



IRIS SAWAZAKI CALONE

**“O VALOR PROGNÓSTICO DOS SISTEMAS DE GRADAÇÃO
HISTOPATOLÓGICA EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES
ORAIS”**

**“THE PROGNOSTIC VALUE OF HISTOPATHOLOGICAL GRADING
SYSTEMS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS”**

PIRACICABA
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

IRIS SAWAZAKI CALONE

**“O VALOR PROGNÓSTICO DOS SISTEMAS DE GRADAÇÃO
HISTOPATOLÓGICA EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES
ORAIS”**

**“THE PROGNOSTIC VALUE OF HISTOPATHOLOGICAL GRADING
SYSTEMS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS”**

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Doutora em Estomatopatologia na área
de Patologia.

Doctorate thesis presented to the
Piracicaba Dental School of the
University of Campinas to obtain the
Ph.D. grade in Stomatopathology, in
Pathology area.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta
Co-orientadora: Ana Lucia Carrinho Ayroza
Rangel

Este exemplar corresponde à versão final da
tese defendida pela aluna Iris Sawazaki e
orientada pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Assinatura

PIRACICABA
2014

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

Sawazaki-Calone, Iris, 1974-
Sa96v O valor prognóstico dos sistemas de gradação histopatológica em carcinoma
espinocelulares orais / Iris Sawazaki Calone. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Ricardo Della Coletta.
Coorientador: Ana Lucia Carrinho Ayroza Rangel.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Sobrevida. 3. Histopatologia. 4.
Prognóstico. I. Della Coletta, Ricardo, 1972-. II. Rangel, Ana Lucia Carrinho
Ayroza. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The prognostic value of histopathological grading systems in oral
squamous cell carcinomas

Palavras-chave em inglês:

Carcinoma, squamous cell

Survivorship

Histopathology

Prognosis

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutora em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Ricardo Della Coletta [Orientador]

Cleverton Roberto de Andrade

Lays Martin Sobral

Jacks Jorge Junior

Marcio Ajudarte Lopes

Data de defesa: 15-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



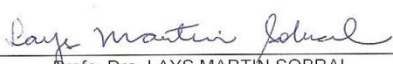
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 15 de Agosto de 2014, considerou a candidata IRIS SAWAZAKI CALONE aprovada.



Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

Prof. Dr. CLEVERTON ROBERTO DE ANDRADE

Profa. Dra. LAYS MARTIN SOBRAL

Prof. Dr. JACKS JORGE JUNIOR

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

Resumo

O carcinoma espinocelular (CEC) representa cerca de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral. Rotineiramente o tratamento e prognóstico desta doença são baseados na localização do tumor e no sistema TNM de classificação dos tumores malignos, no entanto há uma grande variação no comportamento biológico entre tumores no mesmo sítio e dentro do mesmo estadio clínico. Diante deste problema, vários sistemas de gradação histopatológica foram propostos para determinar o prognóstico e o plano do tratamento de pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) oral. Este estudo avaliou quatro sistemas de gradação histopatológica – (1) sistema OMS (Organização Mundial de Saúde), (2) sistema MG (gradação de malignidade de margens invasivas profundas), (3) modelo HR (modelo de risco histológico) e (4) modelo BD (ninho de células tumorais e profundidade de invasão) – e comparou com dados clínico-patológicos e sobrevida em uma amostra de 113 pacientes com CEC oral primário, excluindo lábios. Os critérios de inclusão foram: pacientes diagnosticados e tratados entre 1998 e 2008, dados clínicos e demográficos completos, tratamento baseado em cirurgia radical com ou sem radioterapia e/ou quimioterapia pós-operatória e disponibilidade de todos os blocos de parafina. Associações significativas com sobrevida na análise univariada foram observadas com todos os sistemas de gradação histopatológica, excetuando o sistema MG. No entanto, aplicando a análise multivariada de COX, apenas o modelo BD foi significativamente associado com sobrevida livre de doença como um marcador prognóstico independente. A idade (>56 anos), o tamanho do tumor (estágio T3/T4) e a presença de metástase regional (estágio N+) foram também apontados como marcadores independentes da sobrevida dos pacientes. Nenhuma correlação clara entre os quatro sistemas de gradação foi observada aplicando o teste de correlação de Spearman. Os resultados do presente estudo revelaram uma associação significativa entre o modelo BD e a evolução clínica dos pacientes com CEC oral, reforçando a importância deste novo sistema de gradação histopatológica como possível ferramenta prognóstica no pós-operatório.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas. Sobrevida. Histopatologia. Prognóstico.

Abstract

Squamous cell carcinoma (SCC) represents almost 95% of all malignant tumors that affect the oral cavity. Routinely the treatment and prognosis of this disease are based on its location and in the TNM classification of malignant tumors, however there is a great variation in the biological behavior among tumors at same location and clinical stage. In the view of those difficulties, several histopathological grading systems were proposed in order to determine the prognostic and the treatment plan of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). This study evaluated four histopathological grading systems – (1) WHO (World Health Organization) system, (2) MG (malignancy grading of the deep invasive margins) system, (3) HR (histological risk) model and (4) BD model (tumor budding and depth of tumor invasion) – and compared with clinicopathological data and survival in a sample of 113 patients with primary OSCC, excluding lips. The inclusion criteria included who were diagnosed and treated from 1998 to 2008, complete demographic and clinical data, treatment based on radical surgery with or without postoperative radiotherapy and/or chemotherapy, and availability of all paraffin-embedded blocks. Significant associations with survival were observed for all histopathological grading systems, with exception of the MG system. However, when multivariate regression analysis was applied, only BD model was significantly associated with disease-free survival as an independent prognostic marker. Age (>56 years), tumor size (T3/T4 stage) and presence of regional metastasis (N+ stage) were also independent markers of reduced survival. No clear correlation between the four grading systems was observed applying the Spearman's rank test. The results of the present study revealed a significant association between BD model and outcome of OSCC patients, reinforcing the importance of this new histopathological grading system as a possible postoperative prognostic tool.

Keywords: Carcinoma, squamous cell. Survivorship. Histopathology. Prognosis.

Sumário

Dedicatória.....	xiii
Agradecimentos.....	xv
Introdução.....	1
Capítulo 1: The prognostic value of histopathological grading systems in oral squamous cell carcinomas.....	11
Conclusão.....	41
Referências.....	42
Anexo 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	51

Dedicatória

À Deus, Pai criador , que me guia pelos seus caminhos de amor.

Ao meu esposo, Ivair Calone, exemplo de perseverança, atitude e ética, confidente dos meus momentos de dúvida, sempre trazendo lucidez aos meus pensamentos. Seu apoio incondicional me impulsiona a sempre buscar os melhores caminhos. Com você me sinto plena. A vida é mais bela ao seu lado.

Aos meus filhos Pedro e Luiza que mesmo tão pequenos me compreenderam nos momentos em que estive ausente e valorizaram meu trabalho com sua curiosidade e admiração. Vocês são os presentes que Deus me deu nesta vida. Meu amor por vocês é imensurável.

Ao meu pai, Mario Sawazaki que me mostrou desde criança o valor da pesquisa. Meu grande incentivador, exemplo de serenidade e paciência que traz equilíbrio a minha alma.

À minha mãe Izabel Yuriko Sawazaki, meu exemplo de força e perseverança. Sempre inovando e firme diante das intempéries da vida. Seu entusiasmo pela vida é minha inspiração.

Aos meus irmãos Marcio Sawazaki e Renato Sawazaki, irmãos de alma e de profissão. Com vocês sempre aprendo o valor da solidariedade, do apoio incondicional e da sinceridade. Poder contar sempre com vocês traz paz ao meu coração.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Professor Doutor Jacks Jorge Júnior.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, na pessoa do reitor Paulo Sergio Wolff, diretor de campus Alexandre Almeida Webber, diretora de centro Joseane Rodrigues da Silva Nobre, coordenador de colegiado Eduardo Tanaka de Castro que em conjunto com a Universidade Estadual de Campinas viabilizaram a execução deste programa de doutorado.

Ao Professor Doutor Ricardo Della Coletta e Professora Doutora Ana Lucia Carrinho Ayroza Rangel pela iniciativa e o empenho de nos proporcionar o doutorado interinstitucional FOP/UNICAMP e UNIOESTE.

Ao Professor Doutor Alan Roger dos Santos Silva, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas. Muito obrigada pela oportunidade de vislumbrar novos caminhos.

Ao meu orientador Professor Doutor Ricardo Della Coletta que, com extremo profissionalismo e prontidão, me guiou na execução deste trabalho de tal maneira que ele acrescentasse inigualavelmente na minha formação como docente e pesquisadora. Sua orientação foi exemplar e foi um divisor de águas na minha carreira como docente. Foi uma honra poder ter sido sua orientada.

À minha co-orientadora e amiga Professora Doutora Ana Lucia Carrinho Ayroza Rangel. Seu primor como pesquisadora e docente me inspira sempre a buscar melhorias. Muito obrigada pelo incentivo, pelos ensinamentos e pelo apoio. Sem você esta caminhada não teria acontecido.

Aos Professores Doutores do Departamento de Diagnóstico Oral, áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Ricardo Della Coletta, Alan Roger dos Santos Silva, Jacks Jorge Júnior, Pablo Vargas, Marcio Ajudarte Lopes, Edgard Graner e Oslei Paes de Almeida. Obrigada pelos ensinamentos.

A todas as 113 pessoas e seus familiares que emprestaram seus dados clínicos para que esta pesquisa pudesse ocorrer. A vocês que bravamente lutam ou lutaram contra a doença todo meu respeito e agradecimento.

Ao Hospital de Câncer UOPECCAN e ao Centro de Oncologia Cascavel CEONC que permitiram e viabilizaram os meios para a busca de prontuários e informações.

Ao Dr. Reno P. Kunz, obrigada pela confiança e por viabilizar o acesso a todos os dados clínicos e demográficos para que esta pesquisa alcançasse êxito.

Ao Dr. Hildebrando M. Nagai pelas preciosas trocas de informações que elucidaram várias etapas desta pesquisa.

Ao Dr Géser Vinicius Silva Soares, pelas importantes considerações a respeito do tratamento dos pacientes de cabeça e pescoço.

À Dra. Vanessa Cristina Ferreira Ishisato por sempre apoiar as atividades de pesquisa com o curso de odontologia da UNIOESTE.

À Kelyn Cristina da Cruz Aires do Hospital UOPECCAN obrigada por sempre viabilizar os meios para a realização das pesquisas e do ensino da

odontologia hospitalar e, desta forma, podermos contribuir para que os pacientes possam ter cada vez mais qualidade no tratamento oncológico.

À Raquel de Oliveira Bueno da Silva do Hospital UOPECCAN. Obrigada por sempre me ajudar a confirmar os dados dos pacientes. Sua gentileza e eficiência é admirável.

Ao Rodinei João Sguissardei e Valéria Caroline Miranda Massotti do Hospital UOPECCAN. O excelente trabalho de cada um de vocês foi fundamental para que os dados desta pesquisa fossem coletados fielmente.

À Ana Keli de Almeida Oliveira do Hospital CEONC, muito obrigada por localizar todos os prontuários dos pacientes do hospital. Sem o seu rigor na localização dos documentos mais antigos não teríamos alcançado êxito. Ter convívio com você, uma pessoa tão querida e positiva, foi um grande presente.

À Janice Gehlen do Hospital CEONC, exemplo de prestatividade e gentileza, muito obrigada por me auxiliar na confirmação do seguimento dos pacientes.

À senhora Erica Elfrida Valansuelo do Hospital Nossa Senhora da Salete que tão gentilmente me auxiliou na busca de prontuários antigos. Obrigada pelo auxílio e pelas orações.

A Roberta Serpe de Lima Bordin, chefe da SCVGE da 10ª Regional de Saúde – Cascavel, pela prontidão e gentileza em sempre confirmar os dados de seguimento dos pacientes que compuseram esta pesquisa.

Aos laboratórios ANATOM e APC de Cascavel que, graças ao excelente sistema de organização de dados permitiu uma apurada fidelização dos dados.

Ao Dr. Alexandre G. Bueno e Ana Maria Bueno que confiaram em meu trabalho e me ofereceram amplo acesso no laboratório ANATOM, me auxiliando gentilmente em todos os momentos. Poder ter tido a oportunidade de conviver com vocês em seu harmonioso ambiente de trabalho foi um grande presente.

Ao técnico Valmir Dallatozza do laboratório ANATOM, obrigada pelo auxílio na busca dos blocos parafinados arquivados e pelas palavras de apoio e incentivo.

Ao Dr. Carlos Floriano de Moraes do laboratório APC. Muito obrigada pela confiança, pelos ensinamentos e pelas importantes observações científicas. Seu apoio à pesquisa se fez presente em todas as etapas da minha formação científica, desde o mestrado até o doutorado.

Aos integrantes desta pesquisa Roberto Longoni de Souza e Laura Rutkauskis que, com muita perseverança, me auxiliaram a coletar e organizar os dados que compõem esta pesquisa. Poder contar com vocês foi fundamental nas primeiras etapas desta pesquisa.

A todos os funcionários da Secretaria de Saúde de Cascavel, Unidades Básicas de Saúde de Cascavel e região oeste do Paraná que gentilmente me atenderam e me ajudaram a confirmar os dados dos pacientes.

Aos meus colegas de disciplina que me ofereceram o suporte para que eu pudesse me ausentar das aulas e me dedicar aos estudos: Prof^a Dra. Adriane de Castro Martinez Martins, Prof^a Dra. Ana Lucia Carrinho Ayroza Rangel, Prof^a

Dra. Fabiane Seguin, Prof^a Francielle Hirata , Prof.Dr. Greison Rabelo de Oliveira e Prof^a Dra.Rosana Berticelli.

À amiga e técnica do laboratório de patologia da UNIOESTE Marlene de Oliveira Baú pelo apoio no processamento das lâminas e pela preciosa e agradável convivência no laboratório.

Aos meus colegas de doutorado Alexandre Almeida Webber, Eduardo Tanaka de Castro, Helenara Salvati Bertolossi Moreira, Gustavo Kyosen Nakayama, Joseane Rodrigues da Silva Nobre, José Neto da Costa, Juliana Cristina Frare, Satio Inagaki e à amiga de viagens e longas e agradáveis conversas Tatiana Santos Assumpção Iachinski. Obrigada pelo companheirismo nesta caminhada.

Aos professores doutores que compuseram minha banca de qualificação de tese, Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva, Prof^a Dra. Andréia Aparecida Silva e Prof^a Dra. Carine Ervolino de Oliveira. Obrigada pelo esmero na correção e pelas importantes considerações que promoveram melhorias no trabalho.

Introdução

O carcinoma espinocelular (CEC), também denominado carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide é uma neoplasia maligna derivada do epitélio pavimentoso estratificado e representa cerca de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral (Scully e Bagan, 2009).

O CEC oral é usualmente uma doença que acomete mais os homens após a quinta década de vida (Johnson et al., 2011). De forma alarmante, 4 a 6% dos casos de câncer oral no mundo têm ocorrido em pacientes com idade inferior a 40 anos (Llewellyn et al., 2001). Neste grupo, a etiologia e o prognóstico permanecem obscuros (Majchrzak et al., 2014), embora alguns estudos tenham relatado indicativos de um comportamento mais agressivo do CEC oral afetando jovens (Son e Kaap, 1985; Sarkaria e Harari, 1994; Garavello et al., 2007; Santos-Silva et al., 2011). O CEC oral está fortemente relacionado à condição econômica e social, com as taxas mais altas ocorrendo nos setores mais pobres da sociedade (Conway et al., 2008). Os homens, devido ao maior consumo de tabaco e álcool têm as taxas de incidência muito maior que as mulheres (Warnakulasuriya, 2010), porém, devido ao aumento do tabagismo pelas mulheres e ao aumento da expectativa de vida da população a diferença entre as taxas de incidência de CEC oral entre os dois gêneros tem diminuído (Kantola et al., 2000). No Brasil a estimativa é que ocorra a incidência de 11.280 novos casos em homens e 4.010 novos casos em mulheres para 2014. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

A etiologia do CEC oral é multifatorial, sendo o fumo de tabaco e a ingestão de bebida alcoólica os fatores mais correlacionados. As variantes genéticas no receptor nicotínico de acetilcolina e nos genes do metabolismo do álcool têm sido associados com a propensão a adquirir o vício do tabagismo e alcoolismo, respectivamente, e também ao aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer oral (Anantharaman et al., 2014).

O fumo do tabaco é o fator de risco mais proeminente para o desenvolvimento do CEC oral com o risco relativo (RR) de 3.43 (95% CI: 2.37–4.94) para fumantes em relação aos não fumantes (Gandini et al., 2008). Os cigarros, sua forma mais usual de consumo, têm aproximadamente 4.700 substâncias, pelo menos 50 das quais carcinogênicas, incluindo os seguintes componentes: hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, aminas aromáticas e N-nitrosaminas (Hoffmann e Hoffmann, 1997).

Os possíveis mecanismos ligados à carcinogênese pela ingestão de álcool estão correlacionados principalmente aos efeitos genotóxicos do acetaldeído, o principal metabólito do etanol, e ao seu sinergismo com o tabaco, promovendo o aumento da permeabilidade da mucosa oral e agindo como um solvente para os carcinógenos do tabaco (Boffetta e Hashibe, 2006; Goldstein et al., 2010; Feller et al., 2013). O consumo de tabaco e álcool são associados não somente como fatores de riscos para o desenvolvimento do CEC oral, mas também como um dos principais fatores que interferem no prognóstico da doença como evidenciam os trabalhos de Kantola et al. (2000) e de Aguiar et al. (2007) onde o consumo de álcool foi significativamente associado com o decréscimo na sobrevivência de pacientes com CEC de língua em estadio III/IV e com maior chance de recidiva local precoce, respectivamente, e em Rodrigues et al. (2014) que relacionam o fumo do tabaco como fator prognóstico independente para sobrevida global e sobrevida específica.

A radiação solar, particularmente os raios ultravioletas, é a principal causa de carcinomas de pele, sendo também responsável pela etiologia dos CECs do lábio inferior. Os raios UV provocam alterações no DNA pela formação de dímeros de pirimidina e supressão imunológica (Cotran e Kumar, 2005).

O HPV (papilomavírus humano) é associado a diversos cânceres como carcinoma de orofaringe (60% dos CECs nesta localização contêm evidências do HPV), laringe, esôfago, colo de útero, vulva e pênis. HPVs tem como alvo específico as células da camada basal da mucosa que são expostas após um trauma tecidual. As proteínas do HPV, especialmente as oncoproteínas E6 e E7,

interagem, com diferentes graus de afinidade, com proteínas da célula hospedeira promovendo o distúrbio da diferenciação epitelial normal e da apoptose através da estimulação da proliferação celular e da inibição dos reguladores do ciclo celular como o p53 e o pRB (Doorbar, 2007). A expressão contínua e aberrante dos genes E6 e E7 leva a instabilidade genômica e a eventos mutacionais no epitélio que resultam em transformação maligna (Stanley et al, 2007). A implicação do HPV no desenvolvimento do CEC oral é ainda um assunto controverso com pesquisadores sugerindo que o HPV, principalmente o HPV 16, tenha um papel na carcinogênese oral (Syrjanen et al, 1983; Miller e Johnstone, 2001; Syrjänen et al., 2011; Markopoulos et al., 2012) e outros que não encontram a mesma correlação (Krüger et al., 2014; Rushatamukayanunt et al., 2014.).

As características clínicas do CEC oral incluem desde lesões vermelhas (eritroplasias) ou brancas (leucoplasias) nas fases iniciais até lesões proliferativas e ulceradas com necrose e extensão às estruturas vizinhas como osso, músculo e pele. Nos estágios terminais, os pacientes podem apresentar-se com fístula orocutânea, sangramento não tratável, anemia grave e caquexia. Os sintomas variam de ausentes, vagos ou mínimos achados físicos até a dor, dor referida auricular, halitose, disfonia, trismo, disfagia, sangramento, perda de peso e edema cervical (metástase regional) em tumores no estágio avançado (Johnson et al., 2005). Os CECs orais demonstram progressão e prognóstico variáveis. A língua é considerada o sítio mais comum, compreendendo de 25 a 40% dos casos de CEC oral e juntamente com o CEC de assoalho de boca (15 a 20%) somam mais da metade dos cânceres orais excluindo aqueles que afetam os lábios (Bello et al., 2010).

Histologicamente as lesões de CEC oral se caracterizam por uma proliferação epitelial com células espinhosas pleomórficas com núcleos hiper cromáticos, nucléolos evidentes e figuras mitóticas atípicas. A proliferação epitelial mostra um padrão invasivo ao tecido conjuntivo subjacente, formando ninhos ou ilhas de células epiteliais malignas. Observa-se também queratinização com formação variável de “pérolas”. Invasões angiolinfáticas e perineurais são

sinais adicionais de malignidade. A avaliação histopatológica do grau em que estes tumores lembram o seu tecido de origem (epitélio escamoso) e produzem seu produto normal (queratina) é denominado gradação (Johnson et al., 2005).

O estadiamento clínico do CEC oral é baseado no tamanho da lesão primária, em sua dispersão para linfonodos regionais e na presença ou ausência de metástases à distância. O sistema de estadiamento mais utilizado para CEC oral foi desenvolvido pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) e é denominado de sistema TNM de classificação dos tumores malignos. A letra T representa o tamanho e as características do tumor primário, N as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza e M presença ou ausência de metástases à distância. Uma vez determinado os três parâmetros, seus valores são registrados conjuntamente a fim de determinar o estadio adequado. As categorias de estadiamento clínico TNM variam de estadio I a IV, sendo que o estadio IV ainda possui subdivisões em IVA, IVB e IVC. Quanto maior for o estadio de classificação, pior é o prognóstico (Sobin e Wittekind, 2002). O sistema TNM continua sendo a ferramenta mais importante para o planejamento do tratamento e prognóstico dos CECs orais (Kantola et al., 2000; Kademani et al., 2005; Woolgar e Triantafyllou, 2009; Dissanayaka et al., 2012). A desvantagem mais proeminente no uso deste sistema é a alta propensão de metástases ocultas loco-regionais e a deficiência em não conseguir prever as variações biológicas dos tumores, visto que tumores com a mesma classificação podem ter comportamentos distintos (Keski-Säntti et al., 2007). Além disso, a palpação clínica para nódulos cervicais apresenta uma taxa aproximada de 30% de falsos negativos (Bello et al., 2010) o que leva muitos pesquisadores a questionar seu poder preditivo como ferramenta prognóstica única (de Aguiar et al., 2007; Marsh et al., 2011) e a sugerir que outros fatores prognósticos devem ser adicionados à classificação TNM (Montero et al., 2014).

O tratamento do CEC oral baseia-se principalmente em cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia é recomendada quando há possibilidade de cura com a ressecção do tumor e a condição geral de saúde do paciente

permite a realização do procedimento (Rodgers et al., 1993). A radioterapia pós-operatória ou radioterapia associada à quimioterapia é indicada em casos de tumores avançados (T3/T4), margens cirúrgicas comprometidas ou próximas, invasão perineural, invasão vascular ou envolvimento linfonodal (N+) (Bernier et al., 2004). Em uma revisão sistemática de literatura sobre o tratamento do câncer oral e de orofaringe por Furness e colaboradores (2011), a quimioterapia aumentou entre 8 a 10% a taxa de sobrevida e a quimioterapia e radioterapia adjuvante concomitante aumentou a taxa de sobrevida para acima de 16%. A radioterapia primária com ou sem quimioterapia não é indicada rotineiramente, mas pode ser empregada em algumas situações como: a) em casos de estadios iniciais a fim de evitar defeitos funcionais e estéticos importantes, principalmente nos casos de carcinoma de lábio b) para tumores irresssecáveis, c) para pacientes com alto risco operatório devido a comorbidade ou pobre estado de saúde geral d) doença recorrente com cirurgias múltiplas prévias impossibilitando nova cirurgia e e) preferência do paciente (Huang e O'Sullivan, 2013). Em pacientes com tumores irresssecáveis, evidências demonstram que a radioterapia e a quimioterapia aplicadas concomitantemente ou de forma alternada foi associada com melhora da sobrevida entre 10 a 22% (Furness et al., 2011).

O estadio o qual o câncer oral é diagnosticado tem um efeito significativo na sobrevida global e no aumento das morbidades relacionadas ao tratamento (Scully e Kirby, 2014). As taxas de sobrevida de 5 anos para o CEC oral no Brasil variam de 35% a 85% para os tumores em estadio I (tumores ≤ 2 cm e sem comprometimento linfonodal) , 26 a 77% para os tumores em estadio II (> 2 até 4 cm e sem comprometimento linfonodal) , 10 a 50% quando o tumor for ≥ 4 cm sem metástase ou com metástase em um único linfonodo regional ipsilateral ≤ 3 cm (estadio III) e de 0 a 26% quando o tumor tiver invadido estruturas adjacentes, tiver metastatizado para um sítio distante ou estiver associado a metástase regional para múltiplos linfonodos, para um único linfonodo ipsilateral >3 cm e ≤ 6 cm ou um linfonodo >6 cm (estadio IV) (Anatômica, 2001). No entanto, a evolução clínica nem sempre segue estes parâmetros, indicando que outros fatores

relacionados ao paciente ou às características biológicas do tumor podem ser relevantes (de Aguiar et al., 2007). Alguns estudos sugerem que a gradação histopatológica detalhada da peça cirúrgica aliada ao sistema TNM sejam atualmente os melhores critérios para o manejo pós-operatório e também para predição do prognóstico de pacientes com CEC oral (Woolgar, 2006; Woolgar e Triantafyllou, 2009; Dissanayaka et al., 2012).

A gradação histopatológica ainda recomendada pela OMS (Organização Mundial de Saúde) para os CECs orais foi descrita inicialmente por Broders em 1920 (Broders, 1920) e classifica os tumores em bem, moderadamente e pobremente diferenciado. Um tumor que é maduro o suficiente para lembrar muito bem o seu tecido de origem é classificado como CEC bem diferenciado. Um tumor com muito pleomorfismo celular e nuclear e predominância de células imaturas, com numerosas mitoses atípicas e com pouca ou nenhuma produção de queratina é denominado pobremente diferenciado ou anaplásico. Um tumor que apresente aparência microscópica situado entre estes dois extremos é considerado carcinoma moderadamente diferenciado (Johnson et al., 2005). No entanto, a aplicação do sistema de gradação OMS na prática clínica é controversa e muitos autores reconhecem que esta classificação histopatológica apresenta uma baixa correlação com a evolução e a resposta ao tratamento (Heffner, 2002; Woolgar, 2006).

Vários pesquisadores, ao longo dos anos, apresentaram propostas de gradação histopatológica com intuito de correlacioná-la melhor com o prognóstico da doença.

Anneroth e colaboradores em 1987 propuseram um sistema que avalia dois parâmetros: população de células tumorais e relação tumor-hospedeiro. O primeiro aspecto considera o grau de queratinização, o pleomorfismo nuclear e o número de mitoses nas partes mais indiferenciadas do tumor, enquanto o segundo avalia o padrão de invasão, o estágio de invasão e o infiltrado linfoplasmocitário, sendo que os parâmetros são graduados de 1 a 4.

Bryne et al. (1992) basearam-se no sistema de Anneroth e colaboradores (Anneroth et al., 1987) e o modificaram removendo dois parâmetro histopatológicos (estágio de invasão e número de mitoses) e avaliando somente as áreas mais anaplásicas dentro dos locais mais invasivos do tumor (fronte tumoral) atribuindo escore de 1 a 4 dependendo da intensidade com que o grau de queratinização (escore 1 - alto; escore 2 - moderado; escore 3 - mínimo e escore 4 – ausente), o pleomorfismo nuclear (escore 1 - discreto; escore 2 - moderado; escore 3 - significativo e escore 4 – predominante) e o infiltrado linfoplasmocitário (escore 1 - abundante; escore 2 - moderado; escore 3 - discreto e escore 4 – ausente) se apresentavam ou da forma com que o padrão de invasão se mostrava no fronte tumoral, sendo atribuído escore 1 ao padrão de invasão com bordas bem delineadas, escore 2 ao padrão de invasão em forma de ilhas ou cordões infiltrantes, escore 3 ao padrão com grupos ou cordões de células ($n > 15$ células) e escore 4 ao padrão de células soltas ou pequenos grupos ($n < 15$ células). Ao final da avaliação, os escores atribuídos a cada parâmetro histopatológico são somados e classificados em três grupos de acordo com o prognóstico da doença, sendo que o resultado da soma dos escores entre 4 e 8 é classificado como bom prognóstico, entre 9 e 12 como moderado e entre 13 e 16 como prognóstico pobre. Este método, intitulado gradação de malignidade das margens invasivas profundas (MG), foi apontado como possível ferramenta prognóstica em vários trabalhos ao longo dos anos sendo utilizado tanto em espécimes oriundos de biópsias quanto de ressecções cirúrgicas (Spiro et al., 1999; Costa et al., 2005; Kurokawa et al., 2005; Gueiros et al., 2011).

Em 2005, Brandwein-Gensler et al. em um estudo com uma amostra de 292 pacientes com CEC oral propuseram um sistema de gradação histopatológica altamente prognóstico para recidiva e sobrevivência global. O método, aplicado a peças cirúrgicas, consiste na pontuação em três níveis (scores: 0, 1 e 3) de parâmetros histopatológicos como padrão de invasão, presença de infiltrado linfocítico e invasão perineural sendo intitulado de modelo de risco histológico. O padrão de invasão foi examinado na interface tumor/hospedeiro, sempre elegendo

o pior padrão de invasão mesmo que focal. Neste método, é adotado os mesmos quatro padrões de invasão utilizados por Bryne et al.(1992) e acrescentado um quinto padrão de invasão para reconhecer um padrão de infiltração tumoral altamente disperso com, pelo menos, 1 mm de tecido normal interposto entre células tumorais e o fronte de invasão do tumor. A resposta inflamatória linfocítica na interface tumor/hospedeiro apresenta três níveis. O padrão tipo 1 corresponde a uma banda densa e contínua de tecido linfóide, o padrão 2 é atribuído quando o infiltrado linfocítico é moderado e descontínuo e o padrão 3 representa um infiltrado escasso ou, até mesmo, ausente. A classificação da invasão perineural leva em consideração a ausência, a presença e o tamanho do nervo invadido, sendo nervos pequenos (diâmetro < 1 mm) ou grandes (diâmetro ≥ 1 mm). A atribuição de pesos é diferente para cada parâmetro histopatológico avaliado. Atribuí-se escore 0 para os padrões de invasões de um a três, para o infiltrado linfocítico padrão tipo 1 e para a ausência de invasão perineural. O escore 1 é atribuído para o padrão de invasão tipo quatro, para o infiltrado linfocítico tipo 2 e para a invasão perineural de pequenos nervos. O escore 3 é atribuído para o padrão de invasão tipo cinco, para o infiltrado linfocítico tipo 3 e para a invasão perineural de grandes nervos. Similarmente ao sistema MG (Bryne et al., 1992), os escores são somados e classificados em três grupos prognósticos: bom quando a soma dos escores é igual a zero, intermediário quando a soma dos escores é 1 ou 2 e prognóstico pobre quando a soma dos escores está entre 3 e 9. Este método foi validado em um projeto multicêntrico com uma amostra de 305 pacientes de CEC de cabeça e pescoço demonstrando como resultado a aplicabilidade deste método na prática clínica (Brandwein-Gensler et al., 2010). Subsequentemente, vários trabalhos apontaram este método como uma possível ferramenta prognóstica para o CEC oral (Vered et al., 2010a; Vered et al., 2010b; Li et al., 2012; Lindenblatt et al., 2012; Sinha et al., 2013).

Recentemente, uma nova proposta de sistema de gradação histopatológica aplicada a peças cirúrgicas, denominada modelo BD onde “B” representa as palavras de língua inglesa *tumor budding* – ninho de células

tumorais e “D” representa a palavra de língua inglesa *depth of invasion* – profundidade de invasão, demonstrou correlação significativa com a sobrevivência de pacientes com CEC de língua em estádios iniciais (Almangush et al., 2014). O ninho de células tumorais é definido como a presença de células tumorais isoladas ou pequenos agrupamentos com menos de 5 células tumorais no fronte invasivo. Para avaliar este parâmetro, todas as lâminas da peça cirúrgica do tumor são analisadas em baixa magnificação (x4) e, na área com a maior quantidade de ninhos de células tumorais, estas são contadas em maior magnificação (x20). A profundidade de invasão é medida desde a superfície do tumor até o ponto mais profundo de invasão. O ponto de corte para a contagem dos ninhos de células tumorais e para a profundidade de invasão foi estabelecido em 5 ninhos e 4 mm, respectivamente. O resultado da análise dos padrões histopatológicos são classificados em três grupos: (1) Escore 0: tumor com profundidade de invasão <4mm e ninhos de células tumorais ausente ou < 5 no fronte invasivo; (2) Escore 1: o tumor deve ter uma das seguintes características: a - tumor com profundidade de invasão $\geq$ 4mm e <5 ninhos de células no fronte invasivo ou b - tumor superficial (< 4mm), mas com alta atividade de ninhos de células no fronte invasivo ($\geq$ 5buds) e (3) Escore 2: tumor com profundidade de invasão $\geq$ 4mm e com alta atividade de ninhos de células no fronte invasivo ($\geq$ 5 buds). De acordo com o escore atribuído, os casos são divididos em três classes prognósticas: baixo risco para os casos com escore 0, risco intermediário para os casos com escore 1 e alto risco para os casos com escores 2.

Como destacado, não há um consenso sobre a validade dos sistemas de gradação histopatológica para o câncer oral. O objetivo deste estudo foi avaliar 4 sistemas de gradação histopatológica, – (1) Organização Mundial de Saúde evoluída à partir de Broders (Broders, 1920) e revisada em 2005 (Barnes et al., 2005), (2) gradação de malignidade de margens invasivas profundas descrita por Bryne et al. (1992), (3) modelo de risco histológico (Brandwein-Gensler et al., 2005) e (4) modelo BD (Almangush et al., 2014) e correlacioná-las com dados

clínico-patológicos e sobrevida com o objetivo de identificar o papel destes sistemas no prognóstico dos CECs orais.

Capítulo 1

The prognostic value of histopathological grading systems in oral squamous cell carcinomas

Running title: Histopathological grading systems in oral cancer

I. Sawazaki-Calone^{1,2}, A.L.C.A. Rangel¹, A.G. Bueno³, C.F. Morais⁴, H.M. Nagai⁵, R.P. Kunz⁶, R.L. Souza¹, L. Rutkauskis¹, T. Salo⁷, A. Almangush⁷, R.D. Coletta²

¹Oral Pathology and Oral Medicine, Dentistry School, Western Paraná State University, Cascavel, PR, Brazil;

²Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil;

³ANATOM Anatomic Pathology Laboratory, Cascavel, PR, Brazil;

⁴APC Anatomic Pathology Laboratory, Cascavel, PR, Brazil;

⁵UOPECCAN Cancer Hospital, Cascavel, PR, Brazil;

⁶Oncology Center of Cascavel (CEONC), Cascavel, PR, Brazil;

⁷Department of Diagnostics and Oral Medicine, Institute of Dentistry and Oulu University Hospital, University of Oulu, and Institute of Dentistry, University of Helsinki, Finland.

Corresponding author: I. Sawazaki-Calone, Oral Pathology and Oral Medicine, Dentistry School, Western Paraná State University, Rua Universitária, 2069, Jardim Universitário, CEP: 85819-110, Cascavel, PR, Brazil. Phone number: +55 45 33063933. E-mail: irisodonto@yahoo.com.br

Conflict of interest statement: None declared

Abstract

Aim: This study evaluated the association of 4 histopathological grading systems - WHO grading system, malignancy grading of the deep invasive margins (MG), histological risk (HR) model, and tumor budding and depth of invasion (BD) model - with clinicopathological parameters and outcome of 113 oral squamous cell carcinomas (OSCC) with the aim of identifying the role of those systems on prognosis.

Methods and results: Demographic and clinical features were obtained from patient's records. Sections from all paraffin-embedded blocks were evaluated according to the 4 grading systems. Demographic and clinical associations were analyzed using chi-square test. The correlation between the grading systems was established using Spearman's rank correlation test. Survival curves were performed with Kaplan-Meier method, and multivariate analysis based on Cox proportional hazard model was calculated. Significant associations with survival were observed for all histopathological grading systems in univariate analysis, with exception of the MG system, but only BD model was significantly associated with disease outcome as an independent prognostic marker. Age, tumor size and presence of regional metastasis were also independent markers of reduced survival.

Conclusion: A significant association between BD model and outcome of OSCC patients was observed, indicating this new histopathological grading system as a possible prognostic tool.

Keywords: oral squamous cell carcinoma, histopathological grading system, survival analysis, prognosis, oral cancer.

Introduction

Clinical staging of the disease based on TNM classification and location of the tumor are routinely the main criteria for prognostication and treatment of oral squamous cell carcinomas (OSCC)¹. However, variations in treatment response and prognosis are high for OSCCs, with patients presenting tumors at same site and clinical stage reporting prolonged survival while others may die due to disease shortly. In the view of those difficulties, it has been proposed that a detailed histopathological grading of the tumors with specific histopathological score systems could help the clinicians in the individualization of treatment and in prognostication of the patients with OSCC²⁻⁵.

The first histopathological grading system for OSCCs was developed by Broders in 1920⁶, which was later adopted for the World Health Organization (WHO)⁷. This system takes into account the degree of keratinization of the tumor, levels of cellular and nuclear pleomorphism and presence of mitotic activity. Later on, many other histopathological grading systems have been proposed for OSCCs in the last century. The malignancy grading of the deep invasive margins (MG) proposed by Bryne and collaborators⁸ is a system that scores the degree of keratinization, nuclear polymorphism, pattern of invasion and lymphoplasmocytic infiltration only in the most anaplastic fields in the most invasive areas. This grading system has been used for prognostication and therapeutic determination of

OSCCs with satisfactory results^{9, 10}. Similarly, the histological risk (HR) model proposed by Brandwein-Gensler et al.⁴, which is based on the evaluation of surgical specimens using 3 histopathological parameters: worst pattern of invasion (WPOI), lymphocytic host response (LHR) and perineural invasion (PNI), showed a significant predictive power for recurrence and overall survival in OSCC¹¹⁻¹⁶. Recently, Almangush et al.¹⁷ introduced BD model, which based on the two parameters: tumor budding (B) and depth of tumor invasion (D) in millimeters. In the initial description, this system showed a strong potential to identify aggressive OSCCs¹⁷. Most important, to date no histopathological grading system is universally accepted to OSCC.

This research was conducted to evaluate the association of 4 different histopathological grading systems - WHO grading system⁷, MG system⁸, HR model⁴ and BD model¹⁷- with demographic and clinical features and outcome of 113 OSCC patients.

Patients and Methods

Patients

This study was conducted with 113 patients with primary OSCC, excluding lips, who were diagnosed and treated at two reference hospitals of Cascavel, state of Paraná, Brazil: the Oncology Center of Cascavel (CEONC, n=46 patients) and the UOPECCAN Cancer Hospital (n=67 patients) from 1998 to 2008. The inclusion criteria included complete demographic and clinical data, treatment based on

radical surgery with or without postoperative radiotherapy and/or chemotherapy, and availability of all paraffin-embedded blocks. Informed consent was obtained from each patient according to the declaration of Helsinki and the study was carried out with approval of the Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School, University of Campinas (approval number 100/2012).

Demographic and clinical data, including gender, age, habits such as smoking and alcohol consumption, tumor location, TNM stage, status of the surgical margins, recurrence, metastasis, presence of a second primary tumor, treatment and survival, were obtained from patient's records. The outcomes were categorized as overall survival (time from treatment initiation until death or last follow up information), disease-specific survival (time from treatment initiation until death due to cancer or last known date alive), and disease-free survival (time from treatment initiation until diagnosis of the first recurrence (local, regional or distant) or last follow-up information for those without recurrence).

Histopathology analysis

Paraffin-embedded blocks from the surgical resections of all cases were retrieved and new sections were stained with hematoxylin and eosin (HE). The slides were evaluated according to 4 histopathological grading systems: WHO grading system⁷, MG system⁸, HR model⁴ and BD model¹⁷. Scoring were carried out simultaneously by 2 authors (ISC and ALCAR) until achieve consensus. All investigators were blinded to demographic and clinical data and outcomes.

Statistical analysis

Correlations between the histopathological grading systems and demographic and clinical parameters of the tumors were performed by cross-tabulation and chi-square test. Spearman's rank correlation test was used to determine the correlation between the different grading systems. Survival curves were constructed based on the Kaplan-Meier method and compared with the Log-rank test. For multivariate survival analysis, the Cox proportional hazard model with a stepwise method, including all parameters in relation of the histopathological grading system, was employed. The level of significance considered was 5% ($p \leq 0.05$).

Results

Out of 113 OSCC patients, 95 (84.1%) were men, and the age of the patients ranged from 31 to 84 years, with a median of 56 years. Nine patients (7.9%) were under 40 years old. Seventy six (67.3%) patients were smokers and 59 (52.2%) reported drinking alcohol. Regarding T stage, 88 patients (77.9%) were classified as T1/T2 tumors and 25 patients (22.1%) as T3/T4. Fifty eight (51.3%) patients showed regional metastasis at diagnosis (N+), and all patients were staged as M0 at time of diagnosis. Fifty patients (44.2%) were classified in clinical stage I or II (early stage) and 63 (55.8%) were classified at advanced clinical stage (stages III or IV). Surgery as monotherapy was performed in 45 (39.8%) of the patients, whereas 57 (50.5%) were treated by combination of surgery and postoperative

radiotherapy and 11 (9.7%) had the combination of surgery, postoperative radiotherapy and chemotherapy. Radiotherapy was mainly advocated to patients in advanced-stages of the disease, with positive neck disease or with surgical margins less than 5 mm. Four (6.3%) cases had surgical margins with less than 5 mm. During follow-up, 28 (24.8%) patients developed local recurrence (24 local only, and 4 local and regional), 8 (7.1%) developed regional recurrence and 2 (1.8%) patients developed distant recurrence. The overall survival ranged from 1 to 146 months, with a mean of 49.5 months. Fifty nine patients (52.2%) died due to the tumor and 10 (8.8%) died due to other causes.

The associations of the histopathological grading systems with demographic and clinical features of the tumors are shown in Table 1. The WHO grading system classified 17 (15%) tumors in well differentiated, 83 (73.5%) in moderately differentiated and 13 (11.5%) in poorly differentiated (Fig. 1). Poorly differentiated tumors were significantly associated with advanced T stage (T3/T4, $p=0.02$). According to the MG system, 11 (9.7%) were classified in low risk, 85 (75.2%) in intermediate risk and 17 (15.1%) in high risk (Fig. 2 and 3). Statistically significant associations with T stage ($p=0.04$) and sequence of treatment ($p=0.05$) were found. No significant correlations were observed between the epidemiological and clinical parameters of the OSCCs and the HR model. HR model classified 6 (5.3%) tumors in low risk, 46 (40.7%) in intermediate risk and 61 (54%) in high risk (Fig. 4). The BD model classified 18 (15.9%) cases in low risk, 46 (40.7%) in intermediate risk and 49 (43.7%) in high risk (Fig. 5). BD model presented strongly association with the sequence of treatment ($p=0.005$). Spearman's coefficient was

measured for all 4 histopathological grading systems to determine the degree of association between them (Table 2). Spearman's rank analysis showed moderate correlation between WHO grading system and MG system ($r_s=0.54$, $p<0.0001$) and weak correlation between HR model and MG system ($r_s=0.29$, $p<0.002$) and between HR model and BD model ($r_s=0.30$, $p<0.001$).

The 5-year overall survival, disease-specific survival and disease-free survival were 43%, 46% and 62% respectively. Overall survival was significantly influenced by T stage ($p=0.004$), lymph nodal status ($p=0.003$), WHO grading system ($p=0.007$), HR model ($p=0.03$), and BD model ($p=0.007$) (Table 3). On disease-specific survival, statistically significant differences were demonstrated according to T stage ($p=0.001$), lymph nodal status ($p=0.001$), WHO grading system ($p=0.01$) and BD model ($p=0.009$). The disease-free survival was associated only with BD model ($p=0.005$) (Table 3). The adjusted multivariate analysis based in Cox proportion regression identified that age and lymph nodal metastasis were significant associated with overall survival and disease specific survival, whereas T stage and BD model were the parameters that presented significant association with disease-free survival (Table 4).

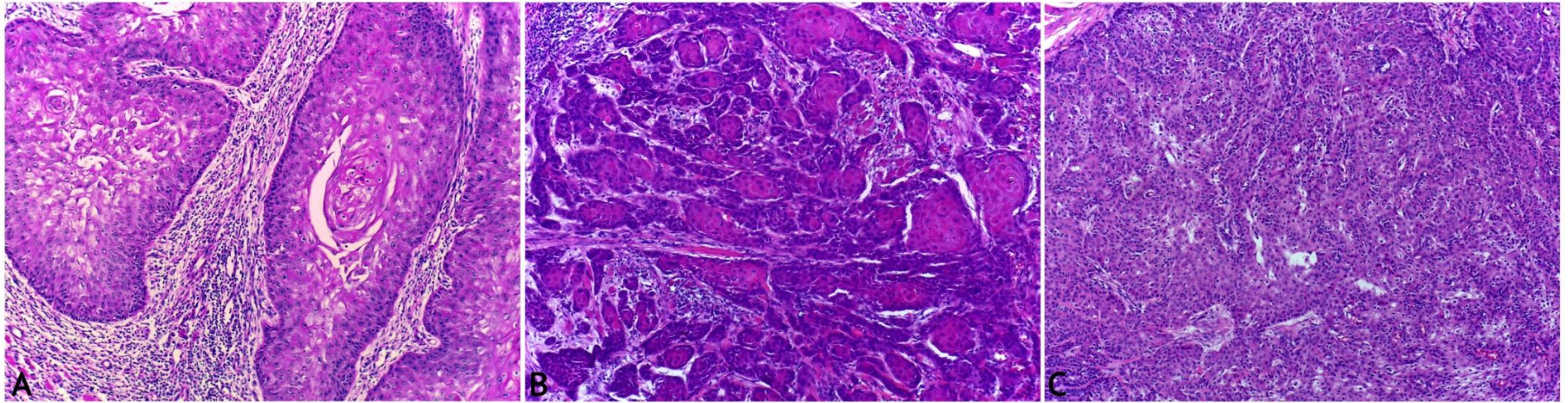


Fig. 1. Representative samples of WHO grading system. (A) well-differentiated OSCC; (B) moderately differentiated OSCC and (C) poorly differentiated OSCC. (original magnification x100)

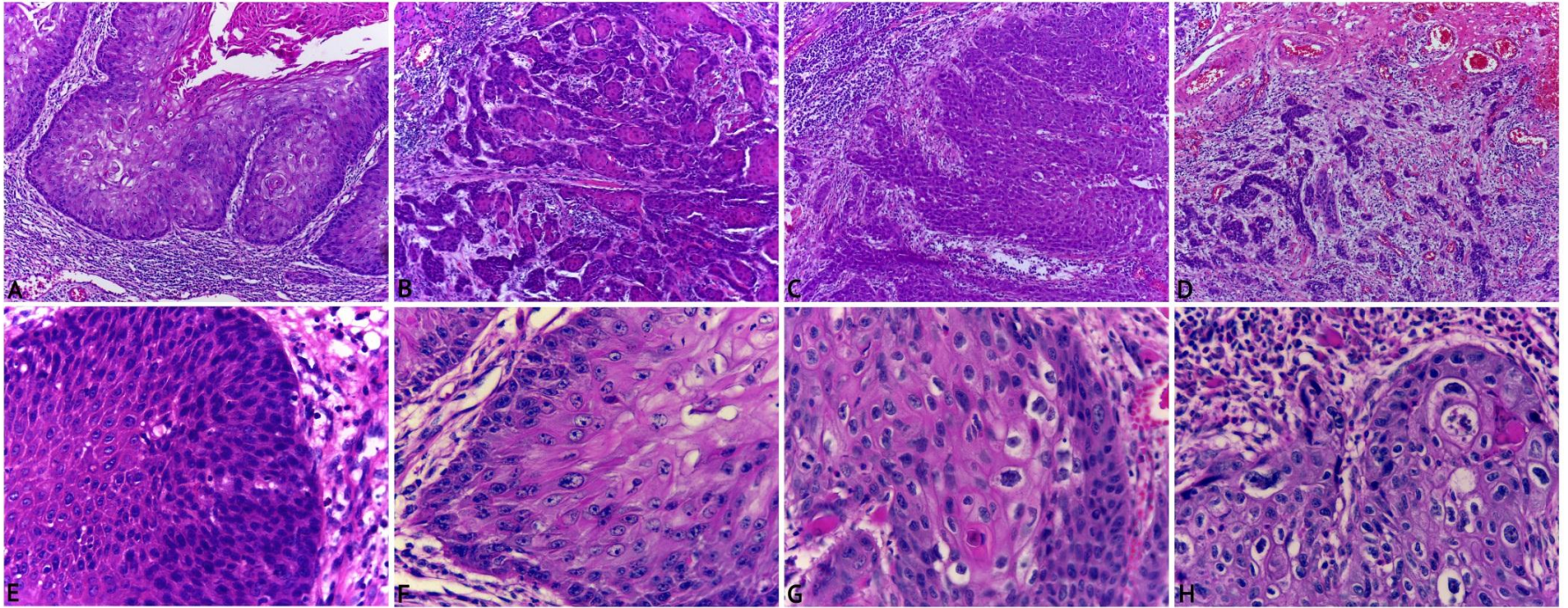


Figure 2. Representative samples classified with base in the MG grading system. Degree of keratinization: (A) grade 1, (B) grade 2, (C) grade 3 and (D) grade 4. Nuclear pleomorphism: (E) grade 1, (F) grade 2, (G) grade 3 and (H) grade 4. (original magnification A-D x100 and E-H x400)

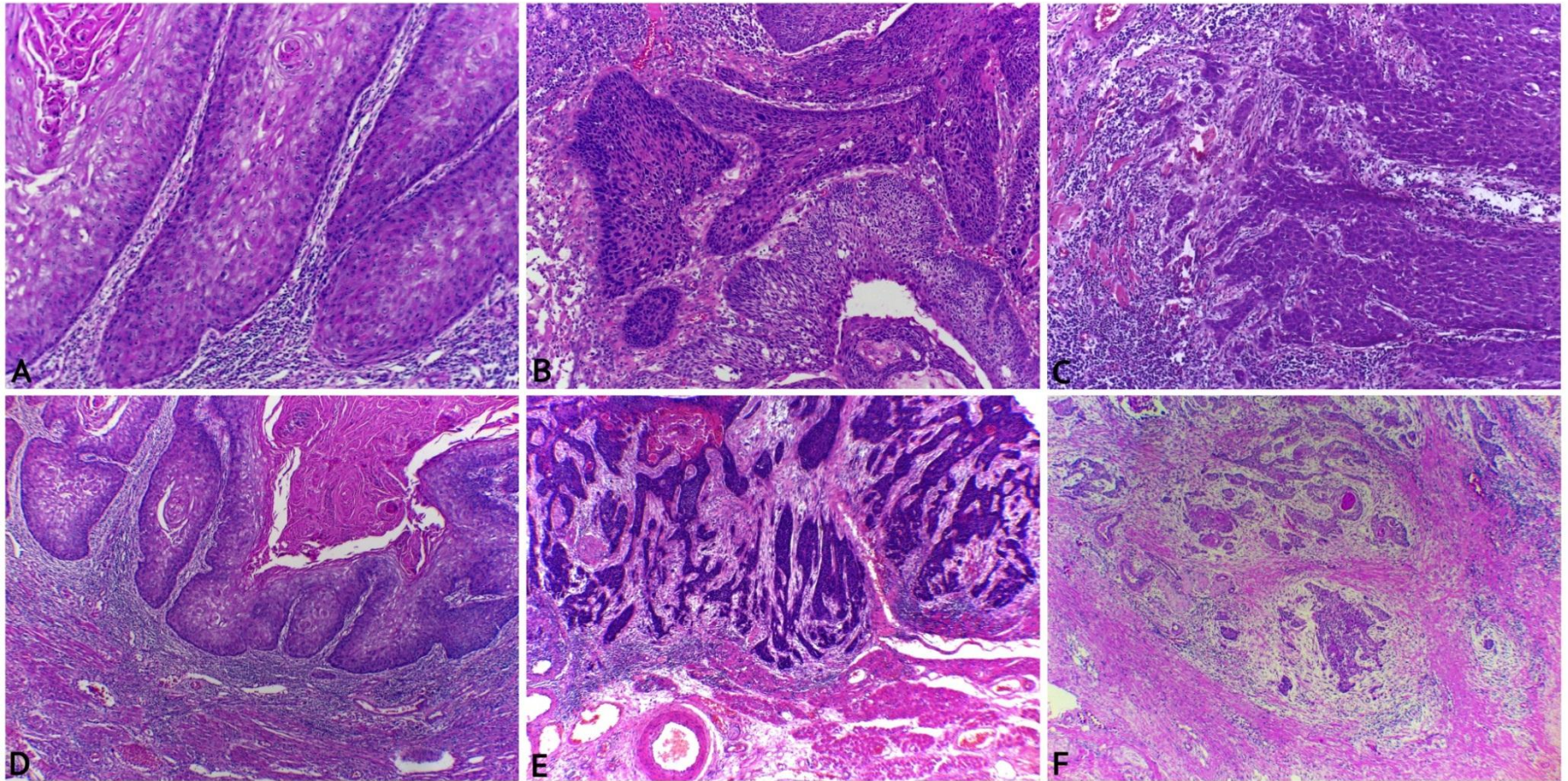


Fig. 3. Representative samples classified with base in the MG grading system. Pattern of invasion: (A) type 2, (B) type 3 and (C) type 4. Presence of lymphoplasmacytic infiltration: (D) grade 1, (E) grade 2, (F) grade 3. In our sample, pattern of invasion type 1 (pushing border) and presence of lymphoplasmacytic infiltration grade 4 (none lymphoplasmacytic infiltration) were not observed. (original magnification A-C x100 and D-F x40)

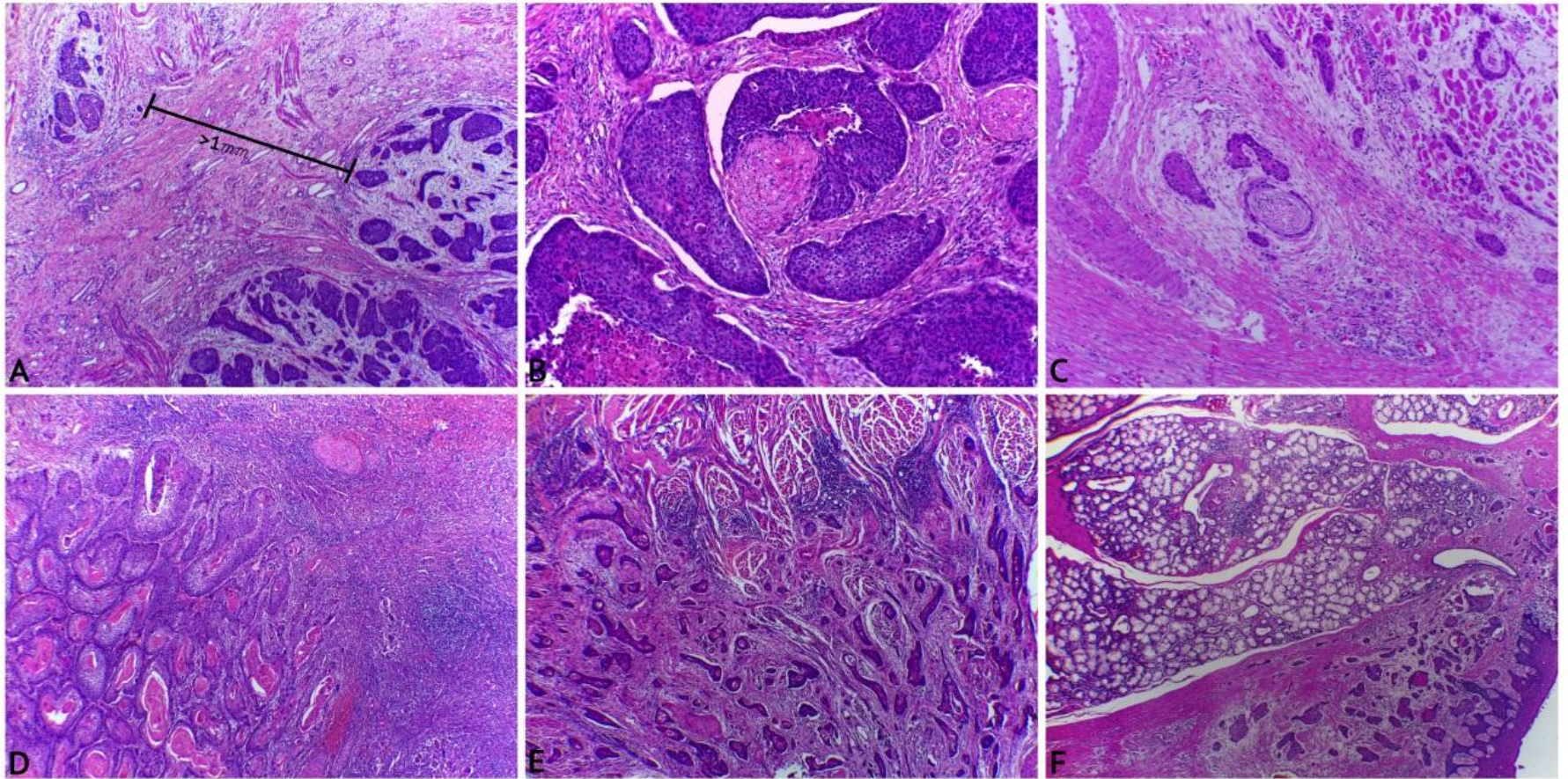


Fig. 4. Representative samples of the HR model. (A) worst pattern of invasion type 5, where tumor satellites are located, at least, 1 mm from the invasive front. Worst pattern of invasion types 1 to 4 are comparable with the MG grading system. Presence of perineural invasion was classified as absent, involving large nerves (B) or small nerves (C). Lymphocytic host response against the tumor: (D) type 1, (E) type 2 and (F) type 3. (original magnification A, D-F $\times 40$ and B-C $\times 100$)

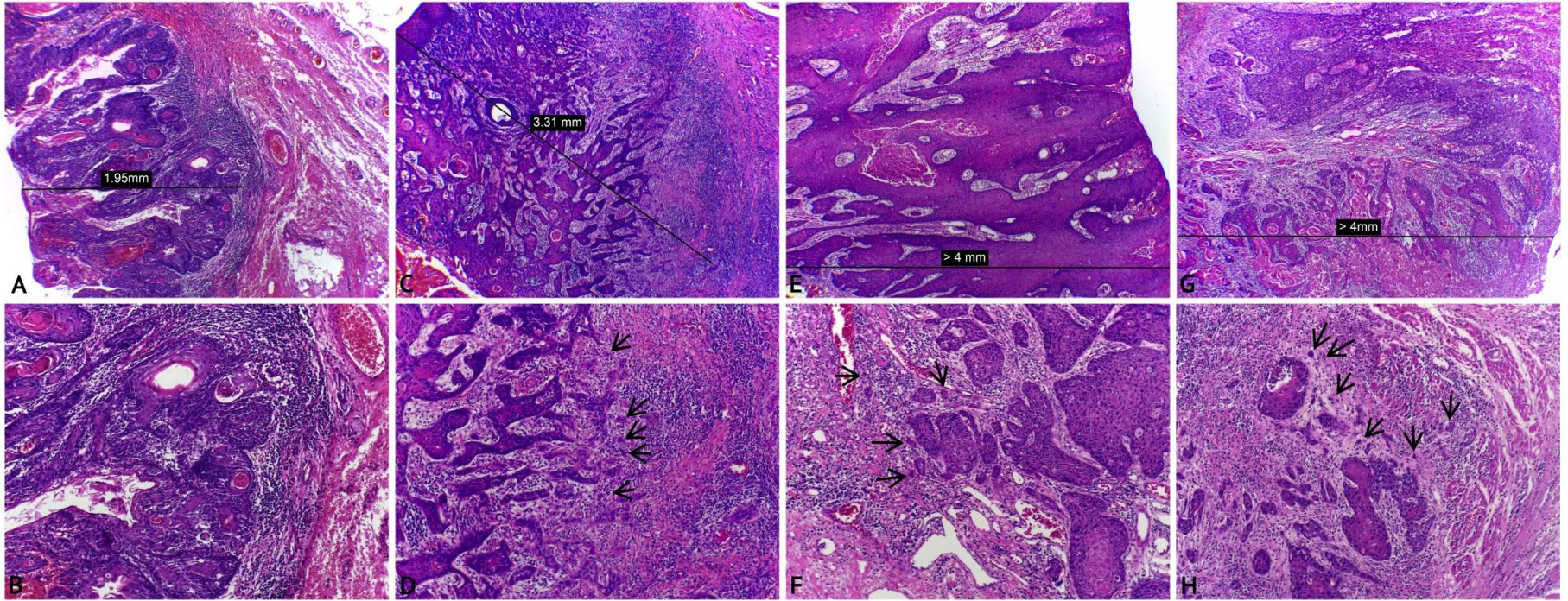


Fig. 5. Representative samples classified with the BD model. (A) depth of invasion is <4 mm and tumor budding is absent or <5 buds (B), which classified the tumor as low risk. Two specific conditions of tumors at intermediate risk: 1. depth of invasion is <4 mm (C) but the tumor budding is formed by 5 buds or more (arrows) (D) and 2. tumor budding contains less than 5 buds (arrows) at the invasive front (F) but the depth of invasion ≥ 4 mm (E). Tumor showing depth of invasion ≥ 4 mm (G) and tumor budding ≥ 5 at the invasive front (H), classifying the tumor in high risk. (original magnification $\times 40$ to images showing depth of invasion and $\times 100$ to tumor budding)

Table 1. Correlation of the demographic and clinical parameters with the four histopathological grading systems.

Parameter	WHO grading system		p value	MG system		p value	HR model		p value	BD model		p value
	Well/Moderately n (%)	Poor n (%)		Low/Intermediate n (%)	High n (%)		Low/Intermediate n (%)	High n (%)		Low/Intermediate n (%)	High n (%)	
Gender												
Male	85 (85)	10 (76.9)	0.45	80 (83.3)	15 (88.2)	0.61	41 (78.8)	54 (88.5)	0.16	51 (79.7)	44 (89.8)	0.14
Female	15 (15)	03 (23.1)		16 (16.7)	02 (11.8)		11 (21.2)	07 (11.5)		13 (20.3)	05 (10.2)	
Age												
≤ 56	52 (52)	05 (38.5)	0.35	47 (49.0)	10 (58.8)	0.45	25 (48.1)	32 (52.5)	0.64	33 (51.6)	24 (49)	0.78
> 56	48 (48)	08 (61.5)		49 (51.0)	07 (41.2)		27 (51.9)	29 (47.5)		31 (48.4)	25 (51)	
Smoking habit												
No	13 (15.7)	03 (33.3)	0.18	13 (16.5)	03 (23.1)	0.55	10 (23.3)	06 (12.2)	0.16	10 (19.6)	06 (14.6)	0.53
Yes	70 (84.3)	06 (66.7)		66 (83.5)	10 (76.9)		33 (76.7)	43 (87.8)		41 (80.4)	35 (85.4)	
Drinking habit												
No	20 (26.7)	02 (33.3)	0.72	18 (25.7)	04 (36.4)	0.46	13 (34.2)	09 (20.9)	0.17	15 (33.3)	07 (19.4)	0.16
Yes	55 (73.3)	04 (66.7)		52 (74.3)	07 (63.6)		25 (65.8)	34 (79.1)		30 (66.7)	29 (80.6)	
Tumor site												
Tongue	49 (49)	07 (53.8)	0.83	50 (52.1)	06 (35.3)	0.09	22 (42.3)	34 (55.7)	0.21	30 (46.9)	26 (53.1)	0.89
Floor of mouth	28 (28)	04 (30.8)		26 (27.1)	06 (35.3)		15 (28.8)	17 (27.9)		19 (29.7)	13 (26.5)	
Palate	10 (10)	0		10 (10.4)	00		08 (15.4)	02 (03.3)		06 (9.4)	04 (08.2)	
Retromolar region	07 (07)	01 (7.7)		06 (6.3)	02 (11.8)		04 (07.7)	04 (06.6)		04 (6.3)	04 (08.2)	
Other	06 (06)	01 (7.7)		04 (4.1)	03 (17.6)		03 (05.8)	04 (06.5)		05 (7.7)	02 (04.0)	
T stage												
T1/T2	81 (81)	07 (53.8)	0.02	78 (81.3)	10 (58.8)	0.04	44 (84.6)	44 (72.1)	0.11	53 (82.8)	35 (71.4)	0.40
T3/T4	19 (19)	06 (46.2)		18 (18.7)	07 (41.2)		08 (15.4)	17 (27.9)		11 (17.2)	14 (28.6)	
N stage												
N0	49 (49.0)	6 (46.2)	0.84	50 (52.1)	05 (29.4)	0.08	29 (55.8)	26 (42.6)	0.16	36 (56.3)	19 (38.8)	0.06
N+	51 (51.0)	7 (53.8)		46 (47.9)	12 (70.6)		23 (44.2)	35 (57.4)		28 (43.7)	30 (61.2)	
Treatment												
Surgery	39 (39)	06 (46.2)	0.59	37 (38.5)	08 (47.10)	0.05	26 (50.0)	19 (31.1)	0.09	33 (51.6)	12 (24.5)	0.005
Surgery+RT	52 (52)	05 (38.5)		52 (54.2)	05 (29.4)		23 (44.2)	34 (55.7)		28 (43.8)	29 (59.2)	
Surgery+RT+CTX	09 (09)	02 (15.3)		07 (7.3)	04 (23.5)		03 (05.8)	08 (13.2)		03 (04.6)	08 (16.3)	
Margins Status												
> 5 mm	96 (97)	12 (92.3)	0.39	92 (96.8)	16 (94.1)	0.57	50 (96.2)	58 (96.7)	0.88	59 (93.7)	49 (100)	0.07
< 5mm	03 (03)	01 (07.7)		03 (3.2)	01 (5.9)		02 (03.8)	02 (03.3)		04 (06.3)	0	
Capsular lymph node infiltration												
No	08 (23.5)	02 (50)	0.25	08 (27.6)	02 (22.2)	0.74	4 (36.4)	06 (22.2)	0.36	04 (25)	06 (27.3)	0.87
Yes	26 (76.5)	02 (50)		21 (72.4)	07 (77.8)		7 (63.6)	21 (77.8)		12 (75)	16 (72.7)	

continue

Continuation

Parameter	WHO grading system		p value	MG system		p value	HR model		p value	BD model		p value
	Well/Moderately n (%)	Poor n (%)		Low/Intermediate n (%)	High n (%)		Low/Intermediate n (%)	High n (%)		Low/Intermediate n (%)	High n (%)	
Local recurrence												
No	75 (75)	11 (84.6)		71 (74.0)	15 (88.2)		36 (69.2)	50 (82.0)		48 (75)	38 (77.6)	
Yes	25 (25)	02 (15.4)	0.44	25 (26.0)	02 (11.8)	0.20	16 (30.8)	11 (18.0)	0.11	16 (25)	11 (22.4)	0.75
Regional recurrence												
No	88 (88)	12 (92.3)		85 (88.5)	15 (88.2)		47 (90.4)	53 (86.9)		55 (85.9)	45 (91.8)	
Yes	12 (12)	01 (07.7)	0.64	11 (11.5)	02 (11.8)	0.97	05 (09.6)	08 (13.1)	0.56	09 (14.1)	04 (08.2)	0.33
Distant recurrence												
No	98 (98)	13 (100)		94 (97.9)	17 (100)		51 (98.1)	60 (98.4)		63 (98.4)	48 (98)	
Yes	02 (02)	0	0.60	02 (2.1)	0	0.54	01 (01.9)	01 (01.6)	0.90	01 (01.6)	01 (02)	0.84
Second primary												
No	76 (76)	12 (92.3)		75 (78.1)	13 (76.5)		38 (73.1)	50 (82.0)		51 (79.7)	37 (75.5)	
Yes	24 (24)	01 (7.7)	0.18	21 (21.9)	04 (23.5)	0.87	14 (26.9)	11 (18.0)	0.25	13 (20.3)	12 (24.5)	0.59

RT: radiotherapy, CTX: chemotherapy

Table 2. Correlation analysis of the 4 histopathological grading systems. Spearman's coefficient (r_s) is above the diagonal and p value is below diagonal.

	WHO grading system	MG system	HR model	BD model
WHO grading system	-	0.54	0.16	0.09
MG system	<0.0001	-	0.29	0.08
HR model	0.08	<0.002	-	0.30
BD model	0.33	0.39	<0.001	-

Table 3. Survival rates of the OSCC patients according to clinicopathological parameters.

Parameter	Overall survival in 5 years	p value	Disease-specific survival in 5 years	p value	Disease-free survival in 5 years	p value
Gender						
Male	44%	0.94	47%	0.92	61%	0.62
Female	38%		43%		70%	
Age						
≤ 56	53%	0.07	57%	0.06	60%	0.52
> 56	33%		35%		66%	
Smoking habit						
No	44%	0.86	47%	0.88	50%	0.37
Yes	44%		45%		62%	
Drinking habit						
No	40%	0.78	61%	0.16	75%	0.28
Yes	31%		40%		59%	
Tumor site						
Tongue	45%	0.89	49%	0.92	64%	0.85
Floor of mouth	48%		50%		65%	
Palate	40%		40%		53%	
Retromolar region	25%		40%		50%	
Other	29%		29%		63%	
T stage						
T1/T2	49%	0.004	54%	0.001	63%	0.80
T3/T4	22%		23%		59%	
N stage						
N0	55%	0.003	62%	0.001	66%	0.55
N+	32%		33%		58%	
Treatment						
Surgery	53%	0.33	55%	0.51	64%	0.97
Surgery+RT	33%		37%		61%	
Surgery+RT+CTX	55%		55%		61%	
Margins Status						
> 5mm	50%	0.68	67%	0.59	67%	0.98
< 5mm	43%		46%		62%	
Hospital						
CEONC	52%	0.09	59%	0.07	62%	0.83
UOPECCAN	37%		38%		63%	
WHO grading system						
Well/moderately	46%	0.007	49%	0.01	62%	0.92
Poor	23%		25%		64%	
MG system						
Low/intermediate	44%	0.34	48%	0.23	61%	0.71
High	35%		35%		71%	
HR model						
Low/intermediate	56%	0.03	57%	0.08	60%	0.83
High	31%		36%		66%	
BD model						
Low/intermediate	52%	0.007	57%	0.009	73%	0.005
High	31%		32%		49%	

RT: radiotherapy, CTX: chemotherapy

Table 4. Cox multivariate analysis for the risk of death.

Parameter	Overall survival		Specific survival		Disease-free survival	
	HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
Age						
≤ 56	Reference		Reference			
> 56	2.18 (1.19-3.96)	0.01	2.30 (1.22-4.31)	0.009		
T stage						
T1/T2					Reference	
T3/T4					1.40 (1.02-1.92)	0.03
N stage						
N0	Reference		Reference			
N+	2.69 (1.42-5.06)	0.002	2.83 (1.46-5.50)	0.002		
BD model						
Low/intermediate					Reference	
High					1.93 (1.23-3.00)	0.003

HR: hazard ratio; CI: confidence interval

Discussion

WHO still recommends Broders system for OSCC histopathological grading, but its application as a prognostic tool has been criticized over the years^{2, 3, 18}. The main critical aspects of this system resides in its subjectiveness, in absence of important features related to tumorigenesis such as pattern of invasion and, most important, in the poor correlation with outcome and response to treatment^{3, 8, 19- 21}. The lack of correlation of WHO grading system with outcome was well demonstrated in two consecutive studies developed by Bryne and collaborators^{3,8} and was also described in recent studies with early stage OSCCs of tongue and floor of mouth^{18,21}. Although in the current study univariate analysis showed correlation between WHO grading system and overall survival and disease-specific survival, the regression model revealed that its association is a function of dependent variables (covariates), such as age and N stage. Taking into account the results of this study and the vast literature, we suggest that WHO grading system is not an appropriate histopathological grading system for OSCC.

Since its description as a grading system applicable in biopsies, the MG system has been used in prognostic studies, but the results of the studies are controversial^{9, 10, 15, 22, 23}. This inconsistency might be explained by the subjectiveness attributed for some parameters of this grading system, which result in high intra- and inter-examiner variability²⁴. Moreover, immaturity can not be used for the assessment of cellular pleomorphism, as suggested in Bryne's grading system, since it is manifested in the course of the differentiation process and most cells are immature at the invasive front²⁵. The results of this study revealed no

association between the MG system and outcome of OSCC patients, similar to previously reported findings^{15, 23}.

The studies with the HR model revealed a modest association with overall survival that did not persist the adjusting of Cox multivariate analysis. This system was proposed by Brandwein-Gensler and collaborators in 2005 as an updated and modified multiparameter system with a role in decision-making about the need for postoperative therapy and prognosis of OSCC patients⁴.

Although other studies have confirmed its predictive value¹¹⁻¹⁶, two others showed a lack of correlation of the HR model with epidemiological and clinical features, as well as outcome of OSCCs^{5, 26}. As extensively revised by Rodrigues and collaborators²⁶, the 3 features contemplated in the HR model presented bias individually as predictors of OSCC prognosis, specifically the lymphocytic host response. LHR is considered as an attempt of organism to eradicate tumor cells, in other words, has an antitumoral effect, and indeed to evade immune destruction is considered one of the hallmarks of the cancer²⁷. However, evidences showed that immune and inflammatory cells might encompass protumoral effects^{25, 28, 29}. This is particularly exemplified by subpopulations of CD4 T cells, which express CD25 and the transcription factor Foxp3 (CD4+CD25+Foxp3+) and are termed regulatory T cells (Treg), that plays important roles in suppression of tumor-specific immunity and in promotion tumor development³⁰. So, more important than the abundance, which is considered in the HR model, is the composition of the inflammatory infiltrate in the tumor microenvironment.

The BD model calls attention because of its simplicity and objectivity. Interestingly this system was the only that significantly correlated with all 3 outcomes: overall survival ($p=0.007$), disease-specific survival ($p=0.009$) and disease-free survival ($p=0.005$); and resisted (disease-free survival) to Cox multivariate analysis after adjusting for other prognostic factors. The 2 elected features of this system have been individually described as predictors of prognosis for OSCC patients^{19, 21, 31, 32}. Depth of tumor invasion or tumor thickness, as measured from the surface of the tumor to the deepest point of invasion, has been pointed as a predictor for cervical lymph-node metastasis^{19, 21, 31}, and reflect the aggressiveness of tumor growth by reaching out the lymphovascular structures³³. Tumor budding is defined as single cancer cells or cell clusters composed of fewer than five cancer cells scattered in the stroma of the actively invasive front region³⁴. Budding represents two important malignant features: cellular discohesion and active invasion³². Furthermore, significant associations were observed between tumor budding and deregulation of E-cadherin and vimentin, suggesting that cells at tumor budding are in the process of epithelial–mesenchymal transition³². Tumor budding has been demonstrated as a valuable prognostic marker for cancers from other locations, including colon and recto³⁴, esophagus³⁵, lung³⁶, larynx³⁷ and tongue^{5, 32}.

Most of the characteristics of patients in the current study were similar to those described in previous studies. OSCC is usually a disease that affects men between the fifth and sixth decades of live and with long tobacco and/or alcohol exposure³⁸. In this cohort, male-to-female ratio was 5.3:1, the median age at

diagnosis was 56 years, and smoking habit and/or drinking consumption was reported by 72.6% of the patients. Interestingly, age was not detected in the univariate analysis, but in the multivariate analysis it was significantly associated with overall survival and disease-specific survival. Those results are in agreement with previous studies that showed a shortened survival in elderly patients in comparison with younger ones³⁹⁻⁴¹, but in divergence with others that have reported higher mortality in OSCC patients under 40 years old^{42, 43}. An important feature in favor of a causal effect of advanced age on survival is that previous studies have reported that comorbidities in the cardiovascular, gastrointestinal and respiratory systems are frequent in elder people, and demonstrate a significant impact on the prognosis of oral cancer patients^{44, 45}. Thus, those results suggest that age may affect survival of oral cancer patients by induce comorbid illnesses.

The studies presented here also reinforced that primary tumor size (T classification) and cervical lymph node status (N classification) are reliable indicators of patient's outcome^{9, 20, 46}. Tumors with high T and N classification had a less favorable prognosis than those with lower T and N values, as revealed by significantly shortened overall survival and disease-specific survival. Interestingly, the logistic regression based on Cox proportional hazard model confirmed the association of N status with both overall and disease-specific survivals, and further revealed that T stage is an independent marker of reduced disease-free survival with a HR of 1.40 (95% CI: 1.02-1.92, p=0.03).

In closing, our findings demonstrate the importance of BD model, age, tumor size and lymph node involvement as independent prognostic factors for patients

with OSCC. The histopathological grading systems can be useful adjuvant in the prognostication of OSCCs, but major points impair their routine use with emphasis to the complexity and long time required for grading, low reproducibility and lack of clinical comprehension of the results. Although all grading systems have the aim of distinguish low from high grade OSCCs, reflecting in good and bad prognosis, no clear correlation between them was observed applying the Spearman's rank test. BD model is simple and fast, but it is important to be aware that there are possible biases in this system, mainly associated with selection of the area for budding assessment. Despite good results, more studies are necessary to validate this recently described histopathological grading system for OSCC.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, São Paulo, Brasil (2013/01607-6); and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, Brasília, Brasil (PVES 109/2012). I. Sawazaki-Calone is a student of the Inter-Institutional PhD program DINTER/CAPES.

ISC, AA, TS and RDC designed the study. ISC, ALCAR, AGB, CFM, HMN, RPK, RLS, LR performed the experiments. ISC and RDC conducted statistical analysis and drafted the paper. All authors revised the final version of the manuscript.

References

1. Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PVR, Liyanage RLPR, Dias KD, Tilakaratne WM. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 113: 518–25.
2. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res.* 1987; 95: 229–49.
3. Bryne M, Hs K, Lilleng R, Stene T, Bang G, New DE. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1989; 18: 432-7.
4. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM et al. Oral Squamous Cell Carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29: 167–78.
5. Almangush A, Bello IO, Keski – Sääntti H et al. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: Prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck.* 2014 Jun; 36: 811-8.
6. Broders AC. Squamous cell cancer of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. *JAMA.* 1920; 74: 656–664.

7. Barnes L, Eveson JW, Reichart P; Sidransky E. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
8. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. MG grading system of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. J Pathol. 1992; 166: 375–81.
9. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S et al. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2005; 34: 329–33.
10. Gueiros LA, Coletta RD, Kowalski LP, Lopes MA. Clinicopathological features and proliferation markers in tongue squamous cell carcinomas. Int J Oral Maxillofac Surg. 2011; 40: 510–5.
11. Brandwein-Gensler M, Smith R V, Wang B et al. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 2010; 34: 676–88.
12. Vered M, Dobriyan A, Dayan D et al. Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. Cancer Sci. 2010; 101: 274–80.
13. Vered M, Dayan D, Dobriyan A et al. Oral tongue squamous cell carcinoma: recurrent disease is associated with histopathologic risk score and young age. J Cancer Res Clin Oncol. 2010; 136: 1039–48.

14. Li Y, Bai S, Carroll W, Dayan D, Dort JC, Heller K, et al. Validation of the risk model: high-risk classification and tumor pattern of invasion predict outcome for patients with low-stage oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2013;7:211-23
15. Lindenblatt RDCR, Martinez GL, Silva LE, Faria PS, Camisasca DR, Lourenço SDQC. Oral squamous cell carcinoma grading systems-analysis of the best survival predictor. *J Oral Pathol Med.* 2012; 41: 34–9.
16. Sinha P, Mehrad M, Chernock RD et al. Histologic and systemic prognosticators for local control and survival in margin negative transoral laser microsurgery-treated oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2013; doi:10.1002/HED.
17. Almangush A, Coletta RD, Bello IO et al. A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014. `in press´.
18. Weijers M, Snow GB, Bezemer PD, van der Waal I. Malignancy grading is no better than conventional histopathological grading in small squamous cell carcinoma of tongue and floor of mouth: retrospective study in 128 patients. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38: 343–7.
19. Po Wing Yuen A, Lam KY, Lam LK et al. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma - A comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimeno score, and pathologic features. *Head Neck.* 2002; 24: 513–20.

20. Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006; 42: 229–39.
21. O-Charoenrat P, Pillai G, Patel S et al. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol.* 2003; 39: 386–90.
22. Costa ADLL, Araújo Júnior RF De, Ramos CCF. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2005; 71: 181–7.
23. Silveira EJD Da, Godoy GP, Lins RDA et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol.* 2007; 15: 376–83.
24. Sawair FA, Irwin CR, Gordon DJ, Leonard AG, Stephenson M, Napier SS. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 1–9.
25. Piva MR, de Souza LB, Martins-Filho PRS, Soares RC, de Santana Santos T, de Souza Andrade ES. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part I): Histological grading of malignancy using a binary system. *Oncol Lett.* 2011; 2: 1225–31.
26. Rodrigues PC, Miguel MCC, Bagordakis E et al. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 43: 795-801.

27. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646–74.
28. Dayan, D., Salo, T., Salo, S et al. Molecular crosstalk between cancer cells and tumor microenvironment components suggests potential targets for new therapeutic approaches in mobile tongue cancer. *Cancer Medicine*. 2012; 1: 128–40.
29. Salo, T., Vered, M., Bello, IO et al. Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call for new therapeutic approaches. *Experimental Cell Research*. 2014; 325: 58–64.
30. Chaudhary B, Abd Al Samid M, Al-Ramadi BK, Elkord E. Phenotypic alterations, clinical impact and therapeutic potential of regulatory T cells in cancer. *Expert opin biol ther*. 2014; 14: 931-45.
31. Ganly I, Goldstein D, Carlson DL et al. Long-term regional control and survival in patients with “low-risk,” early stage oral tongue cancer managed by partial glossectomy and neck dissection without postoperative radiation: the importance of tumor thickness. *Cancer*. 2013; 119: 1168–76.
32. Wang C, Huang H, Huang Z et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2011; 40: 545–51.
33. Huang SH, Hwang D, Lockwood G, Goldstein DP, O’Sullivan B. Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous

cell carcinoma of the oral cavity: a meta-analysis of reported studies. *Cancer*. 2009; 115: 1489–97.

34. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour “budding” as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002; 40: 127–32.
35. Teramoto H, Koike M, Tanaka C et al. Tumor budding as a useful prognostic marker in T1-stage squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Surg Oncol*. 2013; 108: 42–6.
36. Yamaguchi Y, Kojima M, Yoh K, Otsuka H, Nagai K, Ochiai A. Histopathologic Features of the Tumor Budding in Adenocarcinoma of the Lung. *J Thorac Oncol*. 2010; 5: 1361–8.
37. Sarioglu S, Acara C, Akman FC et al. Tumor budding as a prognostic marker in laryngeal carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2010; 206: 88–92.
38. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AAHK. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol 2000*. 2011; 57: 19–37.
39. Kantola S, Parikka M, Jokinen K et al. Prognostic factors in tongue cancer - relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. *Br J Cancer*. 2000; 83: 614–9.
40. Platz H, Fries R, Hudec M, Min Tjoa A, Wagner RR. The prognostic relevance of various factors at the time of first admission of the patient. *J Maxillofac Surg*. 1983; 11: 3–12.

41. Funk G, Karnell L, Robinson RA, Zhen WK, Trask DK, Hoffman HT. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a National Cancer Data Base report. *Head Neck*. 2002; 24:165-80.
42. Son YH, Kapp DS. Oral cavity and oropharyngeal cancer in a younger population. Review of literature and experience at Yale. *Cancer*. 1985; 55: 441–4.
43. 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.
44. Jerjes W, Upile T, Petrie A et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol*. 2010; 2: 9.
45. Datema FR, Ferrier MB, Van Der Schroeff MP, Jong RJB De. Impact of comorbidity on short-term mortality and overall survival of head and neck cancer patients. *Head Neck*. 2010; 32: 728-36.
46. Huang C-H, Chu S-T, Ger L-P, Hou Y-Y, Sun C-P. Clinicopathologic evaluation of prognostic factors for squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. *J Chin Med Assoc*. 2007; 70:164–70.

Conclusão

1. O modelo BD foi o sistema de gradação histopatológico que apresentou a melhor correlação com a evolução da doença e, portanto, a melhor performance como ferramenta prognóstica pós-operatória para CECs orais.
2. O modelo BD, a idade superior a 56 anos, o tamanho do tumor (estadio T3/T4) e a presença de metástase regional (estágio N+) são marcadores prognósticos independentes para CECs orais.

A utilização de ferramentas prognósticas confiáveis e universalmente aceitas constitui um passo essencial para traçar planos de tratamento pós-operatórios cada vez mais individualizados e eficazes para o CEC oral. Para que um método de gradação histopatológica seja incorporado à rotina clínica como uma ferramenta prognóstica pós-operatória é necessário que ele seja objetivo, mostre resultados consistentes em diferentes estudos e seja de fácil e rápida execução. O modelo BD apresentou estas qualidades quando aplicado a esta amostra, porém é importante estar atento ao possível viés associado com a seleção da área a ser analisada. Apesar dos bons resultados deste estudo, outras pesquisas são necessárias para o conhecimento real e pleno deste novo sistema de gradação histopatológica.

Referências*

Almangush A, Della Coletta R, Bello IO, Bitu C, Keski-Säntti H, Mäkinen LK et al. A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. *J Oral Pathol Med*. 2014. [*In Press*].

Anantharaman D, Chabrier A, Gaborieau V, Franceschi S, Herrero R, Rajkumar T. Genetic variants in nicotine addiction and alcohol metabolism genes, oral cancer risk and the propensity to smoke and drink alcohol: a replication study in India. *PLoS One*. 2014; 9(2): e88240.

Anatômicas, Regiões. Carcinoma epidermóide da cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2001; 47(4): 361-76.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987; 95(3): 229–49.

Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). *Oral Oncol*. 2010; 46(9): 630–5.

Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350(19): 1945–52.

Boffetta P; Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*. 2006; 7: 149-56.

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

Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, et al. Oral Squamous Cell Carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J SurgPathol*. 2005; 29(2): 167–78.

Brandwein-Gensler M, Smith R V, Wang B, Penner C, Theilken A, Broughel JD, et al. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J SurgPathol*. 2010; 34(5): 676–88.

Broders AC. Squamous cell cancer of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. *JAMA*.1920; 74: 656–664.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*.1992 ; 166(4): 375–81.

Conway DI, Petticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LM. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer*. 2008; 122(12): 2811–9.

Costa ADLL, Araújo Júnior RF De, Ramos CCF. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2005; 71(2): 181–7.

Cotran, Kumar R. *Patologia - Bases patológicas das doenças*. 7^a ed. Rio de Janeiro : Elsevier; 2005.

de Aguiar AFC, Kowalski LP, de Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. *Oral Oncol.* 2007; 43(6): 593–601.

Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PVR, Liyanage RLPR, Dias KD, Tilakaratne WM. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 113(4): 518–25.

Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Dis Markers.* 2007; 23(4): 297–313.

Feller L, Chandran R, Khammissa RA, Meyerov R, Lemmer J. Alcohol and oral squamous cell carcinoma. *SADJ.* 2013 May; 68(4): 176-80.

Furness S, Glenny AM, Worthington HV, Pavitt S, Oliver R, Clarkson JE, et al. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 Apr 13; (4): CD006386.

Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P et al. Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *Int. J. Cancer.* 2008; 122 (1): 155–164.

Garavello W, Spreafico R, Gaini RM. Oral tongue cancer in young patients: a matched analysis. *Oral Oncol.* 2007; 43(9): 894–7.

Goldstein BY, Chang SC, Hashibe M, La Vecchia C, Zhang ZF. Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. *Eur J Cancer Prev*. 2010 Nov; 19(6): 431-65.

Gueiros LA, Coletta RD, Kowalski LP, Lopes MA. Clinicopathological features and proliferation markers in tongue squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011; 40(5): 510–5.

Heffner DK. Let's make grading of squamous cell carcinomas more meaningful to clinicians (via "Ed's Insight"). *Ann Diagn Pathol*. 2002; 6(6): 399–403.

Hoffmann D; Hoffmann I. The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health*. 1997 Mar; 50(4): 307-64.

Huang SH, O'Sullivan B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013; 18 (2): 233-40.

INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2014.

Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S MD et al. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Evenson JW, Reichart P, Sidransky. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics: Head and Neck Tumors*. Lyon: IARC Press; 2005.

Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AAHK. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000. 2011; 57(1): 19–37.

Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63(11): 1599–605.

Kantola S, Parikka M, Jokinen K, Hyrynkangas K, Soini Y, Alho OP, et al. Prognostic factors in tongue cancer - relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. *Br J Cancer*. 2000; 83(5): 614–9.

Keski-Säntti H, Atula T, Tikka J, Hollmén J, Mäkitie AA, Leivo I. Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol*. 2007; 43(10): 1007–13.

Krüger M, Pabst AM, Walter C, Sagheb K, Günther C, Blatt S et al. The prevalence of human papilloma virus (HPV) infections in oral squamous cell carcinomas: A retrospective analysis of 88 patients and literature overview. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014. doi: 10.1016.

Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tomoyose T, Tanaka T, et al. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2005 ; 34(6): 329–33.

Li Y, Bai S, Carroll W, Dayan D, Dort JC, Heller K, et al. Validation of the risk model: high-risk classification and tumor pattern of invasion predict outcome for patients with low-stage oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*.

2012; 7(3): 211-23.

Lindenblatt RDCR, Martinez GL, Silva LE, Faria PS, Camisasca DR, Lourenço SDQC. Oral squamous cell carcinoma grading systems-analysis of the best survival predictor. J Oral Pathol Med. 2012; 41(1): 34–9.

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 Jul; 37(5): 401-18.

Majchrzak E; Szybiak B; Wegner A; Pienkowski P; Pazdrowski J; Luczewski L et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. Radiol Oncol 2014; 48(1): 1-10.

Markopoulos AK. Role of human papillomavirus in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. World J Exp Med. 2012 Aug. 20; 2(4): 65-9.

Marsh D, Suchak K, Moutasim K a, Vallath S, Hopper C, Jerjes W, et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. J Pathol. 2011; 223(4): 470–81.

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 Jun; 91(6): 622-35.

Montero PH, Yu C, Palmer FL, Patel PD, Ganly I, Shah JP. Nomograms for preoperative prediction of prognosis in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. Cancer. 2014; 120: 214–21.

Rodgers LW, Jr, Stringer SP, Mendenhall WM, Parsons JT, Cassisi NJ, Million RR. Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head Neck*. 1993; 15(1):16-9.

Rodrigues PC, Miguel MCC, Bagordakis E, Fonseca FP, de Aquino SN, Santos-Silva AR, et al. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 43(7): 795-801.

Rushatamukayanunt P, Morita K, Matsukawa S, Harada H, Shimamoto H, Tomioka H, Omura K. Lack of Association between High-risk Human Papillomaviruses and Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Japanese Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(10): 4135-41.

Santos-Silva, AR; Ribeiro, AC; Soubhia, AM; Miyahara, GI; Carlos, R; Speight, PM et al. High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: An international collaborative study. *Histopathology*. 2011; 58(7): 1127-35.

Sarkaria JN, Harari PM. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. *Head Neck*. 1994; 16(2): 107–11.

Scully C, Bagan JV. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis*. 2009; 15(6): 388–99.

Scully C, Kirby J. Statement on mouth cancer diagnosis and prevention. *Br Dent J*. 2014 Jan; 216(1): 37-8.

Sinha P, Mehrad M, Chernock RD, Lewis Jr JS, El-Mofty SK, Wu N, et al. Histologic and systemic prognosticators for local control and survival in margin negative transoral laser microsurgery-treated oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013; doi: 10.1002/HED.

Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer (UICC) TNM Classification Of Malignant Tumors. 6th ed. New York, NY: Wiley- Liss; 2002.

Son YH, Kapp DS. Oral cavity and oropharyngeal cancer in a younger population. Review of literature and experience at Yale. *Cancer*. 1985; 55(2): 441–4.

Spiro RH, Guillaumondegui O, Paulino a F, Huvos a G. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck*. 1999; 21(5): 408–13.

Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35 (Pt 6): 1456–60.

Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*. 1983; 12(6): 418– 24.

Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko a, Arduino P, Campisi G, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis.* 2011; 17 Suppl 1(January): 58–72.

Vered M, Dobriyan A, Dayan D, Yahalom R, Talmi YP, Bedrin L, et al. Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. *Cancer Sci.* 2010; 101(1): 274–80.

Vered M, Dayan D, Dobriyan A, Yahalom R, Shalmon B, Barshack I, et al. Oral tongue squamous cell carcinoma: recurrent disease is associated with histopathologic risk score and young age. *J Cancer Res ClinOncol.* 2010; 136(7): 1039–48.

Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: Epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol.* 2010; 46(6): 407–10.

Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006; 42(3): 229–39.

Woolgar JA, Triantafyllou A. Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis. *Oral Oncol.* 2009; 45(4-5): 361–85.

Anexo 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

21/03/13

Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado



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 "**Caracterização histopatológica do estroma do carcinoma espinocelular de cavidade oral e sua correlação clinicopatológica**", protocolo nº 100/2012, dos pesquisadores Iris Sawazaki Calone, Ricardo Della Coletta e Roberto Longoni de Souza, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/10/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Oral squamous cell carcinoma stromal histopathological characterization and clinical pathological correlation**", register number 100/2012, of Iris Sawazaki Calone, Ricardo Della Coletta and Roberto Longoni de Souza, 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 10/10/2012.


Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Secretária
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.

file:///D:/tese/CEP/Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado.htm

1/1