classified as diploid (DI = 0.9 - 1.10), mild aneuploid (DI = 1.11 - 1.30), moderate aneuploid (DI = 1.31 - 1.80), or severe aneuploid (DI > 1.81). Tetraploid aneuploidy was indicated for histograms with DI between 1.81 and 2.20, which were considered to represent a subtype of severe aneuploidy. When multiple peaks were present, the DI of the most prominent peak was considered.

The percentage of cells with DI exceeding the 5N range (pentaploid range) in the histogram was calculated and sub-classified as normal (less than 1% of the cells exceeding 5N), mild (1% to 5% of the cells exceeding 5N), or severe (more than 5% of the cells exceeding 5N). ACIS III automatically calculated this algorithm. The heterogeneity index (HI) was calculated from the number of clusters of cells with IOD at 0.3 intervals in the histograms, which represents the different bars displayed in the high-fidelity DNA histograms. DNA histograms were classified

in a blind fashion, without knowledge of the origin of the biopsy (young or old patients) or histological grading.

Statistical analysis

All data were analysed using the SAS System (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2002). Non-parametric tests including Mantel-Haenszel chi-square, Kruskal-Wallis, Wilcoxon and Cochran-Mantel-Haenszel tests were performed. $P < 0.05$ was accepted to indicate significance when comparing the groups. To evaluate observer variability during the histopathological gradation analysis, the intraclass correlation coefficient (Kappa) was applied. Correlation studies were performed using Spearman correlation coefficients.

RESULTS

Patients

The incidence of TSCC in young patients ranged from 3.1% to 3.9% of all cases of oral SCC in the oral pathology centres included in this study. Thirty seven young patients with TSCC meeting the inclusion criteria were identified. There was no difference in any of the parameters between the centres. Clinical features of the studied groups of patients are summarised in table 1. The distribution of TNM classifications and clinical stage of the disease at diagnosis are shown in table 2.

In the young group, the mean age of the patients at the time of the biopsy was 33.24 years (with ages ranging from 16 to 40 years). There was a weak male predilection with a male:female ratio of 1.6:1 as well as a strong predominance of white individuals (94.6%). Traditional risk factors for oral carcinoma were less frequent; 51.4% of the patients reported tobacco smoking and 59.4% reported alcohol intake. The group of older patients presented a mean age of 60.64 years (with ages ranging from 50 to 77 years) and a strong male predilection with male:female ratio of 4.6:1. Most of the older patients were white (75%) and reported both tobacco and alcohol consumption (89.3%).

There were significant differences between the younger and the older subjects with regard to gender predilection ($P = 0.002$), tobacco consumption

($P<0.0001$) and alcohol intake ($P<0.0001$). There was no significant difference between the younger and the older subjects with regard to TNM [T ($P=0.2$), N ($P=0.3$), M ($P=0.4$)] or clinical stage of disease at diagnosis ($P=0.3$).

Histological grading

The distribution of histological grading of the tumours is presented in table 3. There was no significant difference between the younger and the older subjects with regard to histological grading of tumours ($P=0.6$). Inter-observer agreement was found in 90% of the cases.

DNA ploidy analysis

In total, 77 samples were analysed (37 from young patients, 28 from old patients and 12 from cases of NOM). DNA ploidy status and severity of aneuploidy are presented in tables 4 and 5. Tumour aneuploidy was detected in 32 of 37 young patients (86.5%). Among the older patients, 18 of 28 (64.3%) cases of TSCC were aneuploid. There was a significant difference ($P<0.0001$) in the incidence of tumour aneuploidy between the groups of young and old patients. Tetraploid tumours were found in 24.3% of the young patients and in 7.2% of older patients ($P<0.0001$). All cases of NOM were classified as diploid and the IOD of the control cells (lymphocytes) had always a CV lower than 10%. Figure 1 shows examples of high-fidelity DNA histograms obtained with the ACIS III from TSCC tissue samples.

The mean DI values of the peaks were significantly different among the three groups ($P<0.0001$) and the severity of aneuploidy was significantly higher in the group of young patients when compared to old patients ($P<0.0001$). The severity of aneuploidy was not related to tobacco consumption ($P=0.7$), alcohol intake ($P=0.55$), T ($P=0.69$), N ($P=0.4$), M ($P=0.9$), clinical stage of disease ($P=0.3$) or histopathological grades of differentiation ($P=0.8$).

HI values provided a better view of the distribution of cells with different DI values. The mean HI value in the NOM group was 13 and it was selected as the cut-off value for further classification of HI elevation, which was then arbitrarily grouped into normal ($HI<13$), mild elevation (HI between 14 and 20), and severe

elevation (HI>20) categories. HI values and grades are presented in table 6. These values were significantly different among the three groups ($P<0.0001$) and between young and old patients ($P<0.0001$), with the young patients presenting the greatest elevation of HI.

NOM cases presented no cells with DI exceeding 5N (5N-EC) and the prevalence of abnormal 5N-EC was clearly higher in the group of young patients with TSCC. The three groups differed significantly ($P<0.0001$) from each other with respect to the fractions exceeding 5N, as shown in table 7.

The degree of aneuploidy, HI values and 5N-EC showed a strong correlation, with colinearity scores ranging from 0.78 (5N-EC and peak DI) to 0.96 (HI and 5N-EC). The mean values of IOD, CV, DI, HI and 5N-EC are described in table 8. For all parameters studied, there were no differences between tumours selected from each of the four centres.

DISCUSSION

The incidence of oral cancer in young patients is considered low and retrospective analyses rarely find more than 6% of all oral SCC cases in patients under 40 years (Sasaki et al., 2005). Thus, the need for multi-centre studies on oral SCC in young people has been suggested in the literature (Porter, Waugh, 2000; Eden, 2006). However, the present study seems to be the first attempt to gather an international sample of young patients with TSCC. This study focused on TSCC because the tongue is the most frequently involved site in young patients with oral cancer (Sasaki et al., 2005; Kaminagakura et al., 2010) and also because such a focus would decrease the heterogeneity of the data.

TSCC has been traditionally accepted as a disease of males. However, the pattern seems to be different in younger patients (Byers, 1975; McGregor et al., 1983; Callery et al., 1984; Jones et al., 1989). The current study showed a high prevalence of females among young patients with TSCC. This is in agreement with other studies which have also reported a high proportion of female patients with no apparent traditional risk factors in the younger age groups (Carniol, Fried, 1982; McGregor et al., 1983; Tsukuda et al., 1993). Although there is a lack of agreement

in the literature regarding demographic features, lifestyle, aetiology, prognosis and outcome in young patients with oral SCC, this multi-centre investigation found that young patients with TSCC were more likely to be non-smokers and non-drinkers, with a higher female prevalence, than older patients, who were predominantly smoking and drinking males.

Friedlander et al. (1998) and Sasaki et al. (2005) found similar histopathological grades of differentiation and stage of disease in young and older patients with oral cancer. It has been suggested that studies reporting opposite results were mainly based on small samples and did not use matched pair analysis (Llewellyn et al., 2001). The present investigation also showed that tumours from both groups of patients presented similar histopathological grade, size, spread to regional lymph nodes, distant metastasis and stage of disease at diagnosis, which contradicts to the common concept that young patients with oral SCC may have poorer outcomes because of advanced disease at presentation (Llewellyn et al., 2001).

The distinct demographic and clinical profile of the young patients with TSCC described here suggests a possible role for unidentified aetiological agents or even unknown risk factors in oral carcinogenesis in young people. In this regard, it is relevant to consider that DNA ploidy studies can identify gross genomic aberrations in human cancer and that new evidence suggests that these ploidy abnormalities may play a critical role in chromosomal instability in oral malignant and potentially malignant lesions (Kristensen et al., 2003; Fang et al., 2004; Torres-Rendon et al., 2009). Further considering that DNA ploidy abnormalities have never been investigated in young patients with oral cancer, in this study we aimed to identify possible biological differences in age-related TSCC by using image cytometry and high-fidelity DNA histograms.

Image cytometry is an accurate technique for measuring DNA content that can recognise abnormal DNA content (aneuploidy), which is regarded as an indicator of genomic instability and is strongly associated with poor prognosis and high risks of recurrence in malignant and premalignant epithelial lesions (Baak, Janssen, 2004). Aneuploidy is a DNA ploidy state that consists of numeric chromosomal aberrations characterized by greater or smaller chromosome

numbers when compared to the DNA content of normal diploid cells. Defects in the cell cycle, the mitotic process, chromosomal segregation, or the DNA damage response as well as gene mutations at the nucleotide level and overexpression of anti-apoptotic genes or inactivation of proapoptotic genes have been suggested as possible mechanisms for aneuploidy and chromosomal instability (Sen, 2000; Gollin, 2005).

DNA image cytometry measures the DNA content (DNA ploidy) of tumour cells by comparing the IOD of control nuclei (lymphocytes) with the IOD of the nuclei of interest. It provides information regarding the number of abnormal DNA stem lines, the polyploidisation of euploid or aneuploid DNA stem lines, and the presence of rare cells with an abnormally high DNA content (Haroske et al., 1998; Böcking, Nguyen, 2004). High-fidelity DNA histograms incorporate two important features: the DI of the peak and the HI of cells with different DI values (Yu et al., 2007). The DI and the proportion of cells exceeding 5N and HI are important parameters that may indicate poor prognosis (Haroske et al., 1998; Kristensen et al., 2003; Yu et al., 2007). Oral SCCs have been extensively investigated by DNA ploidy analyses, with the incidence of aneuploidy ranging from 29% to 90% of the cases (Kaplan et al., 1986; Wennerberg et al., 1998; Abou-Elhamd, Habib, 2007). In the group of old patients with TSCC, 64.3% of the samples were aneuploid, this proportion is similar to that observed in previous studies of DNA ploidy using flow cytometry (Das et al., 2005), image cytometry (Torres-Rendon et al., 2009) and cytofluorometric techniques (Tytor et al., 1987) in the general population with oral SCC. In contrast, 86.5% of the group of young patients presented aneuploid SCCs.

This study shows that younger patients diagnosed with TSCC had worse DNA ploidy abnormalities. This DNA ploidy pattern was independent of the histological grade of the tumour and the extent of disease at diagnosis. None of the investigated clinicopathological features could predict aneuploidy in young patients with TSCC. Similarly, Janot et al. (1996) failed to find a significant association between DNA ploidy and locoregional recurrence. Other studies did not find a relationship between higher degrees of aneuploidy and high metastasis rates (Kaplan et al., 1986; Feinmesser et al., 1990; Saiz-Bustillo et al., 2005). In agreement with the results found in the present study, Diwakar et al. (2004), Huang

et al. (2005) and Torres-Rendon et al. (2009) found no correlation between the histological grade of SCC and the ploidy status.

Tetraploid cells are commonly found in human tumours, particularly in early-stage cancers. Growing evidence suggests that tetraploid cells are genetically unstable populations that arise through cytokinetic failure, cell fusion or mitotic slippage. The main consequence of tetraploidy is the accumulation of numerical and structural chromosome aberrations that could trigger growth arrest or cell death and be associated with a high risk of malignant progression and poor tumour behaviour (Sun, 2006; Ganem et al., 2007; Storchova, Kuffer, 2008).

Oral carcinomas are rarely tetraploid (Diwakar et al., 2004). Baretton et al. (1995) found a tetraploidy rate of only 13% in a total of 106 cases. In contrast, Abou-Elhamd and Habib (2007) found tetraploidy in 37% of oral potentially malignant lesions this rate of tetraploidy seems to be much higher than that observed for oral SCCs. Surprisingly, the present study found a high incidence of tetraploidy in young patients (24.3%) and low incidence among old patients (7.2%). This suggests that young patients with TSCC could represent a distinct population with respect to tumour biology.

Cell nuclei with a DNA content of more than 5N are an important parameter in DNA image cytometry because they are considered to be non-proliferating abnormal cells with aneuploid content and aberrantly high numbers of chromosomes (Haroske et al., 1998). Consequently, 5N-EC over 1% is an indicator of malignancy that is used to evaluate aneuploid lesions (Kristensen et al., 2003; Pektaş et al., 2006). Normal tissue samples are not expected to contain 5N-EC cells; this was confirmed in the study of NOM samples, which failed to show cells exceeding 5N. Conversely, cells from young patients with tongue cancer presented a high proportion of cells exceeding 5N (73% of the cases had more than 5% of cells over 5N) while tumours from old patients with TSCC showed a lower percentage of cells exceeding 5N (21.4% of the cases had more than 5% of cells over 5N).

When associated with aneuploidy, elevated DNA heterogeneity index may represent overlapping clones of new aneuploid cells and is considered a marker of chromosomal instability that is related to a worse clinical outcome (Kronenwett et

al., 2004). Similar to the results of Yu et al. (2007), who found a median HI value of 13 in 34 samples of normal gastrointestinal mucosa, the mean HI value in the NOM cases was 13. All tumours from young patients showed elevated HI values with most presenting severe elevations (89.2%). The majority of tumours from older subjects with TSCC also exhibited elevated HI values but only 39.3% presented severely elevated HI values. Three-quarters of the NOM cases were within the normal HI range, one third exhibited mild elevation and no NOM cases presented severe HI elevation. Increased cellular DNA heterogeneity index, when associated with a diploid case, results from elevated S-phase or G2-phase fractions and may be associated with increased normal proliferation Kronenwett et al., 2004).

Diwakar et al. (2004) described a high incidence of heterogeneity in the DNA content of oral SCC and suggested that a minimum of 5 sections should be assessed for each case to obtain optimal sensitivity. However, although the present study analysed each sample only twice, a high incidence of aneuploidy was found (32 of 37 and 18 of 28 TSCCs in the young and old groups, respectively), which is considered to be higher than that observed in the majority of similar studies. Moreover, the current methodological approach uses image cytometry directly on histological sections, allowing selective examination of malignant epithelial cells. This is considered a more sensitive technique to detect aneuploidy than those performed on cell suspensions (Huang et al., 2005). In previous studies of oral SCC, image cytometry was only performed on cell suspensions.

Comparison of young and old patients with TSCC using high-fidelity DNA histograms revealed that tumours from young patients were more likely to be aneuploid and tetraploid. Also, other parameters related to DNA content abnormalities and genomic instability (DI, 5N-EC and HI) were consistently higher in young patients. Such findings are in line with previous studies that highlighted possible genetic causes for oral SCC in young individuals, especially for young populations without traditional risk factors (Sorensen et al., 1997, Koch et al., 1999, O'Regan et al., 2006; Mallet et al., 2009).

In summary, young patients with TSCC presented a distinct clinical profile with a high female prevalence and limited association with traditional risk factors

such as smoking and drinking. TSCC in patients of 40 years of age or less was not different from that in older patients with respect to tumour size, regional and distant metastasis, clinical stage of disease and tumour grade. On the other hand, DNA ploidy differences were evident between both groups. The high incidence of aneuploidy and the clear detection of DNA ploidy abnormalities may be important evidence to support the hypothesis that young patients with TSCC may have increased genomic instability and to indicate the possibility of underlying genetic differences between TSCC in young and older patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), 470773/2008-1. A. R. Santos-Silva is supported by The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) process 140211/2008-0 and The Higher Education Staff Improvement Coordination (CAPES, Brazil), process BEX: 4691/08-3.

DISCLOSURE/DUALITY OF INTEREST

The authors have no duality of interest to declare.

REFERENCES

1. Abou-Elhamd KE, Habib TN. The flow cytometric analysis of premalignant and malignant lesions in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007;43:366-72.
2. Annertz K, Anderson H, Biörklund A, et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer* 2002;101:95-9.
3. Baak JP, Janssen E. DNA ploidy analysis in histopathology. Morphometry and DNA cytometry reproducibility conditions and clinical applications. *Histopathology* 2004;44:603-14.
4. Baretton G, Li X, Stoll C, et al. Prognostic significance of DNA ploidy in oral squamous cell carcinomas. A retrospective flow and image cytometric study with comparison of DNA ploidy in excisional biopsy specimens and resection specimens, primary, tumors, and lymph node metastasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;79:68-76.
5. Bleyer A, Budd T, Montello M. Adolescents and young adults with cancer: The scope of the problem and criticality of clinical trials. *Cancer* 2006;107:1645-55.
6. Bleyer A, Barr R, Hayes-Lattin B, et al. The distinctive biology of cancer in adolescents and young adults. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:288-98.
7. Böcking A, Nguyen VQ. Diagnostic and prognostic use of DNA image cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma. *Cancer* 2004;102:41-54.
8. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992;166:375-81.
9. Byers RM. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients less than thirty years of age. *Am J Surg* 1975;130:475-8.
10. Callery CD, Spiro RH, Strong EW. Changing trends in the management of squamous carcinoma of the tongue. *Am J Surg* 1984;148:449-54.

11. Carniol PJ, Fried MP. Head and neck carcinoma in patients under 40 years of age. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1982;91:152-5.
12. Das SN, Khare P, Patil A, et al. Association of DNA pattern of metastatic lymph node with disease free survival in patients with intraoral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Res* 2005;122:216-23.
13. Depue RH. Rising mortality from cancer of the tongue in young white males. *N Engl J Med* 1986;315:647.
14. Diwakar N, Sperandio M, Sherriff M, et al. Heterogeneity, histological features and DNA ploidy in oral carcinoma by image-based analysis. *Oral Oncol* 2004;41:416-22.
15. Eden T. Keynote comment: Challenges of teenage and young-adult Oncology. *Lancet Oncol* 2006;7:612-3.
16. Fang M, Lew W, Klein M, et al. DNA abnormalities as marker of risk for progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma: image cytometric DNA analysis in formalin-fixed tissues. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1887-94.
17. Feinmesser R, Freeman JL, Noyek A. Flow cytometric analysis of DNA content in laryngeal cancer. *J Laryngol Otol* 1990;104:485-7.
18. Friedlander PL, Schantz SP, Shaha AR, et al. Squamous cell carcinoma of the tongue in young patients: a matched-pair analysis. *Head and Neck* 1998;20:363-8.
19. Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:157-62.
20. Goldenberg D, Brooksby C, Hollenbeak CS. Age as a determinant of outcomes for patients with oral cancer. *Oral Oncol* 2009;45:e57-61.
21. Gollin SM. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin Cancer Biol* 2005;15:33-42.
22. Haroske G, Giroud F, Reith A, et al. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. European Society for Analytical Cellular Pathology. *Anal Cell Pathol* 1998;17:189-200.

23. Hornick JL, Mino-Kenudson M, Lauwers GY. Buried Barrett's epithelium following photodynamic therapy shows reduced crypt proliferation and absence of DNA content abnormalities. *Am J Gastroenterol* 2008;103:38-47.
24. Huang Q, Yu C, Klein M, et al. DNA index determination with Automated Cellular Imaging System (ACIS) in Barrett's esophagus: comparison with CAS 200. *BMC Clin Pathol* 2005;5:7.
25. Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet 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;33:84-8.
26. Janot F, Klijanienko J, Russo A, et al. Prognostic value of clinicopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective analysis. *Br J Cancer* 1996;73:531-8.
27. Jones JB, Lampe HB, Cheung HW. Carcinoma of the tongue in young patients. *J Otolaryngol* 1989;18:105-8.
28. Kaminagakura E, Vartanian JG, da Silva SD, et al. Case control study on prognostic factors in oral squamous cell carcinoma in young patients. *Head Neck* 2010; Feb 19 [Epub ahead of print].
29. Kaplan AS, Caldarelli DD, Chacho MS, et al. Retrospective DNA analysis of head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986;112:1159-62.
30. Koch WM, Lango M, Sewell D, et al. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope* 1999; 109:1544-51.
31. Kristensen GB, Kildal W, Abeler VM, et al. Large-scale genomic instability predicts long-term outcome for women with invasive stage 1 ovarian cancer. *Ann Oncol* 2003;14:1494-500.
32. Kronenwett U, Huwendiek S, Ostring C, et al. Improved grading of breast adenocarcinomas based on genomic instability. *Cancer Res* 2004;64:904-9.
33. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37:401-18.
34. Macfarlane GJ, Boyle P, Scully C. Rising mortality from cancer of the tongue in young Scottish males. *Lancet* 1987;2:912.

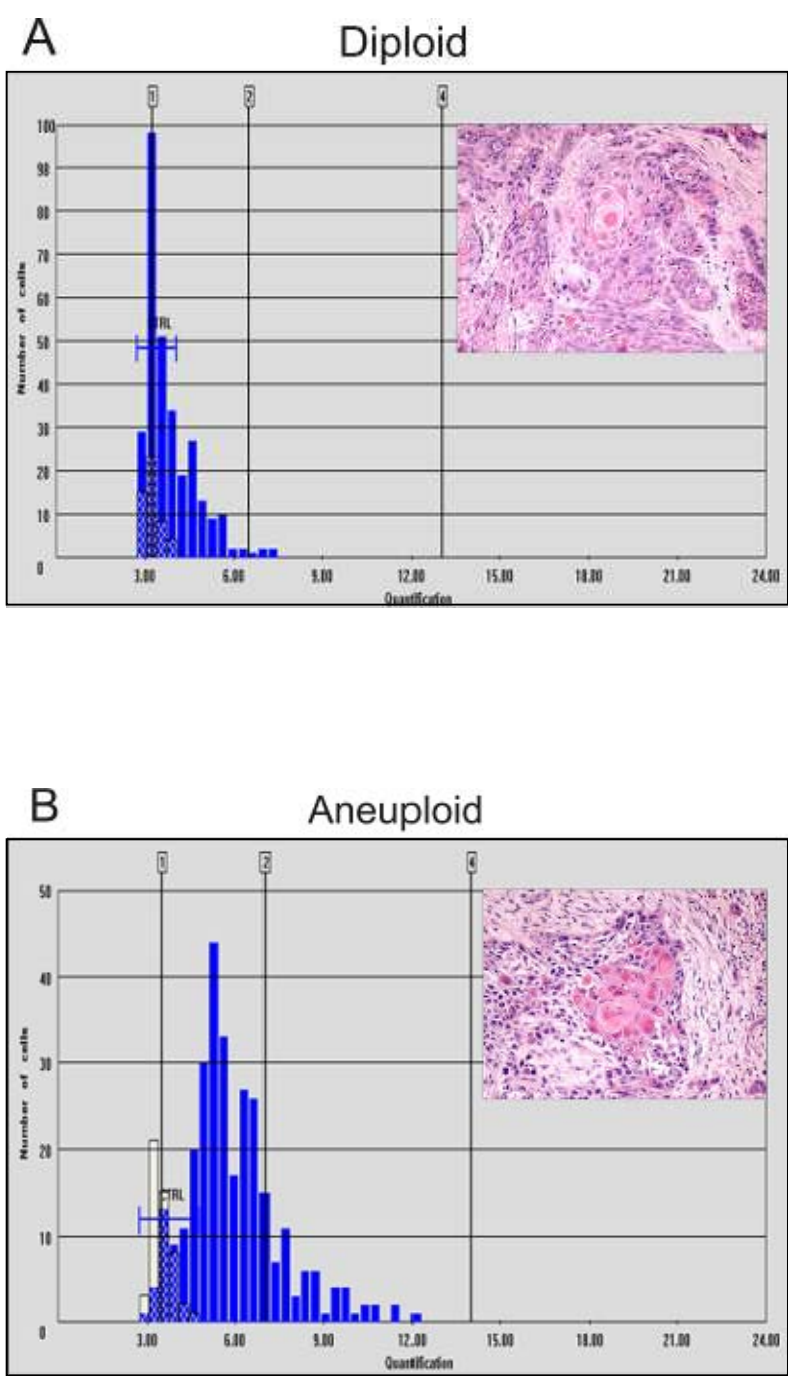
35. Mallet Y, Avalos N, Le Ridant AM, et al. Head and neck cancer in young people: a series of 52 SCCs of the oral tongue in patients aged 35 years or less. *Acta Otolaryngol* 2009;129:1503-8.
36. McGregor GI, Davis N, Robins RE. Squamous cell carcinoma of the tongue and lower oral cavity in patients under 40 years of age. *Am J Surg* 1983;146:88-92.
37. O'Regan EM, Toner ME, Smyth PC, et al. Distinct array comparative genomic hybridization profiles in oral squamous cell carcinoma occurring in young patients. *Head Neck* 2006;28:330-8.
38. Pektaş ZO, Keskin A, Günhan O, et al. Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:628-35.
39. Popovtzer A, Shpitzer T, Bahar G, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients. *Laryngoscope* 2004;114:915-7.
40. Porter S, Waugh A. Comment on: oral cancer in young adults. *Br Dent J* 2000;188:366.
41. Saiz-Bustillo R, Corchero-Martín G, García-Montesinos-Perea B, et al. Oral squamous cell carcinoma. Cytometric parameters of prognostic interest. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:462-7.
42. Sarkaria JN, Harari PM. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. *Head Neck* 1994;16:107-11.
43. Sasaki T, Moles DR, Imai Y, et al. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med* 2005;34:129-33.
44. Schantz SP, Hsu TC, Ainslie N, et al. Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage. *JAMA* 1989;262:3313-5.
45. Schantz SP, Liu FJ. An immunologic profile of young adults with head and neck cancer. *Cancer* 1989;64:1232-7.
46. Sen S. Aneuploidy and cancer. *Curr Op Oncol* 2000;12:82-8.

47. Shemen LJ, Klotz J, Schottenfeld D, et al. Increase of tongue cancer in young men. *JAMA* 1984;252:1857.
48. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and Tonsil Carcinoma Increasing Trends in the U.S. Population Ages 20–44 Years. *Cancer* 2005;103:1843-9.
49. Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, et al. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. *Oral Oncol* 2006;42:831-6.
50. Sobin LH, Wittekind C, editors. *TNM Classification of malignant tumours*. 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002.
51. Sorensen DM, Lewark TM, Haney JL, et al. Absence of p53 mutations in squamous carcinomas of the tongue in nonsmoking and nondrinking patients younger than 40 years. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:503-6.
52. Storchova Z, Kuffer C. The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J Cell Sci* 2008;121:3859-66.
53. Sun XF. Clinicopathological and biological features of DNA tetraploid colorectal cancers. *Cancer J* 2006;12:501-6.
54. Torres-Rendon A, Stewart R, Craig GT, et al. DNA ploidy analysis by image cytometry helps to identify oral epithelial dysplasias with a high risk of malignant progression. *Oral Oncol* 2009;45:468-73.
55. Tsukuda M, Oishi K, Mochimatsu I, et al. Head and neck carcinomas in patients under the age of forty years. *Jpn J Cancer Res* 1993;84:748-52.
56. Tytor M, Franzén G, Olofsson J, et al. DNA content, malignancy grading and prognosis in T1 and T2 oral cavity carcinomas. *Br J Cancer* 1987;56:647-52.
57. Wang Y, Irish J, MacMillan C, et al. High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 AND hMSH2. *Int J Cancer* 2001;93:353-60.
58. Wennerberg J, Baldetorp B, Wahlberg P. Distribution of non-diploid flow-cytometric DNA indices and their relation to the nodal metastasis in

squamous cell carcinomas of the head and neck. *Invasion Metastasis* 1998;18:184-91.

59. Wünsch-Filho V, de Camargo EA. The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: epidemiologic issues. *Semin Oncol* 2001;28:158-68.
60. Yu C, Zhang X, Huang Q, et al. High fidelity DNA histograms in neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Lab Invest* 2007;87:466-72.

FIGURES AND LEGENDS



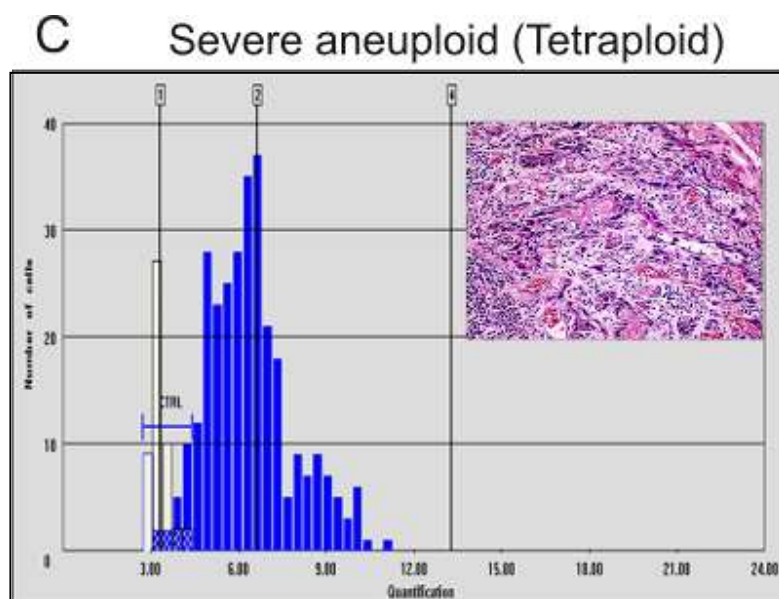


Figure 1. Patterns of high-fidelity DNA histograms obtained with the ACIS III from TSCC tissue samples. An image of the corresponding H&E-stained section is displayed in the upper-right corner of each histogram (200X original magnification). **A.** Diploid histogram with peak DI=0.9, HI=13 and 5N-EC=0%. **B.** Aneuploid histogram with peak DI=1.5, HI=26 and 5N-EC=4.9%. **C.** Severe aneuploid histogram (tetraploid) with peak DI=2.0, HI=23 and 5N-EC=6.6%.

TABLES

Table 1. Clinical features of TSCC in young and old patients.

Clinical Features	Number (%) in each group		
	Young (n=37)	Old (n=28)	Normal* (n=12)
Mean age (years)	33.24±5.82	60.64±7.79	32.25±15.69
Gender			
Male	23 (62.2%)	23 (81.3%)	6 (50%)
Female	14 (37.8%)	5 (18.7%)	6 (50%)
Ethnicity			
White	35 (94.6%)	21 (75%)	12 (100%)
Non-white	2 (5.4%)	7 (25%)	0
Tobacco			
Yes	19 (51.4%)	25 (89.3%)	1 (8.3%)
No	18 (48.6%)	3 (10.7%)	11 (91.7%)
Alcohol			
Yes	22 (59.5%)	25 (89.3%)	1 (8.3%)
No	15 (40.5%)	3 (10.7%)	11 (91.7%)

* Normal = normal oral mucosa.

Table 2. Distribution of TNM classification and clinical stage of disease in young and old patients with TSCC.

TNM	Number (%) in each group	
	Young (n=37)	Old (n=28)
<i>T – classification</i>		
T1	15 (40.5%)	8 (28.6%)
T2	13 (35.1%)	7 (25%)
T3	4 (10.9%)	11 (39.3%)
T4	5 (13.5%)	2 (7.1%)
<i>N – classification</i>		
N0	24 (64.9%)	16 (57.2%)
N1	6 (16.2%)	8 (28.6%)
N2	4 (10.8%)	2 (7.1%)
N3	3 (8.1%)	2 (7.1%)
<i>M – classification</i>		
M0	36 (97.3%)	26 (92.9%)
M1	1 (2.7%)	2 (7.1%)
Stage – classification		
I/II	22 (59.5%)	13 (46.4%)
III/IV	15 (40.5%)	15 (53.6%)

Table 3. Distribution of histopathological grade of differentiation* in young and old patients with TSCC.

Histopathological grade of differentiation	Number (%) in each group	
	Young (n=37)	Old (n=28)
Well	14 (37.9%)	8 (29.5%)
Moderate	20 (54%)	18 (64.7%)
Poor	3 (8.1%)	2 (5.8%)

* According to the criteria of Bryne et al. (1992).

Table 4. Comparison of DNA ploidy status in TSCC from young and old patients.

Groups	Diploid (%)	Aneuploid (%)
Young (n=37)	5 (13.5%)	32 (86.5%)
Old (n=28)	10 (35.7%)	18 (64.3%)
Normal (n=12)	12 (100%)	0

* Normal = normal oral mucosa

Table 5. Severity of aneuploidy in TSCC from young and old patients.

Groups	Aneuploid (%)			
	Mild	Moderate	Severe	Severe (Tetraploid)
Young (n=37)	2 (5.4%)	16 (43.3%)	14 (37.8%)	9 (24.3%)
Old (n=28)	6 (21.4%)	10 (35.7%)	2 (7.2%)	2 (7.2%)
Normal (n=12)	0	0	0	0

* Normal = normal oral mucosa

Table 6. Grades of DNA content heterogeneity index (HI) in TSCC from young and old patients.

Groups	≤ 13 (%)	14-20 (%)	>20 (%)
	Normal	Mild	Severe
Young (n=37)	0 (0%)	4 (10.8%)	33 (89.2%)
Old (n=28)	3 (10.7%)	14 (50%)	11 (39.3%)
Normal (n=12)	9 (75%)	3 (25%)	0

* Normal = normal oral mucosa

Table 7. Rate of cells with DI exceeding 5N in TSCC from young and old patients.

Groups	≤ 1 (%)	1-5 (%)	>5 (%)
Young (n=37)	3 (8.1%)	7 (18.9%)	27 (73%)
Old (n=28)	16 (57.2%)	6 (21.4%)	6 (21.4%)
Normal (n=12)	12 (100%)	0	0

* Normal = normal oral mucosa

Table 8. Mean values of IOD, CV, DI, HI and 5N-EC in TSCC from young and old patients.

DNA ploidy reference numbers	Groups		
	Young (n=37)	Old (n=28)	Normal (n=12)
IOD (mean)	5.99±1.70	4.37±1.12	3.59±0.01
CV (mean)	2.05±1.20	2.44±0.89	2.77±0.16
DI (mean)	1.71±0.50	1.31±0.33	1.05±0.03
HI (mean)	29±6.5	21±6.1	13±1.9
5N-EC (mean)	15±13.5	3.23±6.08	0

CAPITULO 2

Artigo submetido para publicação na Revista da Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas (APCD).

Carcinoma espinocelular de língua em pacientes jovens não tabagistas e não etilistas. Relato de 03 casos clínicos e revisão da literatura.

Alan Roger dos Santos Silva

Marco Aurélio Carvalho de Andrade

Oslei Paes de Almeida

Pablo Agustin Vargas

Jacks Jorge Junior

Márcio Ajudarte Lopes*

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Departamento de Diagnóstico Oral (Áreas de Semiologia e Patologia Oral).

**Autor correspondente:*

Professor Dr. Marcio Ajudarte Lopes

Avenida Limeira, 901, Areão, Piracicaba, SP, Brazil

CEP: 13414-903

Telefone: 19 2106 5320; Fax: 19 2106 5218.

E-mail: malopes@fop.unicamp.br

Carcinoma espinocelular de língua em pacientes jovens não tabagistas e não etilistas. Relato de 03 casos clínicos e revisão da literatura.

RESUMO

O câncer é considerado a segunda causa mais frequente de morte no Brasil e o carcinoma espinocelular (CEC) de boca figura entre as dez neoplasias malignas de maior incidência na população. O CEC de boca afeta tradicionalmente homens com mais de 60 anos de idade que fumam e consomem bebidas alcoólicas por longos períodos de tempo. Uma mudança no perfil da doença tem sido relatada nas últimas décadas caracterizada pelo aumento dos casos em pacientes jovens não tabagistas e não etilistas. Pouco se conhece a respeito dos agentes etiológicos, dos fatores de risco, do comportamento da doença e das melhores formas de tratamento do CEC de boca em jovens. Em função disso, os resultados disponíveis têm se mostrado controversos e o prognóstico do CEC de boca em pacientes jovens é incerto. O entendimento da doença em jovens brasileiros é considerado bastante limitado, o que dificulta o desenvolvimento de diretrizes para prevenção, diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes. O propósito deste artigo é apresentar uma série de 03 pacientes jovens (com menos de 35 anos de idade) não tabagistas e não etilistas que foi diagnosticada com CEC de língua. Detalhes do diagnóstico, do tratamento, do acompanhamento clínico e da evolução da doença são apresentados em conjunto com uma revisão da literatura pertinente. Este artigo tem um inegável potencial educativo a ser considerado pelos cirurgiões-dentistas, uma vez que casos como os deste estudo poderiam ser identificados precocemente se exames bucais completos e sistemáticos fossem aplicados como instrumento de promoção da saúde durante a prática odontológica.

Descritores: Câncer da boca, Carcinoma espinocelular, Pacientes jovens, Fatores de risco.

Tongue squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking young patients. Report of 03 cases and literature review.

ABSTRACT

Cancer is the second most frequent cause of death in Brazil and oral squamous cell carcinoma (OSCC) is among the ten most incident malignant neoplasias in the population. OSCC traditionally affects males with more than 60 years of age who smoke and drink alcohol for long periods of time. A change in the profile of this disease has been reported during the last decades and is characterised by an increase in the number of cases in young patients who do not smoke tobacco and do not drink alcohol. Little is known about aetiological agents, risk factors, disease behaviour and best ways of treating OSCC in youth. Thus, the available results are controversial and the prognosis of OSCC in young patients is uncertain. The understanding of the disease in Brazilian young patients is also very limited, making the development of guidelines for prevention, early diagnosis and treatment of these patients difficult. The purpose of this article is to describe a series of 03 non-smoking and non-drinking young patients (35 years of age or less) diagnosed with tongue SCC. Details regarding diagnosis, treatment, follow-up and disease evolution are presented together with a review of the pertinent literature. This work has educational potential for the dentists because these tumours could be detected at earlier stages if full oral examinations were systematically applied as a tool for health promotion during dental practice.

Descriptors: Oral cancer, Squamous cell carcinoma, Young patients, Risk factors.

RELEVÂNCIA CLÍNICA:

O câncer de um modo geral e o carcinoma espinocelular (CEC) de boca, em particular, tem se revelado doenças de inegável repercussão no planejamento das políticas de saúde pública do Brasil. Sobretudo ante a recente mudança paradigmática do CEC de boca, caracterizada por importante aumento da incidência de casos em jovens que não fumam e que não ingerem álcool, identificada não só na população jovem brasileira como na de outros países. Da relevância clínica do artigo, destacam-se os casos descritos e a revisão da literatura que exploram um problema muito pouco debatido na literatura brasileira. O conteúdo deste artigo tem potencial para despertar maior preocupação nos profissionais da saúde para as condições de saúde bucal de pacientes jovens e talvez aumentar as chances de que lesões bucais graves e prevalentes nesta população sejam reconhecidas.

INTRODUÇÃO

O CEC corresponde a mais de 90% de todas as neoplasias malignas de boca, sendo mais comum em homens na sexta e sétima décadas de vida que consomem tabaco e álcool por longos períodos (Sasaki et al., 2005; Chitapanarux et al., 2006; Scully, Felix, 2006). No Brasil, onde aproximadamente 14 mil novos casos foram estimados para este ano de 2010, o CEC de boca está entre as dez neoplasias malignas mais prevalentes na população (INCA, 2009). Além disso, evidências baseadas em pesquisas efetuadas em diversas partes do mundo têm revelado importante aumento da incidência destes tumores em pacientes jovens (Annertz et al., 2002; Popovtzer et al., 2004; Shiboski et al., 2005; Scully, Felix, 2006; Warnakulasuriya et al., 2007).

Apesar destas constatações, tanto o CEC de boca quanto as lesões potencialmente malignas (principalmente as leucoplasias e as eritroplasias) são ainda consideradas pouco comuns em pacientes jovens, embora não se possa negar as dificuldades para a correta interpretação destas lesões em pacientes jovens, que poderiam ser subestimadas durante o atendimento odontológico

(Annertz et al., 2002; Schantz, Yu, 2002; MacLeod et al., 2005; Siegel et al., 2009). Em função disso os tumores de boca acabam sendo diagnosticados em estágios mais avançados da doença, impondo a necessidade de tratamentos mais agressivos e estando associados a piores prognósticos (Santos-Silva et al., 2010).

Contudo, ainda existem controvérsias relacionadas ao prognóstico do CEC bucal em jovens. Alguns estudos relatam um curso clínico favorável (Lacy et al., 2000; Annertz et al., 2002; Schantz, Yu, 2002; Warnakulasuriya et al., 2007) enquanto outros demonstram piores prognósticos para os jovens (Popovtzer et al., 2004; Mallet et al., 2009). Na literatura científica, são raros os trabalhos que se concentram no melhor entendimento do câncer de boca em jovens brasileiros (Hirota et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; De Paula et al., 2009; Kaminagakura et al., 2010).

Desta forma, os objetivos desse artigo resumem-se a descrever 03 casos clínicos de CEC de língua diagnosticados em pacientes com menos de 35 anos de idade, não tabagistas e não etilistas, os quais foram atendidos em um único centro de Estomatologia, e realizar uma revisão da literatura visando à melhora da compreensão da problemática do câncer de boca em pacientes jovens no Brasil.

RELATO DE CASOS

Caso 1- Paciente do gênero feminino, 21 anos de idade, branca, não fumante e não etilista, em fase final de tratamento ortodôntico, procurou a clínica de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (OROCENTRO), por iniciativa própria, com queixa de “mancha branca na língua”. Durante a anamnese a paciente relatou um discreto desconforto associado à lesão e um tempo de evolução aproximado de 24 meses. A paciente relatou, ainda, ter questionado a origem da lesão para sua equipe de Ortodontia, ocasião em que foi informada de que não se tratava de uma alteração bucal relevante. Ao exame intra-bucal detectou-se uma mancha branca associada a áreas vermelhas na borda lateral esquerda da língua, medindo aproximadamente 2,0 cm X 2,0 cm (Figuras 1 e 2). Com as hipóteses diagnósticas de leucoeritroplasia ou CEC, uma biópsia incisional foi realizada e a análise histopatológica evidenciou proliferação de

ninhos e cordões de células epiteliais atípicas, hipercromáticas e pleomórficas que invadiam tecido conjuntivo profundo, glândulas salivares menores e fibras musculares estriadas esqueléticas. Mitoses atípicas foram encontradas em diversas áreas do tecido analisado (Figura 3). Desta forma, o diagnóstico de CEC foi confirmado e a paciente foi encaminhada para tratamento médico com uma equipe de cirurgia de cabeça e pescoço. Exames complementares baseados em radiografias e tomografia computadorizada não identificaram a presença de metástase regional ou à distância e o estadiamento clínico da paciente no momento do diagnóstico foi classificado como T₁N₀M₀. A abordagem terapêutica consistiu em glossectomia parcial esquerda, associada a esvaziamento supra-omo-hioideo homolateral. Foi realizada reconstrução imediata por meio de enxerto microcirúrgico, utilizando um retalho cutâneo proveniente da região de bíceps do braço esquerdo (Figura 4). A paciente encontra-se em acompanhamento clínico trimestral há 22 meses e não apresentou sinais de recorrência, metástases regionais ou à distância.

Caso 2- Paciente do gênero masculino, 34 anos de idade, branco, não fumante e não etilista, foi encaminhado por uma equipe médica para o OROCENTRO. O exame intra-bucal revelou a existência de uma úlcera infiltrativa na borda lateral direita da língua, com bordas elevadas, cuja principal hipótese diagnóstica de CEC foi confirmada por meio de biópsia incisional. A lesão media aproximadamente 4,0 cm X 3,0 cm e era dolorida à palpação (Figura 5). O paciente foi encaminhado para uma equipe médica de cirurgia de cabeça e pescoço, onde seu tumor foi estadiado como T₂N₀M₀. No entanto, o paciente recusou a proposta terapêutica baseada na glossectomia parcial associada ao esvaziamento cervical supra-omo-hioideo. O paciente procurou por conta própria outro profissional médico, que realizou uma cirurgia “conservadora” com abordagem intra-bucal e sem esvaziamento cervical. O exame histopatológico da peça cirúrgica confirmou o diagnóstico de CEC, com detecção de margens cirúrgicas comprometidas, o que levou o paciente a ser encaminhado para radioterapia pós-operatória (Figura 6). Entretanto, recusou-se também a ser submetido à radioterapia adjuvante.

Infelizmente, em decorrência de persistência local e metástases cervicais da doença, o paciente teve óbito após 10 meses do diagnóstico.

Caso 3- Paciente do gênero feminino, 29 anos de idade, não fumante e não etilista, foi encaminhada por um Dentista da prática privada para o OROCENTRO para a avaliação de uma lesão em língua. A queixa principal da paciente foi uma “ferida” na língua que aparecera há aproximadamente 3 meses e que estava associada a um discreto incômodo. O exame intra-bucal identificou uma extensa úlcera em borda lateral de língua do lado esquerdo, que infiltrava o assoalho bucal e apresentava limites posteriores e profundos imprecisos. A lesão media aproximadamente 5,0 cm x 4,0 cm (Figuras 7 e 8). A partir da hipótese diagnóstica de CEC, foi realizada uma biópsia incisional e a análise histopatológica mostrou a presença de uma intensa proliferação de tecido epitelial atípico, disqueratoses e mitoses atípicas associadas a focos de necrose que confirmaram a impressão clínica de CEC (Figura 9). A paciente foi então encaminhada para tratamento com uma equipe de cirurgia de cabeça e pescoço, que estadiou o tumor como T₃N₂M₀ e realizou hemiglossectomia esquerda associada a esvaziamento cervical radical bilateral, reconstrução imediata da língua por meio de enxerto microcirúrgico utilizando um retalho cutâneo e radioterapia pós-operatória (dose total de 6.100 cGy). No acompanhamento clínico, a paciente apresentou metástase pulmonar após 12 meses do tratamento e metástase cervical após 16 meses do diagnóstico (Figuras 10, 11 e 12). Atualmente, a paciente está sendo tratada com quimioterapia na tentativa de controlar a doença.

DISCUSSÃO

Observam-se na literatura variações quanto ao critério de idade para definir um paciente jovem com CEC de boca. Aparentemente, a maioria dos trabalhos estabelece esse limite como 40 anos de idade (Annertz et al., 2002; Schantz, Yu, 2002; Chitapanarux et al., 2006). No entanto, outra grande parcela dos estudos considera 45 anos como idade limite (Hart et al., 1999; Popovtzer et al., 2004; Chitapanarux et al., 2006; Warnakulasuriya et al., 2007; Ribeiro et al., 2009; De

Paula et al., 2009). Interessantemente, as análises que consideraram pacientes jovens aqueles com até 45 anos de idade encontraram fatores de risco, gênero e estadiamento clínico muito semelhante aos descritos no CEC de boca de pacientes mais velhos (Ribeiro et al., 2009; De Paula et al., 2009). Esta constatação sugere que o parâmetro ideal para considerar um paciente jovem para o CEC de boca seja 40 anos. A média de idade da série de casos apresentados aqui foi de 28 anos (variando de 21 a 34 anos) e, apesar de pequena, a presente amostra representa bem algumas das características descritas como importantes para o perfil dos pacientes jovens com câncer de boca.

Entre os anos de 1960 e 1990, a incidência do CEC de língua na Escandinávia em adultos jovens, com idade entre 20 a 39 anos, aumentou cinco vezes no gênero masculino e seis vezes no gênero feminino, diminuindo a relação entre os gêneros, enquanto nos pacientes idosos os valores dobraram em ambos os gêneros (Annertz et al., 2002). De modo similar, pacientes com até 35 anos de idade, oriundos de diferentes centros médicos franceses, mostraram relação homem/mulher de 1.88:1, enquanto a relação normal para pacientes idosos na França é de 10:1 (Mallet et al., 2009). Contudo, aparentemente não existem estudos epidemiológicos publicados que investigaram o padrão de incidência do CEC de boca em pacientes jovens na população brasileira.

Como não existem protocolos de tratamento individualizados para pacientes jovens com CEC de boca, as modalidades terapêuticas empregadas seguem os mesmos modelos utilizados para pacientes idosos (cirurgia, radioterapia e, eventualmente, quimioterapia) e são baseadas principalmente nos mesmos critérios (estadiamento do tumor, comprometimento das margens cirúrgicas e profundidade de invasão do tumor) (Schmidt, 2006; Bleyer, 2007; Mallet et al., 2009; Kaminagakura et al., 2010). Deve-se ressaltar, entretanto, que esta falta de protocolo de tratamento específico poderia estar associada a um impacto negativo no prognóstico e na sobrevida dos pacientes jovens. Aparentemente, os médicos poderiam ser influenciados pela pouca idade dos pacientes durante o planejamento cirúrgico, o que ocasionaria ressecções insuficientes do tumor na tentativa de preservar função. O pequeno número de CECs bucais nesta

população poderia limitar o treinamento médico e justificar evidências de que o CEC de língua em jovens estaria sendo tratado de modo pouco eficiente (Mallet et al., 2009).

Sugere-se que vários fatores podem estar relacionados, em maior ou menor grau, ao comportamento clínico do CEC bucal em pacientes jovens. Entre eles estão a possível susceptibilidade genética aumentada para tumores (habilidade comprometida em reparar o DNA danificado por agentes carcinogênicos e inabilidade em metabolizar carcinógenos) e a abordagem terapêutica inadequada (procedimentos cirúrgicos conservadores) (Annertz et al., 2002; Chitapanarux et al., 2006; Warnakulasuriya et al., 2007; Mallet et al., 2009).

O momento do diagnóstico é fundamental para o prognóstico. Infelizmente, o CEC de boca é diagnosticado frequentemente em estádios avançados da doença. O mesmo problema tem sido constatado em populações de pacientes jovens brasileiros, o que compromete sobremaneira o tratamento, a qualidade de vida pós-tratamento e a sobrevida dos pacientes jovens (Ribeiro et al., 2009).

Os históricos dos pacientes citados neste trabalho fundamentam bem esta discussão. A paciente do primeiro caso clínico estava em tratamento ortodôntico de longa duração quando identificou sua lesão. Como agravante, mesmo em se tratando de uma alteração bucal de aspecto bastante incomum, a lesão não foi detectada pela sua equipe odontológica. Além disso, chama a atenção o fato de a paciente não ter sido encaminhada e nem mesmo orientada a procurar por um serviço especializado a fim de estabelecer um diagnóstico adequado. Esta constatação expõe a dificuldade de muitos profissionais clínicos gerais ou especialistas, que durante suas consultas não realizam um exame bucal completo e sistematizado em seus pacientes. Evidentemente isso dificulta a identificação de lesões, principalmente aquelas localizadas em regiões anatômicas menos visíveis. Apesar disso, a paciente em questão persistiu procurando auxílio e teve o diagnóstico realizado ainda em momento precoce do desenvolvimento da doença. Infelizmente não foi o que ocorreu com a paciente do caso 3, que apesar de apresentar boas condições dentárias e fazer acompanhamento odontológico periódico, foi diagnosticada em estágio avançado da doença.

O paciente apresentado no caso clínico 2, apesar de se encontrar num estadiamento clínico favorável no momento do diagnóstico (T₂N₀M₀), veio a óbito apenas 10 meses após o diagnóstico em decorrência da persistência da doença que foi tratada incompletamente. Esta situação clínica sugere que fatores emocionais motivaram o paciente a recusar o tratamento proposto, influenciando negativamente o comportamento clínico da doença e, por consequência, o prognóstico. A análise dos casos apresentados neste artigo, amparada pela literatura disponível, sugere que o CEC bucal em pacientes jovens seria uma entidade clínica distinta do CEC em pacientes idosos, fenômeno reforçado pela aparente incidência aumentada em mulheres, em princípio menos sujeitas ao uso de tabaco ou álcool.

CONCLUSÃO

Os casos relatados mostram que, muitas vezes, lesões bucais malignas podem estar localizadas em áreas de difícil visualização direta da boca de pacientes que não apresentam o perfil tradicionalmente associado ao câncer bucal. Esta constatação evidencia a importância dos exames clínicos bucais como ferramentas simples e não dispendiosas para a promoção de saúde. Se aplicados de modo sistemático na rotina odontológica, estes exames poderiam contribuir para o diagnóstico precoce do câncer de boca. Além disso, uma maior atenção deveria ser dada aos pacientes jovens, já que a incidência de lesões bucais malignas neste segmento da população dá indício de estar aumentando.

REFERÊNCIAS

1. Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med* 2005;34:129-33.
2. Chitapanarux I, Lorvidhaya V, Sittitrai P, Pattarasakulchai T, Tharavichitkul E, Sriuthaisiriwong P, et al. Oral cavity cancers at a young age: analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital. *Oral Oncol* 2006;42:83-8.
3. Scully C, Felix DH. Oral Medicine — Update for the dental practitioner. Oral cancer. *Br Dent J* 2006;200:13-7.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
5. Annertz K, Anderson H, Biörklund A, Möller T, Kantola S, Mork J, et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer* 2002;101:95-9.
6. Popovtzer A, Shpitzer T, Bahar G, Marshak G, Ulanovski D, Feinmesser R. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients. *Laryngoscope* 2004;114:915-7.
7. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and Tonsil Carcinoma Increasing Trends in the U.S. Population Ages 20–44 Years. *Cancer* 2005;103:1843-9.
8. Warnakulasuriya S, Mak V, Möller H. Oral cancer survival in young people in South East England. *Oral Oncol* 2007;43:982-6.
9. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:268-74.
10. MacLeod NMH, Saeed NR, Ali EA. Oral cancer: Delay in referral and diagnosis persist. *Br Dent J* 2005;198:681-4.
11. Siegel MA, Kahn MA, Palazzolo MJ. Oral cancer: a prosthodontic diagnosis. *J Prosthodont* 2009;18:3-10.

12. Santos-Silva ARS, Ribeiro AC, Furuse CF, Simonato LE, Mattar NJ, Soubhia AM, et al. Maxillary osteosarcoma in a young patient undergoing post-orthodontic treatment follow-up: The importance of continuous oral examination. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010 (aceito para publicação).
13. Lacy PD, Piccirillo JF, Merritt MG, Zequeira MR. Head and neck squamous cell carcinoma: better to be young. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:253-8.
14. Mallet Y, Avalos N, Le Ridant AM, Gangloff P, Moriniere S, Rame JP, et al. Head and neck cancer in young people: a series of 52 SCCs of the oral tongue in patients aged 35 years or less. *Acta Otolaryngol* 2009;129:1503-8.
15. Hirota SK, Braga FP, Penha SS, Sugaya NN, Migliari DA. Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008;13:E227-31.
16. 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;47:95-8.
17. De Paula AM, Souza LR, Farias LC, Corrêa GT, Fraga CA, Eleutério NB, et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral Oncol* 2009;45:777-82.
18. 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 Feb 19. [Epub ahead of print].
19. Hart AK, Karakla DW, Pitman KT, Adams JF. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a report on 13 cases and review of the literature. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120:828-33.
20. Schmidt C. Lack of progress in teen and young adult cancers concerns researchers, prompts study. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1760-3
21. Bleyer A. Young adult oncology: the patients and their survival challenges. *CA Cancer J Clin* 2007;57:242-55.

FIGURAS E LEGENDAS



Figura 1. Foto intra-bucal da paciente apresentada no caso clínico 1 mostrando boas condições dentárias e de higiene bucal.



Figura 2. Lesão eritroleucoplásica em borda lateral esquerda da língua da paciente apresentada no caso clínico 1.

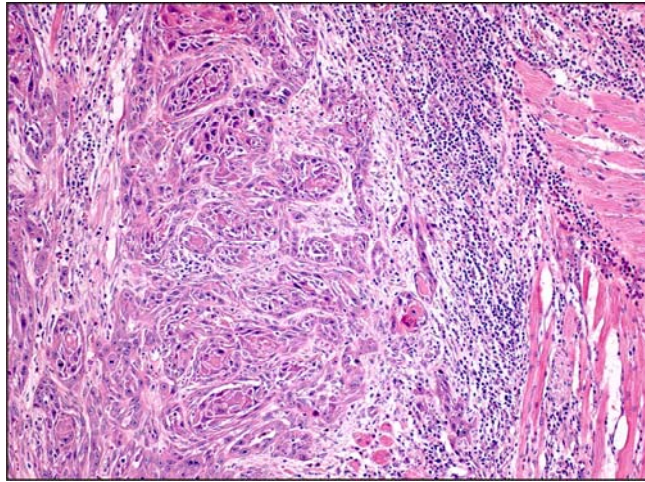


Figura 3. Aspectos microscópicos do CEC diagnosticado na língua da paciente apresentada no caso clínico 1. Nota-se proliferação de grupos de células epiteliais atípicas, hiper Cromáticas e pleomórficas que invadiam tecido conjuntivo profundo e fibras musculares estriadas esqueléticas (H.E, 100x).



Figura 4. Aspecto clínico da língua da paciente apresentada no caso clínico 1 após 20 meses do tratamento cirúrgico. Note a cor mais pálida do tecido cutâneo utilizado como enxerto para a reconstrução microcirúrgica.



Figura 5. Úlcera que infiltrava borda lateral direita da língua do paciente apresentado no caso clínico 2.

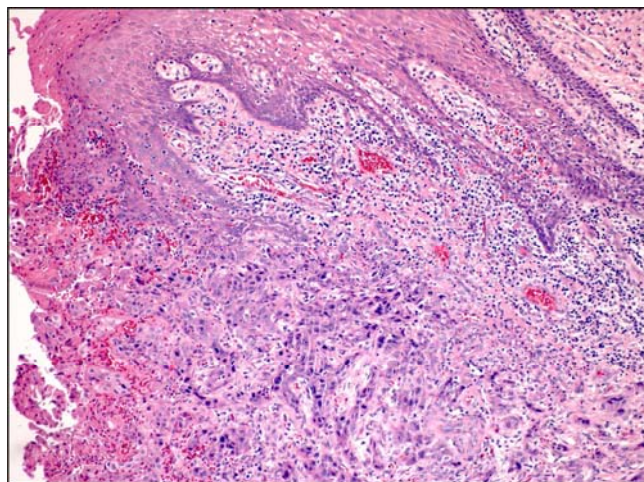


Figura 6. Características microscópicas de tecido proveniente do tratamento cirúrgico do paciente apresentado no caso clínico 2. Nota-se área de transição entre o epitélio de revestimento e uma intensa proliferação de células epiteliais atípicas, hipercromáticas e pleomórficas que invadem tecido conjuntivo (H.E, 50x).



Figura 7. Aspecto intra-bucal da paciente apresentada no caso clínico 3. Notam-se boas condições dentárias e de higiene bucal.



Figura 8. Extensa úlcera, em borda lateral esquerda de língua, que infiltrava o assoalho bucal da paciente apresentada no caso clínico 3.

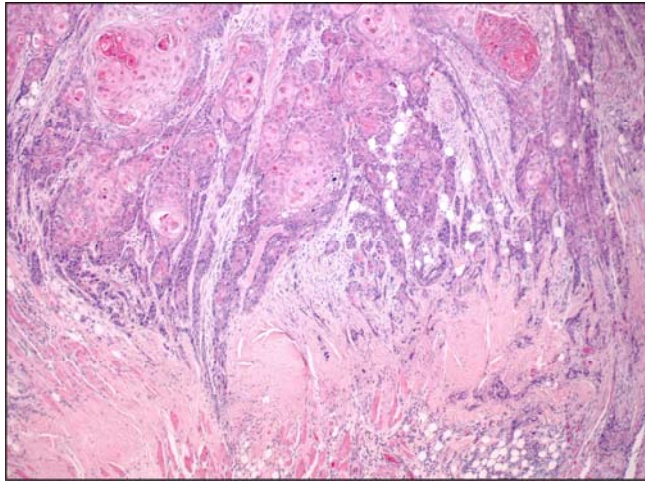


Figura 9. Aspectos microscópicos do CEC de língua da paciente apresentada no caso clínico 3. Observa-se infiltração do tecido conjuntivo profundo por ilhas e cordões de células epiteliais atípicas, hiper cromáticas e pleomórficas (H.E, 50x).



Figura 10. Foto da paciente apresentada no caso clínico 3 mostrando o aspecto bucal após o tratamento cirúrgico. Note que o rebordo ósseo e os dentes posteriores inferiores do lado esquerdo foram removidos durante o tratamento.



Figura 11. Aspecto bucal da paciente apresentada no caso clínico 3 após 12 meses do tratamento. Note a presença da reconstrução cirúrgica da língua com enxerto cutâneo e o brilho da mucosa bucal causado por hipossalivação rádio-induzida.



Figura 12. Foto da paciente apresentada no caso clínico 3 mostrando metástase cervical após 16 meses do tratamento cirúrgico.

CONCLUSÕES

1. Um número aumentado e significativo de mulheres e de pacientes não tabagistas e não etilistas foi detectado na população jovem com CEC de língua avaliada neste estudo.
2. Tumores de pacientes jovens com CEC de língua apresentaram maiores taxas de aneuploidia e de tetraploidia do DNA quando comparados aos tumores de pacientes mais velhos. Constatação semelhante foi observada para os valores de DI, HI e 5N-EC, que foram significativamente maiores nos tumores de pacientes jovens.
3. Pacientes jovens com CEC de língua aparentemente possuem características distintas da população mais velha com o mesmo tumor. Possivelmente, pacientes com menos de 40 anos de idade com CEC de língua apresentam instabilidade genômica aumentada para este tipo de câncer, indicando uma possível natureza genética diferente entre os CECs de língua de pacientes jovens e de pacientes mais velhos.

REFERÊNCIAS*

1. World Health Organization. World Cancer Report, 2008. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2009.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
3. Bleyer WA. Cancer in older adolescents and young adults: epidemiology, diagnosis, treatment, survival, and importance of clinical trials. *Med Pediatr Oncol.* 2002;38:1-10.
4. Eden T. Keynote comment: challenges of teenage and young-adult oncology. *Lancet Oncol.* 2006 7:612-3.
5. Schmidt C. Lack of progress in teen and young adult cancers concerns researchers, prompts study. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:1760-3.
6. National Institutes of Health, National Cancer Institute and the Live Strong Young Adult Alliance. [Internet]. Closing the gap: Research and care imperatives for adolescents and young adults with cancer. A report of the Adolescent and Young Adult Oncology Progress Review Group [acesso em 10 de Jun, 2008]. Estados Unidos: Department of Health and Human Services, National Cancer Institute, Disponível em: http://planning.cancer.gov/disease/AYAO_PRG_Report_2006_FINAL.pdf (2006).
7. Bleyer A. Young adult oncology: the patients and their survival challenges. *CA Cancer J Clin.* 2007;57:242-55.
8. Bleyer A, Budd T, Montello M. Adolescents and young adults with cancer: The scope of the problem and criticality of clinical trials. *Cancer.* 2006;107:1645-55.
9. Scully C, Felix DH. Oral Medicine — Update for the dental practitioner. Oral cancer. *Br Dent J.* 2006;200:13-7.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editor – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

10. Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, et al. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. *Oral Oncol.* 2006;42:831-6.
11. Hyam DM, Conway RC, Sathiyaseelan Y, et al. Tongue cancer: Do patients younger than 40 do worse? *Aust Dent J.* 2003;48:50-4.
12. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med.* 2004;33:525-32.
13. Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med* 2005;34:129-33.
14. Venables CW, Craft IL. Carcinoma of the tongue in early adult life. *Br J Cancer.* 1967;21:645-50.
15. Shemen LJ, Klotz J, Schottenfeld D, et al. Increase of tongue cancer in young men. *JAMA.* 1984;252:1857.
16. Depue RH. Rising mortality from cancer of the tongue in young white males. *N Engl J Med.* 1986;315:647.
17. Macfarlane GJ, Boyle P, Scully C. Rising mortality from cancer of the tongue in young Scottish males. *Lancet.* 1987;2:912.
18. Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol.* 2000;36:387-9.
19. Wünsch-Filho V, de Camargo EA. The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: epidemiologic issues. *Semin Oncol.* 2001; 28: 158-68.
20. Annertz K, Anderson H, Björklund A, et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer.* 2002;101:95-9.
21. Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet 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;33:84-8.

22. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and Tonsil Carcinoma Increasing Trends in the U.S. Population Ages 20–44 Years. *Cancer*. 2005; 103:1843-9.
23. Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, et al. Analysis of histopathological and immunohistochemical differences of oral squamous cell carcinoma in young and old patients in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med*. 2007;36:357-62.
24. Ribeiro AC, Silva AR, Simonato LE, et al. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009;47:95-8.
25. Kuriakose M, Sankaranarayanan M, Nair MK, et al. Comparison of oral squamous cell carcinoma in younger and older patients in India. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1992;28B:113-20.
26. Regezi JA, Dekker NP, McMillan A, et al. p53, p21, Rb, and MDM2 proteins in tongue carcinoma from patients < 35 versus > 75 years. *Oral Oncol*. 1999;35:379-83.
27. Hirota SK, Braga FP, Penha SS, et al. Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13:E227-31.
28. De Paula AM, Souza LR, Farias LC, et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral Oncol*. 2009;45:777-82.
29. Kaminagakura E, Vartanian JG, da Silva SD, et al. Case control study on prognostic factors in oral squamous cell carcinoma in young patients. *Head Neck*. 2010 Feb 19. [Artigo aceito para publicação].
30. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37:401-18.
31. Porter S, Waugh A. Comment on: oral cancer in young adults. *Br Dent J* 2000;188:366.

32. Bleyer A, Barr R, Hayes-Lattin B, et al. The distinctive biology of cancer in adolescents and young adults. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:288-98.
33. Mallet Y, Avalos N, Le Ridant AM, et al. Head and neck cancer in young people: a series of 52 SCCs of the oral tongue in patients aged 35 years or less. *Acta Otolaryngol*. 2009;129:1503-8.
34. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*. 1992;166:375-8



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Análise das características clínicas, histopatológicas, imunoistoquímicas e ploidia em pacientes jovens com câncer de boca. Estudo multicêntrico"**, protocolo nº 076/2008, dos pesquisadores Alan Roger dos Santos Silva e Marcio Ajudarte Lopes, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 13/08/2008.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Analysis of the clinical, histopathological and immunohistochemical characteristics and ploidy study of young patients with oral cancer. A multicentric study."**, register number 076/2008, of Alan Roger dos Santos Silva and Marcio Ajudarte Lopes, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 08/13/2008.



Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.