



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ANDRESSA FERNANDA PAZA MIGUEL

**Análise sanguínea e intratumoral de neutrófilos e
linfócitos T citotóxicos e características
histopatológicas associadas ao prognóstico de
pacientes com carcinoma epidermoide de boca**

Florianópolis

2023

Andressa Fernanda Paza Miguel

**Análise sanguínea e intratumoral de neutrófilos e
linfócitos T citotóxicos e características
histopatológicas associadas ao prognóstico de
pacientes com carcinoma epidermoide de boca**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito para a obtenção do
título de Doutor em Odontologia – Área de
concentração Diagnóstico Bucal.

Orientador: Prof. Dr^a. Elena Riet Correa Rivero

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Miguel, Andressa Fernanda Paza

Análise sanguínea e intratumoral de neutrófilos e linfócitos T citotóxicos e características histopatológicas associadas ao prognóstico de pacientes com carcinoma epidermoide de boca / Andressa Fernanda Paza Miguel ; orientadora, Elena Riet Correa Rivero, 2023.

223 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Patologia Bucal. 3. Carcinoma epidermoide bucal. 4. Neutrófilos. 5. Linfócitos T citotóxicos. I. Rivero, Elena Riet Correa. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

Andressa Fernanda Paza Miguel

Análise sanguínea e intratumoral de neutrófilos e linfócitos T citotóxicos e características histopatológicas associadas ao prognóstico de pacientes com carcinoma epidermoide de boca

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 27 de fevereiro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior (membro titular interno)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta (membro titular externo)
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Prof. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquínio (membro titular externo)
Universidade Federal de Pelotas

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Elena Riet Correa Rivero

Florianópolis, 2023.

Dedico esse trabalho à minha família, em especial meu esposo, Paulo André, e mãe, Nely.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, com todo o seu corpo docente, por me concederem a oportunidade de realizar meu sonho de tornar-se Doutora em Odontologia.

Agradeço à minha querida Professora e Mestre Prof. Dra. Elena Riet Correa Rivero, por ter me acolhido de forma tão carinhosa e por ter me dado o privilégio de trabalhar sob sua zelosa orientação. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, por sempre se fazer disponível, por todas as conversas, risadas e conselhos, relacionados ou não à academia. Sempre a levarei no coração, e espero tê-la sempre em minha vida, como amiga e eterna professora.

Agradeço a técnica de laboratório Gilmara Lemos e a estagiária Julia Pedron pelo trabalho excelente e zeloso que desempenharam. Mas muito mais do que isso, obrigada pela amizade e companhia, obrigada por tornarem nosso dia a dia no laboratório mais leve e feliz.

Agradeço aos meus amigos e colegas de pós-graduação pelo companheirismo, vocês tornaram o fardo da academia mais leve. Em especial, agradeço aos meus amigos Sarah, Carol, Nicole, Gilberto, Fernanda, Elis, Bubacar e André, por estarem sempre presentes, por me ajudarem quando precisei e por todo o carinho que recebi de vocês.

Agradeço a minha família pelo amor e apoio, sem vocês nada seria possível. Em especial agradeço à minha mãe Nely, sem seu amor, seus sacrifícios, noites em claro, orações, colo e conselhos eu jamais teria chegado até aqui.

Obrigada ao meu esposo e melhor amigo, Paulo André, que deixou sua cidade e sua família para construir um sonho comigo em um lugar completamente novo. Obrigada pelo amor incondicional e por acreditar em mim mesmo quando eu não conseguia.

Obrigada à Deus, meu refúgio e eterno provedor, obrigada pelo fôlego de vida, por me dar forças, coragem e por me capacitar.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi de avaliar a influência da razão entre neutrófilos e linfócitos (RNL) sanguínea e tumoral e de outras características histopatológicas sobre o tempo de sobrevida de pacientes com carcinoma epidermoide de boca (CEB). A amostra foi constituída por 46 pacientes, dos quais obteve-se amostras teciduais provenientes de biópsias incisionais (32,6%) e ressecções cirúrgicas (67,4%). Realizou-se imuno-histoquímica para a detecção de neutrófilos (CD66b) e linfócitos T citotóxicos (CD8), com posterior contagem das células positivas por mm^2 , separadamente no parênquima e estroma, e no centro e frente de invasão tumoral. Calculou-se a RNL sanguínea e intratumoral dividindo-se o número de neutrófilos pelo número de linfócitos. Também foi realizada a análise histológica dos casos com relação a intensidade de brotamentos tumoral, profundidade de invasão, espessura tumoral, invasão perineural e linfovascular, padrão de invasão e proporção parênquima/estroma tumoral. Posteriormente foi avaliada a relação das variáveis histopatológicas com as características clínicas e com o tempo de sobrevida geral e livre de doença dos pacientes. O tempo de acompanhamento médio dos pacientes foi de 29,52 meses (desvio padrão: 25,43 meses), quatro pacientes vieram a óbito (8,69%) e trinta e dois pacientes apresentam recorrência local (69,56%). A mediana da RNL sanguínea foi 2,5 e tumoral foi 0,09, não sendo observada correlação entre ambas. Considerando-se o total de casos, observou-se redução do tempo de sobrevida geral em tumores com baixa infiltração de células CD8 no parênquima do centro tumoral. Houve redução do tempo de vida livre de doença em pacientes com RNL sanguínea abaixo de 1,72. Nas amostras de ressecções cirúrgicas, observou-se redução do tempo de sobrevida livre de doença em tumores com RLN intratumoral acima de 0,16 e em tumores com alta infiltração de CD66b no centro tumoral. Nessa amostra ainda, observou-se que a infiltração de células CD66b+ na frente de invasão foi maior em tumores com padrão de invasão não-coeso em relação ao padrão coeso; além de alto grau de brotamento tumoral em tumores com invasão perineural e linfovascular, assim como associação entre a presença de invasão perineural e padrão de invasão não-coeso ou disperso. Finalmente, ao comparar características histopatológicas analisadas em biópsias incisionais e ressecções pareadas, observou-se que o número de brotamentos tumorais, a espessura tumoral e a proporção parênquima-estroma foram frequentemente subestimados em biópsias, e que a análise de concordância entre os tipos de amostra foi baixa. No presente estudo, observou-se associação entre a RNL tumoral e a piora do prognóstico, sugerindo a superioridade da análise local da resposta imunológica em relação à análise sanguínea. Além disso, a falta de correlação entre RNL sanguínea e tumoral sugerem que fatores tumorais são mais determinantes para a composição imunológica do tumor. Possivelmente, o impacto da RNL tumoral sobre o prognóstico foi devido à alta infiltração de neutrófilos pró-tumorais, uma vez que o aumento de neutrófilos no centro tumoral foi associado à redução do tempo de sobrevida. Já o aumento dessas células na frente de invasão foi associado ao padrão de infiltração não-coeso. Ademais, a associação de brotamentos tumorais e o padrão de invasão com a presença de invasão perineural/linfovascular suportam o uso dessas variáveis como indicadores histopatológicos de fenótipo celular invasivo. Finalmente, o impacto das

diferentes regiões tumorais sobre a infiltração de neutrófilos e linfócitos e sua associação com a sobrevida reforçam a importância da análise qualitativa, e não apenas quantitativa, da resposta imunológica tumoral.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas Bucal, neutrófilos, linfócitos T citotóxicos, CD66B, CD8, brotamento tumoral.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the influence of blood and tumor neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and other histopathological characteristics on the survival time of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). The sample consisted of 46 patients, from whom tissue samples were obtained from incisional biopsies (32.6%) and surgical resections (67.4%). Immunohistochemistry was performed for the detection of neutrophils (CD66b) and cytotoxic T lymphocytes (CD8), with subsequent counting of positive cells per mm², separately in the parenchyma and stroma, and in the center and invasive front of the tumor. Blood and intratumoral NLR were calculated by dividing the number of neutrophils by the number of lymphocytes. Histological analysis of the cases was also carried out regarding the intensity of tumor buds, depth of invasion, tumor thickness, perineural and lymphovascular invasion, invasion pattern and tumor parenchyma/stroma ratio. Subsequently, the relationship of histopathological variables with clinical characteristics and with the overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) time of the patients was evaluated. The mean follow-up time of patients was 29,52 months (standard deviation: 25,43 months), four patients died (8,69%) and thirty-two patients had local recurrence (69,56%). The median of blood NLR was 2,5 and tumor was 0,09, with no correlation between both. Considering the total number of cases, a reduction in OS time was observed in tumors with low infiltration of CD8 cells in the parenchyma of the tumor center. There was a reduction in DFS in patients with blood NLR below 1,72. In surgical resections, a reduction in DFS time was observed in tumors with intratumoral RLN above 0,16 and in tumors with high CD66b infiltration in the tumor center. In this sample, it was also observed that the infiltration of CD66b+ cells in the invasive front was greater in tumors with a non-cohesive invasion pattern in relation to the cohesive pattern; in addition to a high degree of tumor budding in tumors with perineural and lymphovascular invasion, as well as an association between the presence of perineural invasion and a non-cohesive or dispersed invasion pattern. Finally, when comparing histopathological characteristics analyzed in incisional biopsies and paired resections, it was observed that the number of tumor buds, tumor thickness and parenchyma-stroma ratio were often underestimated in biopsies, and that the analysis of agreement between sample types was low. In the present study, an association was observed between tumor NLR and worse prognosis, suggesting the superiority of local analysis of the immune response in relation to blood analysis. Furthermore, the lack of correlation between blood and tumor NLR suggest that tumor factors are more determinant for tumor immune composition. Possibly, the impact of tumor NLR on prognosis was due to the high infiltration of pro-tumor neutrophils since the increase in neutrophils in the tumor center was associated with reduced survival time. Moreover, the increase of these cells in the invasive front was associated with the non-cohesive infiltration pattern. Furthermore, the association of tumor buds and the invasion pattern with the presence of perineural/lymphovascular invasion support the use of these variables as histopathological indicators of invasive cell phenotype. Finally, the impact of different tumor regions on neutrophil and lymphocyte infiltration and its association with survival reinforce the importance of qualitative, and not just quantitative, analysis of the tumor immune response.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, neutrophils, T lymphocytes, CD66b, CD8.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Critérios para a mensuração da profundidade de invasão tumoral, de acordo com a 8ª edição do Manual para Estadiamento do Câncer.....	33
Figura 2: Critérios para a mensuração do tamanho tumoral, de acordo com a 7ª edição do Manual para Estadiamento do Câncer.	33
Figura 3: Marcas registradas do câncer e características permissivas	35
Figura 4: Ciclo imunológico do câncer: etapas e fatores que estimulam e inibem sua progressão.	57
Figura 5: Fluxo de trabalho para determinar as regiões tumorais de análise	192
Figura 6: Caixa de diálogos da ferramenta “create threshold”	194
Figura 7: Resultado da separação de colorações feita pela ferramenta “create threshold”	194
Figura 8: Caixa de diálogos da ferramenta “specify annotation”.....	196
Figura 9: Objeto resultante dos parâmetros determinados acima na caixa de diálogos.....	196
Figura 10: Caixa de diálogos aberta ao selecionar-se a ferramenta “fast cell count”	201

FIGURAS CAPÍTULO 1

Figure 1: Photomicrograph representing a 1mm ² field for A) Hematoxylin and eosin; B) Cytokeratin; C) CD66b neutrophils; and D) CD8 T lymphocytes.....	86
Figure 2: (A-B) Bland-Altman plots from the comparison between resections and biopsy samples of (A) CD8 and (B) CD66b; topmost line corresponds to the upper limit of agreement, the middle line is the average of differences, and the bottom line corresponds to the lower limit of agreement. (C-D) Correlation scatterplot for C) CD8 and D) CD66b.....	86
Figure 3: Kaplan-Meyer survival curves comparing A) T1/T2 vs T3/T4 tumors; B) <60 years-old vs ≥60 years-old; C) Parenchyma CD8 ≥12,84 ate the TC vs parenchyma CD8 <12,84 ate the TC; D) Blood NLR ≥1,72 vs blood NLR <1,72	87
Figure 1S – A representative area containing a sample of the background and a strong sample of hematoxylin and DAB staining was selected, and the <i>estimate stain vectors</i> command was applied to identify stain vectors within this region, thus improving stain separation.....	91
Figure 2S – Tumoral regions of analysis. The area delimited by the red lines corresponds to the invasive front, a 1mm wide area centered at the tumor border. The area immediately above, delimited by the yellow line, corresponds to the tumor center	91
Figure 3S – For each tumoral region, five fields of 1mm ² were randomly selected for analysis. In resections, five of these fields were located at the invasive front and five at the tumor center.....	92
Figure 4S - For each 1mm ² field, the positive cell count was performed for the whole field (area delimited by the red line) and separately at the tumor stroma	

and tumor parenchyma (area delimited by the yellow line), with the aid of cytokeratin-immunostained slides 92

Figure 5S – Kaplan-Meyer survival curve comparing survival time between different treatment modalities. OS, overall survival; CRT, chemoradiotherapy; RT, radiotherapy..... 93

FIGURAS CAPÍTULO 2

Figure 1: (A-D) Perineural invasion. (A) Hematoxylin and eosin-stained image showing partial encirclement of the nerve sheath by tumoral cells. (B) The same region seen in (A) stained with cytokeratin and showing invasion of the nerve sheath by tumoral cells. (C) Hematoxylin and eosin-stained and (D) cytokeratin-immunostained images showing complete encirclement of the nerve sheath by tumoral cells. (E) Hematoxylin and eosin-stained and (F) cytokeratin-immunostained image showing tumoral cells within the vascular space 122

Figure 2: (A) Cytokeratin-immunostained and (B) CD66b-immunostained images showing low infiltration of CD66b positive cells at the invasive front of cohesive tumors. (C) Cytokeratin-immunostained and (D) CD66b-immunostained images showing high infiltration of CD66b positive cells at the invasive front of non-cohesive tumors. 123

Figure 3: (A) Kaplan-Meyer survival curve of disease-free survival comparing high CD66b and low CD66b (cut-off point: 40,27 cells/mm²) at the tumor center. (B) Kaplan-Meyer survival curve of disease-free survival comparing high neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and low NLR (cut-off point: 0,16) at the tumor center. (C) CD66b-immunostained and (D) CD8-immunostained images of the tumor center of the same region exhibiting high CD66b and low CD8 positive cells/mm²..... 124

Figure 1S: Method to calculate depth of invasion (DOI) and tumor thickness (TT). DOI was calculated from the nearest healthy basal membrane to the deepest point of tumor invasion. TT was calculated from the highest point of the tumor surface to the deepest point of tumor invasion. A) An endophytic tumor wherein DOI is greater than TT. B) Exophytic tumor wherein DOI is smaller than TT 142

Figure 2S: Pattern of invasion cohesive, characterized by broad sheets of cancer cells and/or tumor nests with more than 15 cells across. A) Cytokeratin-immunostained slide. B) Hematoxylin and eosin-stained slide 143

Figure 3S: (A) Pattern of invasion non-cohesive, characterized by narrow strands or small groups with less than 15 tumor cells, or single infiltrating tumor cells; Amplification of the yellow square region showed in (B) hematoxylin and eosin-stained image and (C) Cytokeratin-immunostained image. (D) Pattern of invasion dispersed, characterized by individual cells infiltrating at 1mm from the main tumor; Amplification of the yellow square region showed in (E) hematoxylin and eosin-stained image and (F) Cytokeratin-immunostained image 144

FIGURAS CAPÍTULO 3

Figure 1: Cytokeratin-immunostained slides to demonstrate (A) Tumoral regions, the red line indicates the tumor borders; the blue line corresponds to the tumor invasive front, which was defined as a 1mm wide region centered at the tumor border; the yellow square corresponds to a 0.785 mm² area defined to assess tumor budding, which appears magnified at (B); (C and D) Pixel classification results from stain separation of positive DAB and hematoxylin background; tumor area is highlighted in red and stromal area in green 165

Figure 2: (A, B, C) Bland-Altman plots from the comparison between resections and biopsy samples of (A) tumor budding (TB); (B) tumor/stroma ratio (TSR); and (C) tumor thickness; topmost line refers to the upper limit of agreement, the middle line is the average of differences, and the bottom line refers to the lower limit of agreement; the dashed line refers to the line of zero. (D) Kaplan-Meier overall survival curve (OS) comparing the time until death between T1/T2 and T4/T4 tumors; (D) Kaplan-Meier disease-free survival (DFS) curve comparing the time until recurrence among different categories of tumor budding (TB), in which 0-4 low budding, 5-9 intermediate budding, and >10 high budding 166

Figure 3: (A) Kaplan-Meier overall survival curve (OS) comparing the time until death between T1/T2 and T4/T4 tumors; (B) Kaplan-Meier disease-free survival (DFS) curve comparing the time until recurrence among patients <60 and ≥60 years old 166

Figure 1S: Pixel classification parameters for stain separation of positive DAB and hematoxylin background. In the bottom left corner, it is possible to see the live stromal and tumor area calculation provided by the software 171

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características gerais da população ($n=94$).....	185
Tabela 2: Características clínicas dos casos incluídos	187
Tabela 3: Exemplo de como as médias eram calculadas para cada região e compartimento tumoral.....	200

TABELAS CAPÍTULO 1

Table 1: Clinicopathological features of the cohort.	88
Table 2: Measurement of agreement between manual and automatic methods of positive cell count	89
Table 3: Tumoral and blood neutrophil to lymphocyte ratio, according to clinicopathological features	90
Table 1S: Number of samples analyzed for each tumor region	93
Table 2S – 25 th , 75 th percentile, and median for each region of analysis.	94
Table 3S - Number of events per year of follow-up.....	94
Table 4S – Median (interquartile range) number of CD66b/mm ² at different tumor regions and according to clinical features.	95
Table 5S - Median (interquartile range) number of CD8/mm ² at different tumor regions and according to clinical features.	96
Table 6S – Spearman’s correlation coefficient between CD66b and CD8 at different tumor regions. (A) Correlation according to tumor compartments (stroma, parenchyma) and tumor regions (invasive front and tumor center). (B) Correlation according to tumor regions only	97
Table 7S - Spearman’s correlation coefficient between tumor and blood cells	98
Table 8S – Spearman’s correlation coefficient among tumor and blood neutrophil to lymphocyte ratio.....	98
Table 9S – P values for Kaplan-Meyer’s overall and disease-free survival curves comparing high and low categories, according to the cutoff points bases on the 25 th percentile, median, 75 th percentile and 1 (only neutrophil to lymphocyte ratio) and according to tumor regions.	99

TABELAS CAPÍTULO 2

Table 1: Clinical features of the sample.....	125
Table 2: Tumor-stroma ratio (TSR), Depth of invasion (DOI), Tumor thickness (TT), and Tumor budding according to clinical features	126
Table 3: Tumor-stroma ratio (TSR), Depth of invasion (DOI), Tumor thickness (TT), and Tumor budding according to histopathological features.....	127
Table 4: A) Perineural invasion (PNI) and lymphovascular invasion (LVI) according to the pattern of invasion; B) LVI according to the PNI	128

Table 5: Median (interquartile range) of positive CD66b/mm ² , CD8/mm ² , and neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) according to histopathological features	129
Table 1S: Case by case comparison between depth of invasion (DOI) and tumor thickness (TT)	134
Table 2S: Correlation between depth of invasion (DOI), tumor thickness (TT), tumor-stroma ratio (TSR), and tumor budding (TB)	135
Table 3S: Descriptive measures of the number of positive CD66b, CD8 and neutrophil-lymphocyte ratio (NLR), according to tumoral regions.....	135
Table 4S: Median (interquartile range) of the positive CD66b/mm ² for each tumoral region, according to clinical features	136
Table 5S: Median (interquartile range) of the positive CD8/mm ² for each tumoral region, according to clinical features	137
Table 6S: Median (interquartile range) of the neutrophil-lymphocyte ratio for each tumoral region, according to clinical features.....	138
Table 7S: Spearman's correlation coefficient between immunohistochemical and histopathological features.....	139
Table 8S: Results of the Kaplan-Meyer analysis for disease-free survival. Time until event (days), 95% confidence intervals, and P values.....	140

TABELAS CAPÍTULO 3

Table 1: Median (interquartile range) of tumor budding count, tumor thickness, and tumor/stroma ratio according to clinical parameters	167
Table 2: Median (interquartile range) of A) tumor/stroma ratio and tumor thickness according to different tumor budding categories; B) tumor budding count according to different tumor/stroma ratios and tumor thickness categories	168
Table 3: Agreement between resections and matched biopsies	169
Table 1S: Clinical parameters according to type of sample	172
Table 2S: Median (interquartile range) of tumor budding count, tumor/stroma ratio, and tumor thickness according to clinical parameters, in the whole sample	174
Table 3S: Median (interquartile range) of A) TSR and TT according to different TB categories; B) TB count according to different TSR and TT categories	175
Table 4S: Correlation between histopathological variables in A) resections and B) biopsies.	176
Table 5S: Number (%) of histopathological variables according to clinical parameters in A) Resections and B) Biopsies	177
Table 6S: Agreement between resections and matched biopsies, case by case	179
Table 7S: P value results for Kaplan Meyer survival curves	181

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios para a classificação de T de acordo com a 8ª edição do Manual para Estadiamento do Câncer	30
Quadro 2: Critérios para a classificação de N conforme a 8ª edição do Manual para Estadiamento do Câncer.....	32
Quadro 3: Relação dos anticorpos usados nas reações imuno-histoquímicas	190
Quadro 4: Campos de análise, conforme o tipo de amostra	199

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	Comitê Conjunto Americano de Câncer
APC	Células apresentadoras de antígenos
APM	Maquinaria de processamento de antígenos
BT	Brotamento tumoral
CE	Carcinoma epidermoide
CEB	Carcinoma epidermoide de boca
CRP	Proteína C reativa
DAB	Diaminobenzidina
EEN	Extensão extranodal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
FAC	Fibroblastos associados ao câncer
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
GLUT	Transportador de glicose
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
H&E	Hematoxilina e eosina
HIF	Fator induzido por hipóxia
HLA-1	Antígeno leucocitário humano de classe 1
HPV	Papiloma vírus humano
IC 95%	Intervalo de confiança 95%
ICC	Índice de correlação intraclasse
IL-10	Interleucina 10
IL-1b	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
MAC	Macrófagos associados ao câncer
MAT	Microambiente tumoral
MDSC	Células mieloides supressoras
MEC	Matriz extracelular
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Metaloproteinase de matriz
NAC	Neutrófilos associados ao câncer
NAD	Neutrófilo de alta densidade

NBD	Neutrófilo de baixa densidade
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
PD-L1	Ligante de morte celular programada 1
PI	Profundidade de invasão
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
RNL	Razão neutrófilo – linfócito
RNLi	Razão neutrófilo-linfócito intratumoral
RR	Risco de morte
SAP	Serviço de anatomia patológica
SAP-HU/UFSC/EBSERH	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina
STAT3	Signal transducers and activators of transcription
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de célula T
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TGF-a	Fator de crescimento transformador alfa
TGF-b	Fator de crescimento transformador beta
Th	Linfócito T auxiliar
TNF-a	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócito T regulador
TSR	Proporção tumor-estroma
UICC	União Internacional para controle do Câncer
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS EM INGLÊS

AJCC American Joint Committee on Cancer

bNLR blod neutrophil to lymphocyte ratio

CA California

CI confidence interval

CK cytokeratin

CRT chemo-radiotherapy

DAB 3,3'-diaminobenzidine

DFS disease-free survival

DOI depth of invasion

DSS disease-specific survival

EMT epithelial-mesenchymal transition

ENE extranodal extension

ES effect size

H&E hematoxylin and eosin

HRP horseradish peroxidase

ICC intraclass correlation coefficient

IF invasive front

IL interleukin

IQR interquartile range

LNM lymph node metastasis

LVI lymphovascular invasion

NLR Neutrophil to lymphocyte ratio

NPV negative predictive value

OR odds ratio

OS overall survival

OSCC oral squamous cell carcinoma

P parenchyma
PI pattern of invasion
PNI perineural invasion
PPV positive predictive value
RQT radio-chemotherapy
RT radiotherapy
S stroma
SD standard deviation
TAN tumor infiltrating neutrophils
TB tumor budding
TC tumor center
TGF- β transforming growth beta
tNLR tumor neutrophil to lymphocyte ratio
TSR tumor stroma ratio
TT tumor thickness
UICC Union for International Cancer Control
USA United States of America
WHO World Health Organization
WSI whole-slide images

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 JUSTIFICATIVA.....	26
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 GERAL	27
3.2 ESPECÍFICOS.....	27
4 REFERENCIAL TEÓRICO.....	28
4.1 CARCINOMA EPIDERMOIDE DE BOCA	28
4.2 MARCAS REGISTRADAS DO CÂNCER.....	34
4.3 MICROAMBIENTE TUMORAL E A PROPORÇÃO ENTRE PARÊNQUIMA E ESTROMA TUMORAL.....	40
4.4 NEUTRÓFILOS ASSOCIADOS AO CÂNCER.....	47
4.5 LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS ASSOCIADOS AO CÂNCER.....	54
4.6 RAZÃO NEUTRÓFILO/LINFÓCITOS NO PROGNÓSTICO DE PACIENTE COM CÂNCER	60
5 CAPÍTULO 1.....	65
5.1 APRESENTAÇÃO	66
5.2 ARTIGO.....	67
5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
6 CAPÍTULO 2.....	101
6.1 APRESENTAÇÃO	102
6.2 ARTIGO.....	103
6.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	145
7 CAPÍTULO 3.....	146
7.1 APRESENTAÇÃO	147
7.2 ARTIGO.....	148
7.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	182
8 METODOLOGIA EXPANDIDA.....	183
8.1 DESENHO DE ESTUDO	183
8.2 ASPECTOS ÉTICOS	183
8.3 TAMANHO AMOSTRAL	184
8.4 POPULAÇÃO	184
8.5 VARIÁVEIS.....	188
8.6 ACOMPANHAMENTO.....	189
8.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	189
8.8 ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICA	190

8.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	203
REFERÊNCIAS.....	204
ANEXOS.....	217

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide de boca (CEB) constitui um problema de saúde pública mundial de elevada incidência e altos índices de morbidade e mortalidade, em decorrência, principalmente, do diagnóstico tardio que impossibilita uma terapêutica adequada dos pacientes ¹⁻³. Atualmente, a previsão do prognóstico é baseada no estadiamento clínico do tumor, que considera o tamanho tumoral e a presença de metástases locais e a distância ⁴. Recentemente, a profundidade de invasão e a extensão extranodal foram incluídas como variáveis para o estadiamento clínico, marcando o reconhecimento da importância de características histopatológicas no prognóstico dos pacientes ⁵. Além disso, outras características histopatológicas, como grau de diferenciação histológica, invasão perineural e linfovascular, apesar de não integrarem o estadiamento clínico, são rotineiramente descritas nos laudos histopatológicos, e na literatura são frequentemente associadas ao prognóstico clínico ⁶. Destacam-se ainda características histopatológicas emergentes na literatura, as quais contam com um crescente corpo de evidências suportando seu uso clínico, como a análise de brotamentos tumorais e da proporção parênquima-estroma tumoral ⁶.

Além das características histopatológicas, o estudo de biomarcadores para a determinação do prognóstico é um campo crescente e promissor na oncologia. De maneira geral, o estudo de biomarcadores baseia-se em alterações de vias celulares associadas a proliferação, sobrevivência e invasão celular. Tais alterações são observadas virtualmente em todos os tumores malignos e referem-se tanto às características adquiridas pelas células malignas, como às alterações promovidas pelo microambiente tumoral ⁷⁻⁹. Nesse contexto, o sistema imunológico desempenha um duplo papel. Por um lado, escapar da eliminação do sistema imunológico é uma marca registrada do câncer, a qual se caracteriza pela imunossupressão de células responsáveis pela eliminação de células malignas, como linfócitos T citotóxicos e células

natural killers. Por outro lado, a inflamação constitui uma característica permissiva ao desenvolvimento tumoral, sendo promovida por células inflamatórias, como neutrófilos, e por mediadores químicos, os quais atuam sobre as vias celulares de iniciação, promoção e progressão tumoral⁸.

O impacto da resposta imunológica pró/antitumoral pode ser observado em estudos de sobrevida de pacientes oncológicos. Tem sido demonstrado que, indivíduos que apresentam tumores malignos densamente infiltrados por linfócitos T citotóxicos exibem uma melhora significativa da sobrevida¹⁰. Em contrapartida, a infiltração tumoral por neutrófilos está associada à redução do tempo de sobrevida de pacientes com diversos tipos de câncer, inclusive o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço¹¹.

Linfócitos T citotóxicos são atraídos ao ambiente tumoral em resposta a liberação de antígenos associados ao câncer e sua ação citotóxica é direcionada à eliminação das células tumorais via indução de morte programada¹². Por outro lado, os neutrófilos constituem uma fonte importante de mediadores da inflamação que estimulam a proliferação celular, angiogênese, degradação da matriz extracelular e imunossupressão¹³. *In vitro*, neutrófilos inibem a ação citotóxica de linfócitos T¹⁴, além disso, a infiltração tumoral de linfócitos T citotóxicos é inversamente proporcional ao número de neutrófilos¹⁵. Em tumores sólidos, estudos demonstram a relação entre a proporção sanguínea de neutrófilos e linfócitos com a sobrevida de pacientes¹⁶⁻¹⁸. Por outro lado, a proporção entre neutrófilos e linfócitos em amostras teciduais permanece pouco estudada. No carcinoma pulmonar de células não-pequenas, a razão neutrófilo/linfócito (RNL) intratumoral mostrou-se um bom indicador de prognóstico¹⁵. No CEB, há estudos disponíveis sobre o impacto prognóstico da RNL sanguínea^{18, 19}, entretanto, a RNL intratumoral poderia representar um indicador local da resposta imunológica, por sofrer menos influência de estímulos imunológicos sistêmicos, como infecções e medicações.

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram estudar a relação entre a RNL intratumoral e sanguínea e o impacto dessas variáveis no tempo de sobrevivência de pacientes com CEB; analisar as principais características histopatológicas associadas ao prognóstico do CEB; e analisar o uso de biópsias incisionais para a avaliação de características histopatológicas em relação à concordância com amostras de ressecções cirúrgicas pareadas.

2 JUSTIFICATIVA

Justifica-se o presente estudo diante da necessidade em se aprofundar o conhecimento a respeito da resposta imunológica associada à progressão do carcinoma epidermoide de boca, tendo em vista também as possíveis aplicações terapêuticas associadas à imunoterapia. Além disso, o reconhecimento crescente da importância clínica de características histopatológicas demanda que novos estudos sejam realizados para contribuir com o avanço do conhecimento na área, visando futuras aplicações clínicas. Em especial, destaca-se a necessidade de estudos testando a validade de biópsias diagnósticas para a análise de características histopatológicas, a fim de usá-las no planejamento terapêutico dos pacientes oncológicos.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliação da influência da RNL sanguínea e intratumoral e de características histopatológicas no prognóstico de pacientes com CEB.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a quantidade e distribuição intratumoral de neutrófilos e linfócitos T citotóxicos em amostras de CEB;
- b) Estimar a relação intratumoral e sanguínea entre neutrófilos e linfócitos por meio do cálculo da razão neutrófilo/linfócito em pacientes com CEB;
- c) Avaliar a presença e intensidade de brotamentos tumorais em amostras de CEB;
- d) Comparar a intensidade de brotamentos tumorais entre ressecções cirúrgicas e biópsias incisionais, pareadas e não-pareadas;
- e) Avaliar a proporção entre estroma e parênquima tumoral em amostras de CEB;
- f) Avaliar o padrão da frente de invasão, profundidade de invasão, espessura tumoral, invasão perineural e invasão linfovascular em amostras de CEB;
- g) Investigar possíveis correlações entre todas as variáveis histopatológicas analisadas;
- h) Analisar o impacto dos parâmetros analisados no tempo de sobrevida geral e livre de doença de pacientes com CEB.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 CARCINOMA EPIDERMOIDE DE BOCA

De acordo com o levantamento realizado pelo Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN), estima-se que em 2020 o número de novos casos de câncer de boca e lábio foi de 377.713 e o número de mortes 97.370, o que corresponde à 2% e 1.8% da incidência e mortalidade por câncer no mundo, respectivamente ¹. Ainda de acordo com o levantamento, o câncer de boca e lábio foi o 8º mais comum em homens e o 15º em mulheres, e, para ambos os sexos, tanto a incidência quanto a mortalidade foram mais elevadas em países com baixo índice de desenvolvimento humano. Na região central da Ásia, o câncer de boca e lábio foi o mais frequente, refletindo a popularidade do consumo de noz de areca, sendo que, na Índia, foi o câncer de maior incidência e mortalidade dentre todos os tipos de câncer. A América do Sul exibiu a 12ª maior incidência de câncer de boca e lábio no mundo ¹. Em 2018 no Brasil, registrou-se 6.455 óbitos por câncer de boca e lábio, o que representa 50% dos óbitos por câncer de cabeça e pescoço (exceto tireoide), sendo que 77% do total de óbitos ocorreu em homens e 61% em pessoas acima de 60 anos ²⁰.

O carcinoma epidermoide (CE) representa 90% de todas as malignidades que acometem a cavidade bucal ²¹. Há uma forte associação entre CE de boca (CEB) e fatores de risco, como o consumo de tabaco e álcool, e os padrões de incidência e mortalidade estão amplamente ligados as diferenças nos hábitos de consumo da população. Os principais fatores de risco reconhecidos para o CEB são o consumo de tabaco (com e sem fumaça), álcool e o hábito de mascar a noz de areca – popularmente consumida na Ásia como uma mistura contendo ou não tabaco chamada betel quid ²². O consumo combinado de álcool e tabaco é altamente sinérgico e apresenta chance cinco vezes maior de desenvolvimento de CEB em relação ao não consumo ou consumo mínimo dos dois produtos ²³. Apresenta-se como fator de risco

emergente a infecção com o Papilomavírus Humano (HPV), principalmente para o CE de orofaringe, sugerindo uma possível associação com a transmissão sexual devido à natureza do vírus ²². Observa-se ainda alto risco para CEB em países com baixo índice de desenvolvimento, o que pode ser atribuído a maior prevalência de hábitos de alto risco e, possivelmente, à má-nutrição ²². Outros possíveis fatores de risco, sem suporte científico suficiente, incluem o consumo da erva-mate, a má higiene bucal, doença periodontal e o histórico familiar ²¹. Atualmente, observa-se a melhora persistente das taxas de incidência e mortalidade do CEB em muitos países, principalmente em homens, em resposta à crescente conscientização e redução do consumo dos principais fatores de risco. Em contrapartida, observa-se o aumento da incidência e mortalidade do CE de orofaringe, atribuído às mudanças do comportamento sexual e ao aumento da prevalência do HPV na população ²⁴.

O diagnóstico tardio permanece um problema para a sobrevida de pacientes com CEB. Aproximadamente 50% dos pacientes são diagnosticados com doença em estágio avançado, o que restringe as opções terapêuticas e tem um impacto no prognóstico ^{2, 3, 25}. Após 5 anos do diagnóstico, reporta-se uma taxa de sobrevida geral entre 39-81%, e uma taxa de sobrevida livre de doença entre 57-66% ^{2, 3, 25}. O estadiamento clínico de tumores permanece a principal ferramenta para a avaliação do prognóstico. Fundado em 1959, o Comitê Conjunto Americano de Câncer (AJCC) em colaboração com a União Internacional para controle do Câncer (UICC) publicaram em 1977 o primeiro manual para o estadiamento clínico do câncer. Desde então, oito edições do manual foram publicadas a cada 6-8 anos, permitindo a acomodação dos avanços na pesquisa do câncer. O estadiamento clínico baseia-se em informações anatômicas do tumor primário, do acometimento de linfonodos regionais e de metástases a distância. Assim, são avaliados o tamanho do tumor e extensão para estruturas vizinhas (T); o número e localização de linfonodos regionais acometidos (N); e a presença de metástases a distância (M). No manual,

recomenda-se ainda o registro do grau histológico utilizando o método de gradação, o qual pode ser de dois a quatro graus, sem constar demais especificações. O estadiamento clínico final é feito de acordo com o grau do TNM e pode ser classificado de 0-IV ⁴.

O manual de estadiamento clínico encontra-se em sua 8^a edição, lançada em 2017, a qual conta com alterações importantes na categorização de T e N. Para a categorização de T, a principal alteração foi a inclusão da profundidade de invasão (**Quadro 1**). Tal alteração reconhece o comportamento biológico agressivo de tumores pequenos, mas profundamente invasivos. Além disso, a edição recente define claramente a diferença entre profundidade de invasão e espessura tumoral, que até então vinham sendo usados de maneira equívoca. Clinicamente, mensurar a profundidade de invasão (PI) exige a avaliação criteriosa e palpação detalhada, suplementadas por exames de imagem, a fim de diferenciar tumores exofíticos espessos de tumores ulcerados invasivos. Histologicamente, a PI corresponde à distância da membrana basal do epitélio adjacente ao tumor até o ponto mais profundo de invasão (**Figura 1**) ⁵.

Quadro 1: Critérios para a classificação de T de acordo com a 8^a edição do Manual para Estadiamento do Câncer.

TX: Tumor primário não pôde ser avaliado.
Tis: Carcinoma in situ.
T1: tumor ≤2cm, Profundidade de invasão (PI) ≤5mm
T2: tumor ≤2cm, PI >5mm e ≤10mm OU tumor >2cm, mas ≤4cm, e PI ≤10mm.
T3: tumor >4cm OU qualquer tumor com PI >10mm.
T4a: doença local moderadamente avançada: tumor (lábio) invade através do osso cortical ou envolve o nervo alveolar inferior, assoalho da boca ou pele do rosto (ou seja, queixo ou nariz); (cavidade bucal) tumor invade apenas estruturas adjacentes (osso da mandíbula ou maxila, ou envolve o seio maxilar ou pele do rosto); a erosão superficial do alvéolo ósseo/dente (apenas) por um tumor primário da gengiva não é suficiente para classificar um tumor como T4.
T4b: doença local muito avançada; tumor invade o espaço mastigatório, placas pterigoideas, ou base do crânio e/ou envolve a artéria carótida interna.

Fonte: Traduzido de Lydiatt et al., (2017).

Para a categorização clínica e patológica de N, a principal alteração foi a inclusão da extensão extranodal (EEN) como variável complementar ao número e tamanho de linfonodos acometidos (**Quadro 2**). A EEN é definida como a extensão de carcinoma metastático do interior do linfonodo para além da cápsula fibrosa e para o interior do tecido conjuntivo fibroso circunjacente. Focos de carcinoma metastático empurrando a cápsula sem rompê-la não constituem EEN. A decisão de incluir a EEN na classificação clínica de N deve ser inequívoca e suportada por achados clínicos e de imagem, sendo que achados de imagem, apesar de sugestivos, são considerados insuficientes para definir a presença clínica de EEN ⁵.

A inclusão de EEN no estadiamento do CEB cria duas situações clínicas. A primeira resulta da subcategorização de pacientes diante da impossibilidade de realizar o diagnóstico histopatológico de EEN. A segunda é a migração de pacientes com EEN positiva para categorias mais avançadas, podendo haver uma melhora artificial da sobrevida de pacientes das categorias com EEN negativa ²⁶. Em um estudo recente, a observação de EEN positiva resultou na migração de 135 pacientes das categorias N2a/b/c (7^a edição) para a categoria N3b (8^a edição), categoria essa que contava com 3 pacientes antes da migração. Entretanto, a análise de sobrevida geral mostrou que apenas a migração de pacientes da categoria N2b (7^a edição) para a N3b (8^a edição) resultou em diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevida ²⁶.

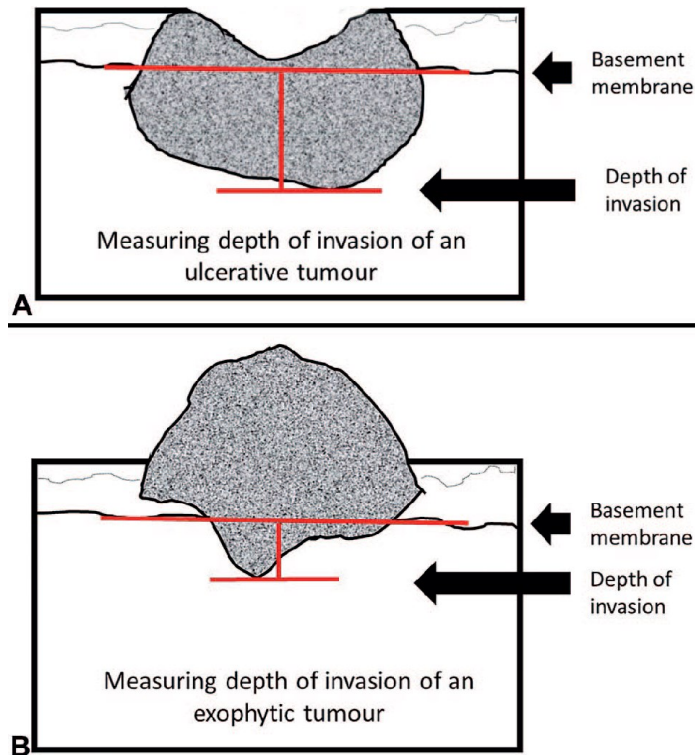
Quadro 2: Critérios para a classificação de N conforme a 8ª edição do Manual para Estadiamento do Câncer.

Classificação clínica de N
NX: Linfonodo regional não pôde ser avaliado.
N0: Sem metástase para linfonodo regional.
N1: Metástase para um único linfonodo ipsilateral, ≤3cm em sua maior dimensão e extensão extranodal (EEN) negativa.
N2: Metástase para um único linfonodo ipsilateral, >3cm e ≤6cm em sua maior dimensão e EEN negativa; OU metástase para múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum maior do que 6cm em sua maior dimensão e EEN negativa; OU metástase para linfonodos contralaterais ou bilaterais, nenhum maior que 6cm em sua maior dimensão e EEN negativa.
N2a: Metástase para um único linfonodo ipsilateral maior que 3cm e menor que 6cm em sua maior dimensão e EEN negativa.
N2b: Metástases para múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum maior que 6cm em sua maior dimensão e EEN negativa.
N2c: Metástase para linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum maior que 6cm em sua maior dimensão e EEN negativa.
N3: Metástase para linfonodo maior que 6cm em sua maior dimensão e EEN negativa; OU metástase para qualquer linfonodo e EEN clinicamente evidente.
N3a: Metástase para linfonodo maior que 6cm em seu maior diâmetro e EEN negativa.
N3b: metástase para qualquer linfonodo e EEN clinicamente evidente.
Classificação patológica de N
NX: Linfonodo regional não pôde ser avaliado.
N0: Sem metástase para linfonodo regional.
N1: Metástase para um único linfonodo ipsilateral, ≤3cm em sua maior dimensão e EEN negativa.
N2: Metástase para um único linfonodo ipsilateral, ≤3cm em sua maior dimensão e EEN positiva; OU metástase entre 3 e 6cm em sua maior dimensão e EEN negativa; OU metástase bilateral ou contralateral, nenhuma com mais de 6cm em sua maior dimensão e EEN negativa.
N2a: Metástase para um único linfonodo ipsilateral ou contralateral ≤3cm em sua maior dimensão e EEN positiva; OU metástase em um único linfonodo ipsilateral >3cm e ≤6cm em sua maior dimensão e EEN negativa.
N2b: Metástases para múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhuma maior que 6cm em sua maior dimensão e EEN negativa.
N2c: Metástase para linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhuma maior que 6cm em sua maior dimensão e EEN negativa.
N3: Metástase para linfonodo maior que 6cm em sua maior dimensão e EEN negativa; OU metástase para um único linfonodo ipsilateral maior que 3cm em sua maior dimensão e EEN positiva; OU metástase para múltiplos linfonodos ipsilaterais, contralaterais, ou bilaterais, qualquer uma EEN positiva.
N3a: Metástase para linfonodo maior que 6cm em seu maior diâmetro e EEN negativa.
N3b: Metástase para um único linfonodo ipsilateral maior que 3cm em seu maior diâmetro e EEN positiva; OU metástase para linfonodos múltiplos ipsilaterais, contralateral ou bilateral, qualquer uma EEN positiva.

Fonte: Traduzido de Lydiatt et al., (2017).

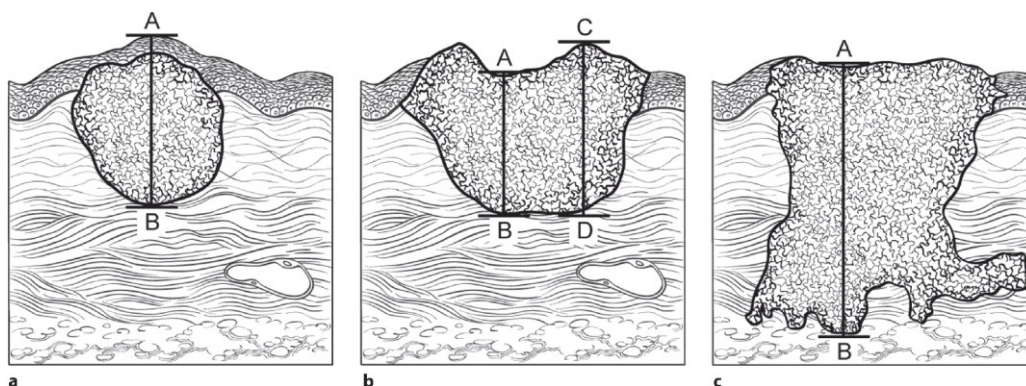
Em contrapartida, a inclusão de PI eleva a categoria de T em cerca de 25% dos casos, mas não parece ter impacto na previsão de sobrevida desses pacientes²⁷. Além disso, quando o uso de PI conforme os critérios da 8ª edição do manual de estadiamento do câncer (**Figura 1**) foi comparado ao uso da espessura tumoral segundo os critérios da 7ª edição (**Figura 2**) não se observou diferença na estratificação do risco de pacientes em relação a sobrevida geral e específica para CEB²⁸.

Figura 1: Critérios para a mensuração da profundidade de invasão tumoral, de acordo com a 8ª edição do Manual para Estadiamento do Câncer.



A) Medindo a profundidade de invasão tumoral em um tumor ulcerado. Basement membrane: membrana basal; Depth of invasion: profundidade de invasão. B) Medindo a profundidade de invasão tumoral em um tumor exofítico. Basement membrane: membrana basal; Depth of invasion: profundidade de invasão. **Fonte:** Traduzido de Muller et al., (2019).

Figura 2: Critérios para a mensuração do tamanho tumoral, de acordo com a 7ª edição do Manual para Estadiamento do Câncer.



a) Lesão exofítica: deve-se medir a espessura tumoral a partir de uma linha perpendicular traçada da superfície da lesão (A) até o ponto mais profundo de invasão (B); b) Lesão ulcerada: deve-se medir a lesão a partir de uma linha perpendicular traçada da base da úlcera (A) até o ponto mais profundo de invasão (D), e da superfície da porção mais lateral da úlcera (C) até o ponto mais profundo da invasão (D); c) Lesão endofítica: deve-se medir a lesão a partir de uma linha perpendicular traçada da superfície do epitélio maligno invasivo (A) até o ponto mais profundo de invasão (B). **Fonte:** Traduzido de AJCC 7º Manual para Estadiamento do Câncer.

A inclusão de PI e EEN como critérios para o estadiamento do câncer é um marco para o reconhecimento da importância clínica de variáveis histopatológicas na avaliação do risco de pacientes com CEB. Nesse contexto, outras variáveis histopatológicas, como a invasão perineural, invasão linfovascular e o grau de diferenciação histológica também alteram a sobrevida de pacientes com CEB ²⁹, e apesar de não fazerem parte do estadiamento clínico, são frequentemente descritos no laudo histopatológico.

Além das características histopatológicas, o conhecimento a respeito de biomarcadores para o câncer avançou muito em anos recentes. O termo biomarcador pode se referir a proteínas, moléculas de DNA, RNA, carboidratos ou pequenas moléculas, como metabólitos, os quais são indicadores mensuráveis para o risco de aquisição, a presença ou severidade de uma determinada doença ³⁰. Para o CEB, destaca-se o uso de biomarcadores salivares para o diagnóstico precoce, dentre os quais as citocinas interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são candidatos promissores ³¹. Para o prognóstico, a maioria dos biomarcadores estudados são proteínas, os quais permanecem como biomarcadores em potencial, devido a necessidade de validação clínica ³². De maneira geral, os biomarcadores atualmente em estudo se relacionam à algum processo biológico que se encontra desregulado no câncer, como por exemplo o ciclo celular, proliferação celular, migração/motilidade/adesão celular, metabolismo celular, apoptose, resposta imunológica, inflamação e outros ³².

4.2 MARCAS REGISTRADAS DO CÂNCER

As marcas registradas do câncer se referem as características adquiridas por células malignas durante a carcinogênese e progressão tumoral que promovem o crescimento, proliferação e disseminação celular. Atualmente, são reconhecidas 8 marcas registradas e 2 características permissivas, além de duas marcas emergentes e duas características permissivas emergentes (**Figura 3**) ⁹.

Figura 3: Marcas registradas do câncer e características permissivas



A imagem à esquerda refere-se às marcas registradas (azul) e às características permissivas (vermelho) reconhecidas. A imagem à direita refere-se às marcas registradas (azul) e às características permissivas (vermelho) emergentes.

Fonte: Traduzido de Hanahan, 2022⁹

As marcas registradas do câncer e características permissivas, apesar de comuns a virtualmente todos os tumores sólidos, exibem mecanismos de aquisição variados e podem se desenvolver durante diferentes etapas da carcinogênese. As marcas registradas e características permissivas, atualmente reconhecidas, são também descritas no contexto do CEB^{33, 34}.

De maneira geral, o sinal proliferativo é mantido pela expressão elevada do receptor de crescimento epidermal (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*) e seu ligante, o fator de crescimento transformador alfa (TGF- α , do inglês *transforming growth factor alfa*). O escape à supressores do crescimento, por sua vez, é mediado principalmente pela proteína “guardiã do genoma”, a P53, cujo gene encontra-se mutado em cerca de 60-80% dos casos de CEB. A resistência à morte celular também resulta da ação do EGFR e P53 e a consequente ativação de vias de sobrevivência celular, como o fator de transcrição STAT3 (do inglês, *signal transducers and activators of transcription*) e a enzima fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K). A imortalidade celular é acentuada pela reativação da enzima telomerase, que confere imortalidade replicativa às células malignas. Diante do crescimento constante e desenfreado das células, cria-se um ambiente tumoral

frequentemente hipóxico, o qual demanda o suprimento de oxigênio e nutrientes, assim como a remoção dos restos do metabolismo celular. Assim, as marcas registradas de indução à vasculatura e desregulação metabólica das células malignas criam condições para a adaptação e progressão tumoral. As células tumorais também adquirem características que as permitem escapar da destruição imunológica, além de exibirem alterações do seu fenótipo epitelial para permitir a invasão e metástase tecidual. Essas duas últimas marcas registradas, assim como a característica permissiva da inflamação pró-tumoral são descritas abaixo com mais detalhes ^{8, 33, 34}.

4.2.1 Escape da destruição imunológica

O sistema imunológico atua como barreira contra o desenvolvimento tumoral, assim, células malignas necessitam superar esse mecanismo para iniciar um tumor e avançar localmente e à distância. Os mecanismos que levam ao escape da destruição imunológica são variados. A hipóxia tumoral, por exemplo, através do fator induzido por hipóxia (HIF, do inglês *Hypoxia-Inducible Factor*) promove a expressão dos imunossuppressores interleucina-10 e fator de crescimento transformador beta (TGF- β , do inglês *transforming growth factor beta*), que por sua vez promovem a polarização de macrófagos para o fenótipo imunossupressor. HIF-1 α também interage com células antitumorais promovendo apoptose e alterando seu perfil secretor. Em linfócitos T e células *natural killers* (NK), a interação de HIF com os pontos de restrição imunológicos (*immune checkpoints*) impede o reconhecimento de células tumorais, promovendo um microambiente tumoral tolerante às células malignas ³⁵. Em CEB, observa-se co-expressão de HIF-1 α e do ligante de morte celular programada PD-L1 em células tumorais hipóxicas próximas a áreas de necrose tumoral, e tumores de pacientes exibindo áreas de necrose e expressão de PD-L1 apresentam redução da sobrevida ³⁶.

Outro mecanismo de escape da vigilância imunológica no CEB inclui a expressão reduzida de moléculas do sistema de antígeno

leucocitário humano de classe I (HLA-1, do inglês *human leukocyte antigen*) e dos componentes celulares necessários para o processamento de antígenos (APM, do inglês *Antigen Processing Machinery*). A expressão desses componentes encontra-se reduzida no tumor em relação ao tecido normal adjacente, sendo associada à ocorrência de metástase para linfonodos e à redução da sobrevida ³⁵. Por outro lado, um estudo recente observou que a expressão elevada de moléculas HLA-1/APM teve uma correlação positiva com a infiltração de linfócitos T citotóxicos, mas que essa associação não foi um preditor eficaz para a sobrevida, especialmente em CEB com estágio T inicial. Esses resultados mostram que outros fatores imunológicos além do HLA-1/APM podem ser mais importantes na determinação do prognóstico de pacientes com CEB ³⁷.

O desenvolvimento e progressão do CEB também é amplamente afetado pela composição celular imunológica do microambiente tumoral e do sangue periférico. Nesse contexto, a baixa infiltração de células efectoras, a alta infiltração de células imunossupressoras, a alta concentração de mediadores solúveis imunossupressores (fator de crescimento vascular endotelial, TGF- β , IL-6 e IL-10) e a disfunção de células citotóxicas, como linfócitos T CD8 e células NK, são fatores que contribuem para a imunoevasão e progressão do CEB ³⁵. Além disso, as células tumorais inibem a maturação de células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês *antigen presenting cells*), principalmente em resposta à hipóxia e sob a ação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês, *vascular endotelial growth factor*), reduzindo o reconhecimento e apresentação de antígenos associados ao câncer ³⁸, ³⁹.

4.2.2 Invasão e metástase

A metástase do CEB ocorre principalmente para os linfonodos cervicais do lado afetado pelo tumor ³³. O processo de invasão e metástase envolve uma sequência de etapas que incluem a perda de adesão entre as células malignas, o aumento da interação entre as

células malignas e a matriz extracelular e o ganho de motilidade celular. Essas alterações são governadas principalmente pelo programa celular de transição-epitélio-mesenquimal (TEM) – um mecanismo muito usado no desenvolvimento embrionário, mas que é sequestrado por células epiteliais malignas para permitir a invasão, resistência a apoptose e disseminação celular ⁸.

Células epiteliais normais mantêm uma polaridade apicobasal por meio de junções celulares de oclusão, junções aderentes, desmossomos e hemi-desmossomos. Esse fenótipo é mantido por genes responsáveis pela expressão dessas proteínas ⁴⁰⁻⁴². Diante da ativação do programa TEM, em resposta aos fatores de transcrição SNAIL, TWIST e ZEB, há a expressão de genes e proteínas associados ao estado mesenquimal, como N-caderina, vimentina, fibronectina, β -integrinas e metaloproteinases de matriz, assim como a inibição de genes associados ao estado epitelial, como E-caderina, moléculas de adesão celular epitelial, ocludinas, claudinas, $\alpha 6\beta 4$ integrinas e citoqueratinas. As mudanças ocorrem dentro de um espectro progressivo que se inicia com a perda das junções célula-célula e da polaridade apicobasal do epitélio, seguida pela aquisição parcial de características mesenquimais. Em alguns casos, pode haver a completa aquisição de características mesenquimais, como alongamento celular, polarização do núcleo para frente e a reorganização do citoesqueleto, todas mantidas pela expressão dos fatores de transcrição associados à TEM. É importante destacar que, poucas células epiteliais adquirem um estado completo de TEM, sendo que na maioria dos casos a célula permanece em um estado intermediário de transição ⁴⁰.

As alterações moleculares associadas à TEM são observadas na alteração do fenótipo celular epitelial. Histologicamente, a TEM é associada à ocorrência de brotamentos tumorais (BT) – células individuais ou agrupamento de até 4 células epiteliais observados principalmente na frente de invasão de carcinomas ⁴². No CEB, a presença de BT foi associada à expressão imuno-histoquímica do fator

de transcrição SNAIL⁴³, à redução da expressão de E-caderina, ao aumento da expressão de vimentina e ao deslocamento nuclear de β -catenina^{44, 45}, entretanto, a perda dos marcadores epiteliais não ocorreu simultaneamente ao aumento da expressão de marcadores mesenquimais, o que condiz com o estado de TEM parcial⁴². Além disso, regiões tumorais com BT exibiram aumento da expressão dos fatores de transcrição para TEM, como ZEB e PRRX1, e aumento da expressão de genes associados a mobilidade celular, sobrevivência celular e a produção de matriz extracelular, mudanças que parecem ser reguladas pelo fator de crescimento transformador beta (TGF- β)⁴⁶. Diante disso, a presença de BT poderia funcionar como um marcador histopatológico da ocorrência de TEM, mesmo que parcial, e a presença de alto grau de BT em CEB está amplamente associada à redução do tempo de sobrevida geral, específica por câncer e livre de recorrência⁶.

4.2.3 Inflamação pró-tumoral

A inflamação tumoral contribui para a aquisição de quase todas as marcas registradas do câncer. Quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento induzem a proliferação e sobrevivência celular, angiogênese tumoral, modificação da matriz extracelular, facilitação da invasão e metástase e estimulam a ocorrência da TEM. Dessa maneira, a inflamação pode atuar em praticamente todas as etapas da carcinogênese, seja na iniciação, promoção ou progressão e metástase^{8, 47}.

No CEB, é possível observar infiltrado inflamatório no início da carcinogênese oral, e a intensidade de células inflamatórias foi associada ao grau de displasia epitelial⁴⁸. Apesar de não haver um marcador inflamatório definitivo para o prognóstico do CEB, muitos têm sido alvo de estudos. Marcadores sistêmicos, como a proteína C reativa de fase aguda (CRP, do inglês *C-reactive protein*) aumentam em resposta a citocinas pró-inflamatórias tumorais liberadas na corrente sanguínea, como IL-6. No CEB, a elevação dos níveis de CRP foi associada ao aumento da agressividade de doença⁴⁹. A principal

vantagem dos marcadores inflamatórios sistêmicos está na possibilidade do uso de hemogramas para o monitoramento. Assim, torna-se possível fazer a contagem de células inflamatórias, como a razão entre neutrófilos e linfócitos (RNT), a qual tem sido usada com relativo sucesso para a previsão de sobrevida em portadores de CEB ⁵⁰.

A elevação de marcadores pró-inflamatórios salivares e tumorais, como IL-6, também ocorre em pacientes com CEB e é frequentemente associada com doença avançada e com a redução do tempo de sobrevida dos pacientes. Além disso, observa-se a elevação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, no microambiente tumoral do CEB, onde atuam como imunossupressores da resposta imunológica antitumoral ⁴⁹. Finalmente, células inflamatórias, além de fibroblastos e células tumorais, são fontes importantes de enzimas remodeladoras de matriz extracelular, cuja expressão foi associada à ocorrência de metástase regional no CEB ⁴⁸.

4.3 MICROAMBIENTE TUMORAL E A PROPORÇÃO ENTRE PARÊNQUIMA E ESTROMA TUMORAL

As células malignas não se encontram isoladas de outros componentes teciduais. Tumores malignos são estruturas complexas e organizadas, e é preciso compreendê-los no contexto em que estão inseridos. Dessa maneira, o microambiente tumoral (MAT) é constituído por células malignas e por outros componentes celulares e não-celulares ^{8, 51}.

Os componentes não celulares do MAT incluem a matriz extracelular, exossomos e a composição físico-química do tumor. A matriz extracelular (MEC) é constituída por colágeno, fibronectina, elastina, tenascina e laminina, produzidos principalmente por fibroblastos associados ao câncer. A MEC compõe boa parte dos tumores sólidos e oferece suporte biomecânico para as células, além de atuar como reservatório de citocinas e fatores de crescimento, como VEGF e TGF- β , que são liberados a partir da degradação da MEC. A remodelação da MEC é uma etapa crítica para o processo de invasão e metástase e é

promovida principalmente pelas enzimas metaloproteinases de matriz (MMP, do inglês *matrix metalloproteinases*). O aumento da rigidez da MEC devido à alta produção de seus constituintes, principalmente o colágeno, é capaz de promover a ativação de vias oncogênicas, como PI3K, assim como inibir genes supressores de tumor e promover a ativação de fibroblastos associados ao câncer ^{51, 52}.

Exossomos são microvesículas extracelulares liberadas por células tumorais e que promovem a sinalização célula-célula no MAT. A composição dos exossomos é semelhante à da célula de origem, incluindo proteínas, RNA, DNA e lipídeos ⁵¹. Exossomos promovem a progressão tumoral de acordo com a molécula sinalizadora que carregam, mas de maneira geral, podem promover crescimento tumoral, angiogênese, resistência terapêutica e metástase. Exossomos também atuam na sinalização à distância, preparando outros órgãos para o recebimento de células metastáticas ⁵³. Fibroblastos associados ao câncer também produzem exossomos, os quais podem conter moléculas oncogênicas, como micro-RNAs, ou fatores de crescimento, como o TGF- β , para auxiliar na progressão tumoral ⁵⁴. Exossomos também podem atuar como veículos de antígenos associados ao câncer, os quais podem ser absorvidos por células apresentadoras de antígenos, levando à ativação da resposta imunológica antitumoral. Por outro lado, exossomos também podem promover a apoptose de linfócitos T CD8, inibir a proliferação de linfócitos T CD4 e ampliar a imunossupressão promovida por linfócitos T regulatórios ⁵⁵.

A composição físico-química encontra-se desbalanceada em tumores e o meio encontra-se frequentemente ácido, principalmente como consequência da glicólise aeróbica e alta produção de ácido láctico. O pH ácido é também mantido pela ineficiência da vascularização tumoral. Além disso, a proliferação celular incontrolada cria um MAT pobre em oxigênio. A hipóxia é um acelerador importante da sobrevivência e progressão tumoral. Dentre as consequências da hipóxia, destaca-se o escape da vigilância imunológica devido ao recrutamento de células

imunossupressoras, como linfócitos T regulatórios, ao aumento da expressão de receptores para os pontos de restrição imunológica nas superfícies das células tumorais, e à inibição de células imuno efetoras, como linfócitos T citotóxicos, células dendríticas e células NK ⁵⁵.

Dos componentes celulares do MAT destacam-se os fibroblastos associados ao câncer e as células do sistema imunológico. Fibroblastos associados ao câncer (FACs) constituem as células mais abundantes no MAT, e correspondem a fibroblastos com estado ativado, de morfologia alongada e fenótipo secretor pró-tumoral. FACs originam-se principalmente de fibroblastos residentes no MAT, mas outras células progenitoras incluem pericitos, células endoteliais, células epiteliais, adipócitos e células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. O secretoma dos FACs inclui uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, quimiocinas, fatores de crescimento, como TGF- β , proteases, como MMPs, e exossomos, os quais atuam estimulando a proliferação celular, angiogênese, migração/invasão celular e supressão do sistema imunológico antitumoral ^{52, 54}. No CEB, FACs exibem um fenótipo miofibroblástico marcado pelo aumento da expressão da proteína alfa-sma, cuja expressão exhibe associação com a piora da sobrevida geral e livre de recorrência ⁵⁶.

As células imunológicas compreendem um grupo heterogêneo de células com contribuições distintas na progressão tumoral. Destacam-se os macrófagos, células natural killers (NK), células apresentadoras de antígenos, células mieloide supressoras, linfócitos e neutrófilos.

Os macrófagos associados ao câncer (MAC) constituem grande parte da população imune no MAT, cuja atividade pode ser anti ou pró-tumoral, a depender do fenótipo assumido. Os fenótipos M1 e M2 representam os dois extremos de polarização de macrófagos, e MACs podem alterar sua polarização conforme o ambiente, ou ainda existir em estados intermediários. O fenótipo tipo-M1 é considerado antitumoral devido a secreção de citocinas pró-inflamatórias e ativação da resposta imune antitumoral. Por outro lado, o fenótipo tipo-M2 é considerado pró-

tumoral por secretar citocinas e fatores de crescimento anti-inflamatórios, como IL-10 e TGF- β , e promover a supressão da resposta imunológica antitumoral e progressão tumoral ^{52, 54}. Em CEB, a alta expressão de marcadores para MAC demonstra uma associação com a piora da sobrevida geral e livre de doença, tanto em associação ao pan-marcador CD68, quanto em associação ao marcador de fenótipo tipo-M2 CD163 ⁵⁷.

Células NK são linfócitos CD3- que fazem parte do sistema imune inato e atuam reconhecendo células infectadas por vírus e células tumorais. Células NK desempenham citotoxicidade direta sobre as células por meio da produção de citocinas imunomodulatórias, como interferon gama e fator de necrose tumoral, mas podem atuar como células apresentadoras de antígeno para ativar linfócitos T ⁵⁸. Sua ação citotóxica não depende de sensibilização prévia, como em linfócitos T, mas sim da ativação de receptores presentes na superfície da membrana celular que reconhecem receptores de membrana da célula alvo alterada por infecção viral ou malignização. Entretanto, há uma subpopulação de células NK que compartilha marcadores de superfície e características com linfócitos T, as quais atuam sob sensibilização prévia e podem desenvolver memória antígeno-específica ^{52, 54}. Células NK podem atuar no MAT, mas são mais efetivas para reconhecer células malignas circulando na corrente sanguínea ⁵¹. No MAT, a ação citotóxica de células NK encontra-se frequentemente inibida pela sinalização dos pontos de restrição imunológico ⁵⁸, e no CEB, a elevada infiltração de células NK CD57+ está associada à melhora da sobrevida geral ^{57, 59}.

Células apresentadoras de antígeno são essenciais para o reconhecimento de antígenos e para a ativação de linfócitos T. Fazem parte desse grupo as células dendríticas, células de Langerhans e macrófagos. As células dendríticas são subdivididas em células dendríticas clássicas, células dendríticas plasmocitoides e células dendríticas derivadas de monócitos, todas com capacidade de apresentação de antígenos para linfócitos T, mas com peculiaridades

específicas que justificam a subclassificação ⁶⁰. Por exemplo, células dendríticas clássicas podem ser do tipo I, a qual é capaz de realizar a apresentação cruzada de antígenos via complexo principal de histocompatibilidade tipo 1 (MHC-I, do inglês *major histocompatibility complex*) para linfócitos T CD8+, enquanto células do tipo II apresentam antígenos via MHC-II para linfócitos T CD4+. As células de Langerhans, por sua vez, são macrófagos especializados com características de células dendríticas, os quais residem em mucosas, como a mucosa oral, onde exercem sua função de manutenção da homeostase epitelial e reconhecimento de patógenos invasores ou danos à integridade da barreira epitelial. Diante do estímulo, células de Langerhans migram para os linfonodos e ativam linfócitos T virgens. A presença de células dendríticas maduras e ativas no MAT está associada à ativação da resposta imune antitumoral e recrutamento de células efetoras para o MAT ⁶¹. No CEB, ainda não há conclusões definitivas a respeito do valor prognóstico de células dendríticas, uma vez que os estudos disponíveis se baseiam sobretudo na identificação imuno-histoquímica com apenas um marcador, sendo que a diversidade fenotípica das células dendríticas demanda uma combinação de marcadores imuno-histoquímicos ou mesmo outras técnicas de estudo, como imunofluorescência ⁵⁹.

As células mieloides supressoras (MDSC, do inglês *myeloid-derived suppressor cells*) compreendem um grupo heterogêneo de células imunossupressoras imaturas em variados estágios de mielopoiese. Esse grupo pode ser subdividido conforme sua morfologia em células mieloides supressoras granulocíticas e células mieloides supressoras monocíticas. MDSC são induzidas por fatores liberados pelas células tumorais, como o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), IL-6 e VEGF. A ação imunossupressora resulta da alta produção de óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico sintase induzível, arginase-I e da expressão de ligantes para os pontos de restrição imunológico, como PD-L1, sendo esse último responsável por inibir a ativação e proliferação de linfócitos T. Outras

ações pró-tumorais das MDSCs incluem o estímulo à angiogênese e degradação da MEC, via MMP-9 e VEGF ^{52, 54}. No CEB, a alta concentração sanguínea de MDSC polimorfonucleares foi associada ao estágio clínico avançado, presença de metástase para linfonodos e alta taxa de recorrência ⁶². Além disso, a expressão de marcadores sugestivos de MDSC, CD33 e CD11b, em displasias orais, exibiu associação com a transformação maligna para CEB ⁶³.

Os linfócitos T compreendem um grupo de células que diferem entre si de acordo com o tipo de receptor de célula T (TCR, do inglês *T cell receptor*), os quais reconhecem antígenos diferentes e, portanto, são responsáveis por mecanismos imunológicos distintos. Os linfócitos T CD8⁺ reconhecem antígenos de superfície celular associados às moléculas de MHC-I presentes em células alteradas por vírus ou malignidade. Sua ação efetora consiste em induzir a apoptose da célula alvo, principalmente via perforina e granzima ⁵¹. Mais detalhes sobre o mecanismo de ação desse tipo celular são apresentados em seção separada (Seção 4.5).

Linfócitos T CD4 são considerados auxiliares por não exercerem citotoxicidade direta sobre as células, mas são essenciais para a proliferação, ativação, diferenciação e memória de linfócitos T CD8. Devido as diversidades funcionais, linfócitos T CD4 são subdivididos em T auxiliares (Th, do inglês *T helper*) 1 (Th1), Th2, Th9, Th17, T folicular e T regulatório. De maneira geral, linfócitos T CD4 reconhecem antígenos associados ao MHC-II apresentados na superfície de células apresentadoras de antígeno. O tipo de sinalização evocada por TCR, receptores co-estimulatórios acionados e citocinas presentes no meio determinarão o subtipo funcional do linfócito T CD4. De maneira geral, linfócitos Th1, Th9 e T foliculares são antitumorais, enquanto linfócitos Th2 e T reguladores são imunossupressores da resposta antitumoral e atuam a favor da progressão maligna. Por outro lado, a ação de Th17 é controversa e pode atuar nos dois sentidos ⁶⁴. Linfócitos T regulatórios exercem ação imunossupressora por meio da expressão de citocinas,

como TGF- β e IL-10, ou então por promoverem sinalização co-inibitória em linfócitos T CD8⁶⁴. Em CEB, o valor prognóstico de linfócitos T regulatórios é controverso, pois apesar de a maioria da literatura disponível associá-los a redução da sobrevida, alguns estudos reportam associação com o aumento da sobrevida, ou então nenhuma associação⁶⁵.

Linfócitos T CD4 são essenciais para a ativação de linfócitos B e sua conversão para plasmócitos, entretanto, a função desses dois tipos celulares no MAT permanece pouco explorada em relação aos linfócitos T. De maneira geral, a infiltração do MAT por linfócitos B e plasmócitos é frequentemente associada com o aumento da sobrevida em diversos cânceres⁶⁶, incluindo CEB^{67, 68}. Linfócitos B poderiam contribuir com a resposta imunológica antitumoral por meio de citocinas, como IL-2 e interferon gama, por meio da apresentação de antígenos para linfócitos T, ou ainda pela produção de anticorpos específicos para antígenos tumorais. Por outro lado, linfócitos B podem ser polarizados para um fenótipo imunossupressor, conhecido como B regulador, o qual poderia atuar inibindo a ativação de linfócitos T CD8 por meio da produção de citocinas imunossupressoras, como TGF- β , e pelo recrutamento de linfócitos T regulatórios para o MAT⁶⁶.

Neutrófilos são as células mais abundantes da circulação sanguínea e representam a primeira linha de defesa do organismo em resposta às infecções e injúrias teciduais. Neutrófilos associados ao câncer assim como macrófagos, podem ser polarizados para fenótipos pró e antitumorais⁵¹. Mais detalhes sobre essas células são fornecidos na seção 4.4.

Diante da importância dos constituintes do MAT para a progressão do câncer, Mesker et al., 2007 propuseram que a alteração da proporção entre estroma e parênquima tumoral poderia ser um indicador histopatológico de progressão maligna. Diante disso, os autores calcularam a porcentagem de tumor em relação ao estroma em carcinomas do cólon utilizando lâminas coradas em H&E. Observou-se

que tumores constituídos por mais de 50% de estroma exibiam redução da sobrevida geral e livre de recorrência em relação à tumores com menos de 50% de estroma ⁶⁹. Mais recentemente, uma meta-análise demonstrou que tumores sólidos ricos em estroma apresentam redução da sobrevida geral e livre de recorrência, logo, a análise da proporção tumor-estroma (TSR, do inglês *tumor stroma ratio*) poderia ser considerada na prática clínica como indicador de prognóstico, principalmente devido a possibilidade de ser realizada em lâminas de H&E ⁷⁰. No CEB, desde 2018, ao menos 8 estudos foram publicados sobre a associação entre TSR e sobrevida, e em todos reportou-se que tumores ricos em estroma (>50%) apresentaram redução significativa do tempo de sobrevida geral, específica para o câncer e livre de recorrência, em comparação com tumores pobres em estroma (<50%) ⁷¹⁻⁷⁸.

4.4 NEUTRÓFILOS ASSOCIADOS AO CÂNCER

Neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue e pertencentes ao sistema imune inato. Constituem as primeiras células a chegar aos tecidos, sendo atraídos por quimiocinas e ativados por produtos bacterianos, quimiocinas e citocinas ⁷⁹. Uma vez ativados, os neutrófilos agem principalmente por fagocitose, degranulação e por meio da liberação de armadilhas extracelulares (NETs, do inglês *neutrophils extracellular traps*) ¹³. NETs são estruturas extracelulares em rede compostas de cromatina descondensada e contendo proteínas citosólicas e granulares dos neutrófilos, com a função de neutralizar à distância bactérias, fungos, vírus e parasitas ⁸⁰. Os grânulos neutrofílicos pertencem a três classes: (1) primários ou azurófilos, os quais contêm mieloperoxidase, defensinas, elastase neutrofílica, proteína de aumento da permeabilidade bacteriana e catepsina G; (2) secundários, os quais contêm proteínas exclusivas dos neutrófilos, como a lactoferrina; (3) terciários, os quais contêm proteinases e gelatinases, como a MMP-9 ⁷⁹.

Ao longo do processo de maturação, neutrófilos adquirem grânulos citoplasmáticos havendo o aumento gradual da densidade

celular. Os grânulos primários surgem na fase inicial, seguidos pelos secundários, e os grânulos terciários são sintetizados na fase final de desenvolvimento. Devido a granulação, neutrófilos maduros são observados na porção de alta densidade do sangue, quando este é submetido à centrifugação. O processo de centrifugação do sangue, juntamente com a solução Ficoll-Hypaque, resulta na formação de três camadas no tubo de centrífuga: uma inferior de alta densidade, contendo os elementos figurados do sangue que se associam à solução de Ficoll; uma intermediária de baixa densidade, contendo células mononucleares; e uma superior contendo o plasma sanguíneo. Em pacientes saudáveis, os neutrófilos são encontrados na fração de alta densidade (neutrófilos de alta densidade, NAD). Entretanto, em pacientes oncológicos há uma rápida mobilização de neutrófilos da medula óssea em resposta ao aumento da produção tumoral do fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF, do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*) e GM-CSF, o que resulta na liberação de neutrófilos maduros e imaturos para a corrente sanguínea. Por esta razão, pacientes oncológicos apresentam acúmulo de neutrófilos imaturos e de baixa granulação na fração de baixa densidade do sangue (Neutrófilos de baixa densidade, NBD) ⁸¹.

Enquanto NADs exibem fenótipo maduro, NBDs podem apresentar morfologia tanto madura quanto imatura. NBD de morfologia madura são encontrados na fração de baixa densidade devido à ativação e degranulação de NAD, resultando na redução da densidade celular. Em contrapartida, NBD de morfologia imatura apresentam densidade celular reduzida devido à ausência de maturação e aquisição de grânulos citoplasmáticos. Portanto, a presença de NBD ocorre em resposta a um estímulo (câncer, inflamação aguda) que leva a mobilização de neutrófilos imaturos ou à ativação/degranulação de neutrófilos maduros, sendo rara a observação destas células em indivíduos saudáveis ⁸¹.

A separação entre neutrófilos de baixa e alta densidade é normalmente feita por meio do gradiente de diferença de densidade. Entretanto, marcadores de membrana permitem a diferenciação entre as diferentes subpopulações de neutrófilos. Marcadores de maturidade (CD66b, CD11b, CD15, CD16, CD10) são encontrados principalmente em NADs, entretanto, também podem ser observados em NBD resultantes da degranulação. Os marcadores CD66b e CD11b são encontrados na membrana de vesículas secretórias e grânulos citoplasmáticos de neutrófilos, sendo, portanto, a intensidade de marcação destas proteínas um bom indicador do estado de ativação e degranulação de neutrófilos ⁸².

Além das diferenças de morfologia e estágios de maturação, NAD e NBD também desempenham papéis opostos no câncer. NADs exibem elevada expressão de quimiocinas e receptores, como CXCL1, CXCR2 e CXCR6/2L, e elevada produção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, NADs apresentam elevada citotoxicidade direcionada às células tumorais, além de alta capacidade fagocítica. Por outro lado, NBDs exibem reduzida expressão de quimiocinas inflamatórias e receptores, como CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL2, CXCL10, CXCR2, CXCR5 e CXCL6/2L. Além disso, NBDs exibem redução da citotoxicidade direcionada às células tumorais, supressão da proliferação de linfócitos T citotóxicos, redução da capacidade fagocítica e tempo de vida prolongado em resposta ao estímulo das células tumorais ^{82, 83}.

Atualmente, há uma discussão a respeito da relação entre NBD e as MDSC. MDSC compreendem uma variedade de células mieloides imaturas com capacidade imunossupressora, as quais podem pertencer à dois grupos, as monocíticas (M-MDSC) e granulocíticas (G-MDSC). No câncer, há a expansão de MDSC na medula óssea, no sangue e no ambiente tumoral, sendo observada uma associação entre este tipo celular e a piora do prognóstico. Acredita-se que as G-MDSC correspondam a um subtipo de neutrófilos, devido à morfologia e função semelhantes. Por um lado, neutrófilos são identificados por um painel de

marcadores que inclui CD14⁻/CD15⁺/CD66b⁺/CD16⁺. Por outro lado, a definição de MDSC requer um painel de marcadores mais complexo, o qual inclui CD11b, CD14, CD15, CD66b, HLADR e CD33, sendo que G-MDSC são definidas pela combinação CD14⁻/CD15⁺/CD66b⁺/CD16⁺/CD11b⁺/CD33⁺/HLA-DR^{neg}, havendo uma sobreposição entre essa combinação de marcadores e àquela usada para neutrófilos. Portanto, G-MDSC poderiam de fato corresponder a uma subpopulação de neutrófilos imaturos ⁸².

A observação de neutrófilos infiltrando o estroma de diversos tipos de tumores malignos chamou a atenção dos pesquisadores para o papel destas células no câncer ^{11, 15, 84, 85}. O recrutamento de neutrófilos para o ambiente tumoral ocorre em resposta ao gradiente quimiotático criado por fatores secretados pelas células malignas e pelo estroma tumoral. Os fatores de crescimento G-CSF e GM-CSF são sintetizados pelas células tumorais e estimulam a produção de células mieloides na medula óssea, aumentando o número de progenitores neutrofilicos. Esse processo associado ao aumento da produção tumoral de quimiocinas, como CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6 e CXL8 (IL-8), resultam na liberação de neutrófilos, maduros e imaturos, da medula óssea para a corrente sanguínea. Após a liberação na corrente sanguínea, receptores de adesão celular expressos na membrana dos neutrófilos, como o receptor de quimiocina CXCR2, e receptores expressos na membrana de células endoteliais, como ICAM-1 e PECAM-1, irão mediar o processo de rolamento, adesão e transmigração de neutrófilos do interior do vaso sanguíneo para o microambiente tumoral ⁸².

Neutrófilos são células heterogêneas e seu fenótipo é amplamente influenciado pelas características específicas do tecido no qual se encontram, como moléculas de superfície, citocinas, quimiocinas e características vasculares. Neutrófilos também passam por alterações do seu fenótipo conforme envelhecem, sendo esse um processo que se inicia logo após sua saída da medula óssea. As condições específicas criadas por estados de doenças, como o câncer, também influenciam o

fenótipo neutrofílico, e, em decorrência disso, neutrófilos associados ao câncer (NAC) podem exibir diferentes fenótipos que podem atuar a favor ou contra a progressão tumoral ⁸⁶.

Neutrófilos associados à progressão tumoral exibem um perfil secretor com elevada expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias, como TNF- α , CCL2, CCL5, VEGF, MMP-9, aumento da produção de arginase I e de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e redução da expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 ⁸². Efeitos pró-tumorais dos NACs podem ser exercidos diretamente sobre as células tumorais, como estímulo à proliferação celular, via elastase neutrofílica, e potencialização da instabilidade genômica, via liberação de espécies reativas de oxigênio ⁸⁶. No CEB, a exposição de linhagens celulares à neutrófilos isolados do sangue de pacientes saudáveis promoveu a proliferação, invasão, migração e ativação da TEM em células malignas por meio da ativação da via JAK2/STAT3 ⁸⁷, e por meio da estimulação por TGF- β e IL-17A ⁸⁸. Em contrapartida, células tumorais também alteram diretamente a atividade de neutrófilos e estimulam a secreção de fatores pró-tumorais, como MMP-9, aumentam a sobrevivência celular dos neutrófilos no MAT, por meio de fatores como GM-CSF, interferons, lipopolissacarídeos e TNF- α ⁸⁹, e estimulam a liberação de NETs ⁹⁰. A formação de NETs no MAT é estimulada por citocinas, como IL-8, por exossomos e plaquetas. De maneira geral, NETs atuam na progressão tumoral por promoverem a proliferação celular, imunossupressão da resposta antitumoral, ativação de TEM, aumento da permeabilidade vascular e metástase ⁹¹. NACs também atuam sobre outros elementos do MAT e promovem a progressão tumoral de maneira indireta. A secreção de MMP-9, por exemplo, promove a degradação da MEC e facilita a invasão tecidual, além de estimular a angiogênese tumoral. NACs podem expressar ligantes para os pontos de restrição imunológica, como VISTA e PD-L1, inibindo a ativação de células efectoras, enquanto estimulam a inflamação pró-tumoral ⁸⁶. Acredita-se que exista uma sinalização cruzada entre macrófagos e neutrófilos, na qual proteínas secretadas por NACs sejam

reconhecidas por receptores de macrófagos e, em resposta, os macrófagos são ativados e passam a secretar citocinas, como IL-6 e IL-8, que promovem o recrutamento e ativação de neutrófilos pró-tumorais⁹².

Os efeitos antitumorais do NAC também podem ser diretos sobre às células malignas ou indiretos mediante a alteração do MAT. NACs exercem citotoxicidade direta por meio da produção de óxido nítrico ou via trogoptose, um mecanismo que consiste na ingestão de partes da membrana plasmática e que é mediado por anticorpos opsonizados à célula tumoral. Os efeitos citotóxicos dos NACs são controlados principalmente por vias relacionadas ao interferon gama e são potencializados pela redução da hipóxia tumoral⁸⁶. Os efeitos antitumorais indiretos resultam da interação dos NACs com a células do MAT e da ativação da resposta imune antitumoral. A secreção de proteínas, como CCL4 e alarminas, promovem a migração e maturação de células dendríticas, com a consequente ativação de células efetoras da resposta imune antitumoral, como linfócitos T CD8, linfócitos T CD4 Th1 e células NK. Finalmente, NACs também podem atuar como células apresentadoras de antígenos e promover o reconhecimento das células tumorais por linfócitos T⁹³.

Fridlender *et al.*, (2009) foram um dos primeiros grupos a demonstrar a polarização fenotípica de NACs. Em seu estudo, o grupo induziu tumores nos flancos de ratos utilizando linhagens celulares de carcinoma pulmonar e, após o bloqueio de TGF- β , observaram uma redução significativa do tamanho tumoral, a qual foi acompanhada por um aumento na infiltração de neutrófilos e linfócitos T CD8. Ao analisarem o fenótipo dos neutrófilos recrutados após o bloqueio de TGF- β , eles notaram o aumento da citotoxicidade direcionada às células tumorais, a redução na produção do imunossupressor arginase I e ativação de linfócitos T CD8. Em contrapartida, neutrófilos de ratos não tratados com o bloqueador de TGF- β apresentavam ação imunossupressora, elevada produção de arginase I e inibição de

linfócitos T CD8. Diante disso, os autores concluíram que os neutrófilos podem assumir um perfil anti ou pró-tumoral sob a influência de TGF- β , o qual pode "educar" NACs para que assumam um fenótipo pró-tumoral¹⁴.

Por outro lado, o estudo de Chen *et al.* (2012) demonstrou que a citocina IL-1 β polarizou neutrófilos para o fenótipo antitumoral. No mesmo estudo, o grupo observou que a elevada expressão de IL-1 β e a presença de neutrófilos antitumorais estavam associadas à melhora da sobrevida geral e livre de doença de pacientes com carcinoma epidermoide de nasofaringe⁸⁴.

No CEB, Caldeira *et al.* (2017) isolaram neutrófilos sanguíneos e observaram alta expressão dos imunossupressores arginase I e IL-10, além de baixa expressão da citocina antitumoral TNF. Além disso, pacientes com baixa porcentagem sanguínea de neutrófilos apresentavam melhor prognóstico⁹⁴. Analisando esses achados com aqueles de Fridlender *et al.* (2009), poderia ser extrapolado que os neutrófilos isolados por Caldeira *et al.* (2017) apresentavam o fenótipo pró-tumoral, com base na elevada produção de imunossupressores e no impacto negativo que estas células exerceram no prognóstico de pacientes com CEB.

Diante da importância dos NACs no MAT, seria razoável afirmar que a análise da quantidade e atividade de NACs são potenciais marcadores de prognóstico em pacientes com CEB, com a possibilidade de análises a partir do sangue periférico, saliva e amostras teciduais de tumores.

A saliva, por exemplo, pode ser usada como material para identificar proteínas secretadas por neutrófilos, como a elastase neutrofílica⁹⁵, citocinas pró-inflamatórias associadas a função pró-tumoral de neutrófilos, como IL-8 ou IL-6⁹⁶, e para a quantificação de neutrófilos, os quais encontram-se elevados na saliva de pacientes com CEB em relação à pacientes saudáveis e com doença periodontal⁹⁷. No

sangue periférico, o aumento de neutrófilos foi associado à redução da sobrevida geral, específica para câncer e livre de recorrência ^{98, 99}. No tumor, a relação da infiltração de NACs com o prognóstico é mais controversa, havendo estudos que suportam ¹⁰⁰ e estudos que não suportam tal associação ^{97, 101, 102}. É importante ressaltar que a região tumoral analisada, se no centro ou frente de invasão tumoral, ou então o parênquima ou o estroma tumoral, é um fator importante para levar-se em consideração na análise da infiltração tumoral de NACs ou mesmo outras células imunológicas. A alta concentração de células e citocinas inflamatórias no centro do tumor e em proximidade das células tumorais cria oportunidade para a ativação da resposta imune antitumoral, logo, tumores inflamados apresentam potencial de resposta ao tratamento imunoterápico em relação à tumores imunologicamente desertos ¹⁰³. Ainda assim, dos estudos disponíveis para CEB, apenas Zhou et al., 2019 realizaram a análise comparativa entre a infiltração de NACs no centro do tumor e na frente de invasão ¹⁰¹.

Segundo os dados de uma meta-análise de 2014 sobre o impacto de NACs em diversos tipos de tumores sólidos, poucos estudos realizaram uma análise compartimentalizada dos neutrófilos, e a maioria dos estudos analisou NACs intratumorais, os quais foram os únicos associados à redução do tempo de sobrevida geral e livre de recorrência. Os resultados podem indicar a importância da ação dos neutrófilos em proximidade das células tumorais, entretanto, ainda há necessidade de estudos que façam a análise detalhada e comparativa entre as diferentes regiões tumorais no CEB ¹¹.

4.5 LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS ASSOCIADOS AO CÂNCER

Os linfócitos T são células do sistema imune adaptativo, derivadas de progenitores linfoides da medula óssea que se diferenciam no timo. De maneira geral, a diferenciação é caracterizada pelo tipo de receptores de membrana presente, se CD4 ou CD8. Linfócitos T que expressam a molécula CD4 são chamados de auxiliares, cuja função consiste basicamente em orquestrar a resposta imune, exercendo

influência sobre outras células. Por outro lado, linfócitos T que expressam a molécula CD8 são chamados de citotóxicos, uma vez que atuam induzindo apoptose em células infectadas por vírus e células tumorais ¹⁰⁴.

Os linfócitos T citotóxicos podem eliminar as células tumorais por meio de duas vias básicas. A primeira via é dependente da exocitose de grânulos contendo proteínas como as perforinas e granzimas. A segunda via envolve a ligação direta de receptores de morte celular presentes na membrana celular dos linfócitos, como Fas e TRAIL, aos receptores de membrana da célula-alvo. Embora as duas vias possam ocorrer em linfócitos T citotóxicos, a via de exocitose de grânulos é a predominante ¹⁰⁵.

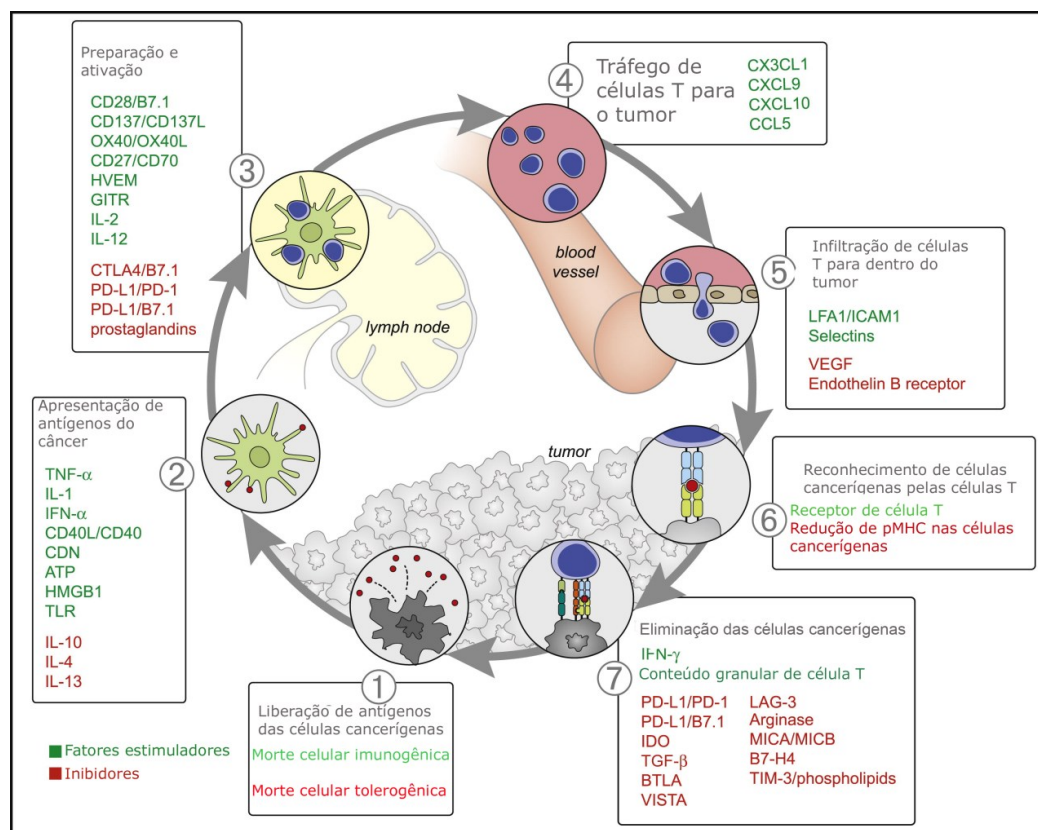
A via de apoptose dependente de grânulos inicia-se após a ativação de linfócitos T citotóxicos, os quais passam a expressar os genes para a produção de grânulos. Após o reconhecimento da célula-alvo via TCR, os grânulos são orientados para o sítio citoplasmático de contato com a célula-alvo e então liberados para a região extracelular. Após a exocitose dos grânulos, moléculas de perforina se polimerizam na presença de íons cálcio para formar uma estrutura em anel contendo um poro central, a qual é então inserida na membrana plasmática da célula-alvo. A entrada desta estrutura na membrana citoplasmática gera um sinal de reparo na célula-alvo, o qual resulta na endocitose do polímero de perforina e membrana citoplasmática ao redor. Nesse momento, moléculas de granzima nas proximidades também são endocitadas e liberadas no interior da célula-alvo, onde iniciam os sinais apoptóticos. Outro possível mecanismo de entrada de granzima na célula-alvo ocorreria de maneira independente de perforina, via receptor de manose-6-fosfato, entretanto, a relevância deste mecanismo para a atividade efetora do linfócito T citotóxico ainda não é conhecida. Uma vez no citoplasma celular, as granzimas se deslocam até o núcleo e iniciam um processo de clivagem de diversas proteínas envolvidas diretamente ou não na fragmentação do DNA. Entre estas, encontra-se o

grupo das prócaspases (como por exemplo, prócaspase 2, 3, 7, 8, 9, e 10) as quais servem de substrato para granzima B. O sinal apoptótico culmina na clivagem de prócaspase-3 em sua forma ativa caspase-3, que por sua vez cliva e ativa a nuclease DNase ativada por caspase, responsável pela fragmentação da molécula de DNA e consequente morte celular ^{105, 106}.

A infiltração de linfócitos T no estroma tumoral resulta da liberação de antígenos pelas células malignas, os quais são apresentados aos linfócitos T ingênuos nos linfonodos. Linfócitos T ativados dão origem às células efetoras que logo passam a ser encontradas no sangue, órgãos linfoides, tecidos e tumores. Caso o estímulo antigênico permaneça, as células T passam a exibir um perfil de exaustão marcado pela perda da função efetora e expressão de receptores inibitórios, como o receptor de morte programada (PD-1) e seus ligantes (PDL-1 e PDL-2), e o receptor CTL4 e seus ligantes CD80 e CD86 ^{103, 107}.

As etapas de reconhecimento, apresentação de antígeno, ativação e migração de células T ao ambiente tumoral correspondem ao ciclo imunológico do câncer e culminam na eliminação das células malignas. No câncer, sinais anti-imunogênicos comprometem o funcionamento desse ciclo, podendo haver ausência de apresentação ou reconhecimento de antígenos associados às células malignas, o que pode gerar um ambiente de tolerância imunológica. Além disso, as células T podem ser impedidas de chegar ao tumor, ou, quando o conseguem, são inibidas devido a presença de elementos imunossupressores no tumor ¹². A **figura 4** ilustra as principais etapas do ciclo imunológico do câncer e quais as principais moléculas que podem inibir ou estimular o processo.

Figura 4: Ciclo imunológico do câncer: etapas e fatores que estimulam e inibem sua progressão.



Na imagem, palavras destacadas em verde indicam moléculas que estimulam a progressão do ciclo imunológico do câncer e palavras destacadas em vermelho indicam moléculas que inibem a progressão do ciclo imunológico do câncer.

IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; IFN, interferon; CDN, dinucleotídeo cíclico; ATP, adenosina trifosfato; HMGB1, proteína do grupo de alta mobilidade B1; TLR, receptor Toll-like; HVEM, mediador de entrada do herpes vírus; GITR, gene relacionado à família do receptor de TNF induzido por glicocorticoides; CTLA4, antígeno 4 de linfócito T citotóxico; PD-1, receptor de morte programada; PD-L1, ligante de morte programada 1; CXCL/CCL, ligante de quimiocina; LFA1, antígeno associado a função de linfócito 1; ICAM1, molécula de adesão intracelular 1; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; IDO, indoleamina 2,3-dioxigenase; TGF, fator de crescimento transformador; BTLA, atenuador de linfócito B e T; VISTA, V-domínio Ig supressor da ativação de linfócitos; LAG-3, gene 3 da ativação de linfócitos; MIC, sequência de polipeptídeo relacionada ao MHC de classe; TIM-3, domínios de mucina e imunoglobulina de célula T (CHEN; MELLMAN, 2013).

Fonte: Adaptado e traduzido de Chen e Mellman, 2013.

Como ilustrado na figura acima, a função dos linfócitos T citotóxicos pode ser impedida ainda na etapa de ativação nos linfonodos ou na etapa efetora no interior do estroma tumoral. Assim, conforme a etapa bloqueada, o tumor poderia apresentar três perfis diferentes de infiltração linfocitária. O primeiro consiste em tumores inflamados, exibindo intensa infiltração de linfócitos T e outras células inflamatórias, localizadas em proximidade das ilhas tumorais. Nestes tumores é comum encontrar a expressão de proteínas associadas à exaustão

linfocitária, como PD-1/PD-L1/2, sugerindo a presença de resposta imunológica prévia, a qual deixou de ser efetiva na eliminação das células malignas. O segundo perfil é considerado imuno-excluído e exibe intensa infiltração de linfócitos T, semelhante ao perfil inflamado. Entretanto, os linfócitos T estão restritos ao estroma, sem conseguir penetrar o parênquima tumoral. Nesse caso, também há indícios de resposta antitumoral passada, no entanto, os linfócitos T foram impedidos de penetrar no parênquima tumoral para exercer sua ação. O terceiro e último perfil é chamado imuno-deserto e se apresenta com praticamente nenhuma infiltração linfocitária, seja no estroma ou parênquima tumoral. Nestes casos, não há indícios de resposta imunológica prévia devido à deficiência na geração de linfócitos T antitumorais ¹⁰³.

Clinicamente, a análise do perfil tumoral de infiltração linfocitária poderia ser usada para prever a resposta ao tratamento imunoterápico. Isso porque a maioria dos anticorpos monoclonais desenvolvidos tem por objetivo a reativação de linfócitos T citotóxicos com perfil de exaustão, com o intuito de que estes voltem a exercer ação citotóxica. Diante disso, considerando que a reativação depende de resposta imunológica prévia, os tumores inflamados seriam os mais beneficiados pelo uso de imunoterapia ¹⁰³.

Zhou *et al.* (2018) avaliaram o impacto da intensidade e da localização da infiltração de linfócitos T citotóxicos na sobrevida de pacientes com CEB. O grupo encontrou que apenas linfócitos T citotóxicos localizados no centro tumoral exerceram um impacto positivo na sobrevida dos pacientes ¹⁰. A presença de linfócitos T CD8 no interior do tumor indica ativação da resposta imunológica e geração de linfócitos efetores com ação antitumoral, conforme sugerido por Chen e Mellman (2017) ¹⁰³. Dessa maneira, estes dados ressaltam a importância de avaliar a distribuição espacial da população de linfócitos T CD8 em diferentes áreas tumorais.

Outros estudos também demonstram que a alta infiltração de linfócitos T CD8 está associada com a redução do risco de morte e aumento do tempo de sobrevivência geral de pacientes com CEB ^{108, 109}. Entretanto, há pouca evidência científica comparando a infiltração de linfócitos T CD8 entre diferentes regiões tumorais. Em outros tumores, há evidências de que a região de infiltração tumoral é importante, e que a elevada infiltração de linfócitos T CD8 no centro do tumor e no estroma tumoral está associada à redução do risco de morte ¹¹⁰. Além da localização tumoral, outras células imunológicas podem alterar a função de linfócitos T CD8, tornando interessante o estudo da relação entre diferentes tipos de células imunológicas.

Stasikowska -Kanicka *et al.* (2018) estudaram a infiltração de linfócitos T reguladores (Treg), auxiliares e citotóxicos e da proteína PDL-1 em amostras de CE do assoalho bucal. Os autores observaram que amostras de pacientes com metástase apresentavam alta infiltração de linfócitos Treg, T auxiliares e de PD-L1 em relação a amostras de pacientes sem metástase. Por outro lado, pacientes sem metástase apresentavam um número maior de linfócitos T citotóxicos ¹¹¹. O receptor de membrana PD-L1 é um ponto de restrição imunológico presente em células tumorais e do estroma, o qual ao interagir com seu receptor PD-1 em linfócitos T CD8 cria um sinal co-inibitório que bloqueia a ação citotóxica ¹¹². De maneira semelhante, linfócitos Treg são responsáveis por criar um ambiente de tolerância imunológica e inibir a ativação de linfócitos T citotóxicos, sendo considerados, portanto, pró-tumorais ¹¹³. Além disso, um estudo mostrou que uma relação de alta infiltração de linfócitos CD8 com baixa infiltração de linfócitos Treg apresentou associação com o aumento do tempo de sobrevivência de pacientes com CEB ¹¹⁴.

Outra associação que poderia ser levantada para estudo se refere a relação entre linfócitos T CD8 e neutrófilos. Conforme Fridlender *et al.* (2018), neutrófilos sob influência do imunossupressor TGF-beta inibem a ação citotóxica de linfócitos T CD8 ¹⁴. Em carcinoma de pulmão de

células não-pequenas, o número de neutrófilos é inversamente proporcional ao número de linfócitos T CD8, e a combinação de alta infiltração de neutrófilos com baixa infiltração de linfócitos T CD8 apresentou associação com a redução da sobrevida geral dos pacientes¹⁵. Dessa maneira, estudar a relação entre neutrófilos e linfócitos T CD8 poderia ser um bom indicador do balanço entre fatores imunológicos pró e antitumorais.

4.6 RAZÃO NEUTRÓFILO/LINFÓCITOS NO PROGNÓSTICO DE PACIENTE COM CÂNCER

O cálculo da razão sanguínea entre neutrófilos e linfócitos (RNL) têm se mostrado um bom indicador de prognóstico em diversos tipos de tumores sólidos. A RNL é calculada a partir de hemogramas e da divisão do valor absoluto de neutrófilos (segmentados) pelo valor absoluto de linfócitos. Dessa maneira, tem se uma razão cujo resultado é diretamente proporcional ao número de neutrófilos e inversamente proporcional ao de linfócitos, sendo que, quanto maior o valor da razão, pior é o prognóstico^{16, 17, 115}.

Uma metanálise de 2014 analisou o valor prognóstico da RNL sanguínea em pacientes com tumores sólidos malignos tratados cirurgicamente¹⁶. Foram analisados 100 artigos e 21 tipos diferentes de tumores, incluindo um artigo na cavidade bucal. O risco de morte (RR) foi 1.85 vezes maior (intervalo de confiança 95%: 1.67-1.97; $P < 0.001$) em pacientes com RNL alta (pontos de corte variando entre 3 e 5), independentemente do tipo de tumor. Além disso, a RNL elevada aumentou o risco de morte específica para câncer (RR=1.61; intervalo de confiança [IC] 95%: 1.36-1.91; $P < 0.001$), de progressão da doença (RR=1.63; IC 95%: 1.39-1.91; $P < 0.001$) e de recorrência do tumor (RR=2.27; IC 95%: 1.85-2.79; $P < 0.001$). Outros achados mostraram que a maioria dos artigos (57%) foi publicada depois de 2012, mostrando o recente interesse neste assunto, e que 74% dos estudos eram de coorte retrospectiva, sendo que os estudos retrospectivos tiveram uma tendência de reportar um efeito maior na análise de sobrevida geral

(RR= 1.88, IC 95%: 1.69-2.09) em relação a estudos prospectivos (RR= 1.58, IC 95%: 1.44-1.73) ¹⁶.

Em CEB, Muhaxheri *et al.*, (2018) observaram que para cada unidade de aumento da RNL, o risco de morte aumentou 38% (P=0.002) e o risco de recorrência da doença aumentou 34% (P=0.002) ¹¹⁶.

De acordo com Chen *et al.*, (2017), uma RNL acima de 3.6 apresentou maior risco de morte em relação à RNL menor do que 1.94 (RR=1.76; IC 95%: 1.21-2.55). Além disso, pacientes com RNL elevada (>3.6) que receberam radio quimioterapia pós-operatória apresentaram redução de quase 50% do risco de morte em relação à pacientes com RNL elevada sem radio quimioterapia pós-operatória (RR=0.49; IC 95%: 0.26-0.92). Diante disso, o uso da RNL poderia ser útil na identificação de pacientes com pior prognóstico e que poderiam se beneficiar do tratamento radio quimioterápico pós-operatório ¹¹⁷.

Nakashima *et al.*, (2016) observaram que pacientes com CEB e RNL acima de 2.7 apresentam menor tempo de sobrevida em relação à pacientes com RNL abaixo de 2.7 (RNL>2.7: 36.5 meses; IC 95%: 27.6–45.5 vs RNL<2.7: 46.8 meses, IC 95%: 35.0–58.7; P=0.021). Além disso, foi observado que a maioria dos casos de tumores com resposta patológica pobre ou parcial ao tratamento radio quimioterápico, apresentava RNL>2.7. De acordo com os autores, tal achado sugere que a RNL poderia estar associada ao comportamento biológico das células malignas, especificamente à resistência tumoral ao tratamento radio quimioterápico pré-operatório. Por fim, os autores também observaram uma fraca correlação positiva entre o valor RNL e a concentração sérica de IL-6, sugerindo a regulação da resposta imunológica sistêmica de pacientes com CEB ($r=0.33$; P=0.047) ¹¹⁸.

Acharya *et al.*, (2017) reportaram que pacientes em pacientes com CEB a ocorrência de metástase não demonstrou associação com o valor da RNL, enquanto a razão entre a contagem de plaquetas e linfócitos (RPL) foi significativamente maior em pacientes com metástase para

linfonodos. De acordo com os autores, o valor de RNL não parece ser um fator associado com a ocorrência de metástase para linfonodos ¹¹⁹.

Rachidi *et al.*, (2016) demonstram uma correlação negativa entre o número de neutrófilos e linfócitos sanguíneos, e que, para cada unidade de aumento da RNL o risco de morte aumentou 4%. Outro achado interessante encontrado foi que o valor de RNL foi menor em tumores HPV positivos (RNL=2.73) em relação a tumores HPV negativos (RNL=4.75; P=0.039). Além disso, a associação entre a RNL e a sobrevida foi mais forte no grupo HPV positivo do que no grupo HPV negativo, sugerindo que a presença do vírus poderia alterar o poder de previsibilidade da RNL no cálculo de sobrevida ¹²⁰.

Em contrapartida, Farhan-Alania, McMahon, McMillan (2015) não observaram associação entre a RNL elevada (>5) e o tempo de sobrevida geral ou específica para câncer. Na análise multivariada, a concentração sérica elevada de proteína C reativa (>10mg/L) associada à redução dos níveis de albumina (\leq 35g/L) aumentou o risco de morte específica para câncer ¹²¹. Neste estudo, marcadores séricos proteicos da inflamação foram superiores aos marcadores celulares (RNL e RPL) na análise de sobrevida de pacientes com CEB ¹²¹. Entretanto, o ponto de corte estabelecido pelos autores para a RNL (>5) foi maior do que o ponto de corte utilizado por outros trabalhos semelhantes. O uso de um ponto de corte mais alto poderia subestimar o efeito dessa variável no prognóstico, sendo que pacientes com valores inferiores a 5, mas ainda com valores altos em relação à pacientes saudáveis ¹¹⁵, poderiam estar ainda com risco aumentado de morte ¹⁷.

Finalmente, uma meta-análise demonstrou a associação entre RNL alta e aumento do risco de morte em pacientes com CE de cabeça e pescoço (RR=1.84, IC 95%: 1.53–2.23), independentemente do ponto de corte utilizado (2-3; 3-4; >4). Além disso, pacientes com RNL alta apresentaram maior risco de recorrência da doença após o tratamento (RR=1.63, IC 95%: 1.09–2.45) e de metástase à distância (RR=1.92, IC 95%: 1.36–2.72), em relação à pacientes com RNL baixa ¹⁸.

Em relação ao ponto de corte, Cho *et al.* (2018) sugeriram um sistema de três categorias que poderiam discriminar entre diferentes riscos de morte para CE de cabeça e pescoço. A primeira categoria (RNL <2) seria considerada como valor "normal" de referência. Na segunda categoria, (>2 RNL <6) o risco de morte seria 1.8 vezes (IC 95%: 1.13–2.86) maior em relação à categoria de referência (RNL<2). Por fim, na terceira categoria (RNL ≥6) o risco de morte seria 3.92 vezes (IC 95%: 1.89–8.12) maior em relação à categoria de referência (RNL<2)

19.

Assim como a RNL sanguínea, a RNL intratumoral (RNLI) também apresenta evidência de relação com o prognóstico de pacientes com câncer. Em carcinoma pulmonar de células não pequenas, Ilie *et al.*, (2012) avaliaram a RNLI por meio dos marcadores imuno-histoquímicos CD66b para neutrófilos e CD8 para linfócitos T citotóxicos. Segundo os autores, RNLI ≤1 foi associada a redução do risco de morte (RR=0.70; IC 95%: 0.54-0.91), além de maior tempo decorrido até a recorrência da doença em relação a RNL >1 (RNLI≤1: 43 meses vs RNLI >1: 34 meses)¹⁵. Diante disso, avaliar a RNLI poderia ser um bom indicador do balanço imunológico pró/antitumoral. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos que tenham avaliado a RNLI em CEB.

Diante da necessidade de aprofundar o conhecimento relacionado ao estudo das características histopatológicas associadas a progressão do câncer de boca, o presente estudo é apresentado na forma de três capítulos. No primeiro capítulo, apresenta-se a análise sanguínea e intratumoral da RNL, sendo que, na análise intratumoral realizou-se um estudo quantitativo e qualitativo da distribuição tumoral de neutrófilos e linfócitos T citotóxicos. No segundo capítulo, apresenta-se uma análise das principais características histopatológicas recentemente associadas ao prognóstico de pacientes com CEB, incluindo brotamentos tumorais, profundidade de invasão, espessura tumoral, invasão perineural e linfovascular e proporção parênquima-estroma, a partir de lâminas digitalizadas contendo amostras de ressecções cirúrgicas. Finalmente, o

último capítulo contém uma análise de concordância entre ressecções cirúrgicas e biópsias incisionais diagnósticas pareadas para a análise de brotamentos tumorais, espessura tumoral e proporção parênquima-estroma tumoral.

5 CAPÍTULO 1

ANÁLISE INTRATUMORAL E SANGUÍNEA DE NEUTRÓFILOS E
LINFÓCITOS EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
BOCA

5.1 APRESENTAÇÃO

Nesse capítulo são apresentados os resultados referentes a análise imuno-histoquímica de neutrófilos CD66+ e linfócitos T CD8+, a análise da razão CD66b/CD8 intratumoral e a análise da razão neutrófilo/linfócitos sanguínea. A análise tumoral dos marcadores imuno-histoquímicos levou em consideração não apenas a quantificação das células positivas, mas a distribuição intratumoral. O objetivo foi comparar as diferentes regiões tumorais, centro do tumor e frente de invasão, assim como diferentes compartimentos tumorais, parênquima tumoral e estroma, a fim de estudar o padrão de distribuição tumoral e a relação entre os dois tipos celulares imunológicos, neutrófilos e linfócitos T CD8. Além disso, buscou-se estudar a relação da infiltração tumoral de neutrófilos CD66+ e linfócitos T CD8+ com a contagem sanguínea de segmentados e linfócitos no hemograma dos pacientes incluídos. A presente pesquisa também propõe uma metodologia de análise semi-automatizada dos marcadores imuno-histoquímicos a partir de imagens digitalizadas obtidas por meio do escaneamento das lâminas imunocoradas. Finalmente, analisou-se o impacto prognóstico dos parâmetros propostos na sobrevida geral e livre de recorrência dos pacientes. Os resultados são apresentados em formato de artigo científico conforme as normas da revista *Histopathology*, as quais foram acessadas em novembro de 2022.

5.2 ARTIGO

Title: Prognostic impact and correlation of blood and intratumoral neutrophil to lymphocyte ratio in oral squamous cell carcinoma.

Authors: Msc Andressa Fernanda Paza Miguel¹, PhD Daniella Serafin Couto Vieira², PhD Elena Riet Correa Rivero^{2*}

¹Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

²Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. E-mail:

Correspondence: Elena Riet Correa Rivero; riet.elena@gmail.com

Conflict of interest: The authors have none to declare.

Funding: This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC - Number 2021TR1460) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES – Finance Code 001).

Word count: 2915 words

ABSTRACT

Objectives To investigate the correlation between blood neutrophil to lymphocyte ratio (bNLR) and tumor CD66b-neutrophil to CD8-lymphocyte ratio (tNLR), and their prognostic impact on patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Materials and Methods: Clinicopathological parameters, including complete blood count, were retrospectively retrieved from a cohort of 46 patients with OSCC. Immunohistochemistry to CD66b (neutrophils) and CD8 (cytotoxic T cells) was performed, whole-slide images were obtained and analyzed using the Qupath software. The number of positive CD66b/mm², CD8/mm², and tNLR were calculated for different tumor regions (tumor center and invasive front) and compartments (parenchyma and stroma). Kaplan-Meier survival curves were plotted to analyze the prognostic impact of clinicopathological factors on overall survival (OS) and disease-free survival (DFS)

Results: Concerning OS, improved survival was associated with T1/T2 tumors and CD8 above 12.84 cells/mm² at the tumor center parenchyma. DFS was better for patients below 60 years old and with bNLR above 1.72. There was no correlation between blood cell count and tumor immune cell count.

Conclusion: This is the first study to investigate both blood and tumor NLR in OSCC patients. The absence of correlation between blood and tumor parameters suggests that blood cell count does not always reflect the tumor-immune response, and that tumor-derived factors are more important for shaping the tumor immune response. In addition, improved survival due to high CD8 infiltrating the parenchyma at the tumor center denotes a current or previous immune response against tumor cells.

INTRODUCTION

Tumor-promoting inflammation is known for enabling tumor characteristics that promote growth, metastasis, and immune-destruction evasion ¹. In this context, there is strong evidence supporting the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) as a prognosticator for survival in various cancers, including oral squamous cell carcinoma (OSCC) ². In head and neck cancer, multiple meta-analyses have demonstrated an association between high NLR and poor overall (OS) and disease-free survival (DFS), however, there is still conflicting results within individual studies ³⁻⁶.

Recent studies have proposed a possible link between systemic inflammation and the tumor immune response ^{7, 8}. Tumor-derived factors are able to stimulate neutrophilia (granulocyte-colony stimulating factor), recruit neutrophils into the tumor (CXCR2 ligands) ⁹, and polarize neutrophils into anti or protumor phenotypes (TGF- β , IL-1B, IL-17A, tumor hypoxia, and tumor mutational status) ^{9, 10}. Neutrophil polarization has a specific effect on T cell function, whether inhibiting or acting as antigen-presenting cells and activating cytotoxic T cells ⁹. In turn, T lymphocytes have a defined anti-cancer cytotoxicity driven by cancer-associated antigens ¹¹. Tumor infiltrating neutrophils ^{12, 13} and T lymphocytes ¹⁴ have been both associated with poor patients' survival in a variety of cancers. In the oral cavity, the prognostic impact of CD8 is still conflicting, with some studies confirming it ¹⁵⁻¹⁹ and others not ²⁰⁻²⁵, and part of the heterogeneity among studies seems to be attributed to the tumor region analyzed ¹⁴.

Given the specific effect of neutrophils on CD8 T lymphocytes and the importance of the tumor microenvironment in the polarization of neutrophils, it is relevant to study the correlation between these cells within the tumor, in addition to blood NLR. Therefore, the main goal of the present study was to investigate the correlation between blood and tumor NLR in OSCC. In addition, we tested the agreement of an automatic methodology using the Qupath software with the manual

counting of the immunohistochemical markers. Finally, clinicopathological features, blood NLR, and immunohistochemical parameters were tested as prognosticators for OS and DFS in patients with OSCC.

MATERIAL AND METHODS

Population

The present study analyzed a retrospective cohort of 171 patients with OSCC diagnosed at the authors' institution between 2013-2018. Inclusion criteria were primary OSCC, follow-up data, and primary tumor available for immunohistochemistry. Exclusion criteria were recurrent or secondary OSCC, preoperative chemo-radio therapy, and inflammatory conditions/medications which could interfere with blood cell counts. The final sample was composed by 46 patients. A single examiner collected the following clinicopathological data: age, sex, smoking/drinking habits, site, TNM stage, histopathological grade, and follow-up information. Blood neutrophil and lymphocyte counts were collected from pre-operative complete blood count tests retrieved from the clinical record, and the test with the date closest to the diagnostic/resective surgery was selected.

Follow-up data were retrieved from the clinical records in June 2020, and last up-date was December 2021. Mean follow-up time was 29.52 months (range 1-95). Clinical endpoints were overall-survival (OS) and disease-free survival (DFS), defined as the time from the date of surgery/biopsy to the date of death (OS), recurrence (DFS), or the date of last follow up.

The institutional ethical committee review board approved this study (number 17674419.9.0000.0121), and informed consent was waived because of the retrospective design, which presented no risk to the patient's well-being. Furthermore, patients' identity remained anonymous through-out the study, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Histopathological analysis

From the 46 cases included, 31 samples were obtained from surgically resected tumors and 15 samples were obtained from biopsies. When multiple blocks were available, the block containing the most invasive part of the primary tumor was chosen. Serial sections (3 μ m) were obtained, one for hematoxylin and eosin (H&E) staining, and three for immunohistochemistry. Neutrophils were detected with anti-CD66b (1:500; clone G10F5; BD Biosciences) and cytotoxic T lymphocytes with anti-CD8 (ready-to-use; Clone C8/144B; Dako, Denmark). Tumor parenchyma was determined with anti-cytokeratin antibody (1:50; clone AE1/AE3 - Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). Immunohistochemical detection was performed with the labelled polymer method (EnVision Dual Link System-HRP, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). Glass slides were scanned on Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss Microscopy) at 40x (0.11 μ m/pixel), and the images were imported to the open-source software QuPath (v.0.3.2)²⁶.

First, the *estimate stain vectors* command was used on each image to improve stain separation using color deconvolution ²⁶ (**Figure 1S- supplementary material**). To precisely determine tumor limits, cytokeratin (CK) immunostained slides were used to draw an annotation around the whole tumor limited to its borders using the *polygon* tool. In resections, the invasive margin was determined by expanding the tumor borders by 500 μ m. The invasive front (IF) was defined as an 1mm wide area centered at the tumor border, and the tumor center (TC) was the remaining area ²⁷ (**Figure 2S – supplementary material**).

Immunohistochemical analyses

For each tumor region, five fields of 1mm² were selected for analysis. Areas containing tissue necrosis and positive cells within blood vessels were excluded. In resections, five fields were selected at the IF and five at the TC (**Figure 3S – supplementary material**). In tumors with less than 2mm in thickness, only the IF was analyzed. In biopsies, only the TC was analyzed (**Table 1S- supplementary material**). Positive cells were counted in relation to the whole 1mm² field, and separately at

the tumor stroma (s) and parenchyma (p) (**Figure 4S – supplementary material**). The number of cells/mm² was calculated separately for the TC (whole field, stroma, parenchyma) and IF (whole field, stroma, parenchyma).

Calibration was performed by randomly selecting 20% of the sample, followed by counting and recounting positive cells within an interval of at least 15 days, and the intra-observer agreement was 0.98 (CD66b) and 0.979 (CD8).

Automated counting

Analysis of CD8 and CD66b was performed using the *Fast cell count* command for each 1mm² field. Positive cells were detected by separating stains using color deconvolution and identifying peaks in the sum of hematoxylin and DAB (3,3'-diaminobenzidine) channels ²⁶ (**Supplementary material**).

Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR)

Blood NLR was calculated by dividing the absolute number of segmented cells (neutrophils) by the absolute number of lymphocytes.

Tumor NLR was calculated by dividing the number of CD66b/mm² by the number of CD8/mm². This was performed for the IF and the TC separately.

Statistical analysis

Normality of quantitative variables was tested using the Shapiro-Wilk test. Non-parametric Mann-Whitney (2 groups) and Kruskal-Wallis (3 groups) were selected to analyze continuous variables, and the median and interquartile range (IQR) were selected as descriptive measures. Spearman's coefficient was used to test the correlation between continuous variables. The agreement between manual and automated counting was verified by means of the intraclass correlation coefficient (ICC), Spearman's correlation coefficient, and Bland-Altman graph. Survival curves were constructed using the Kaplan-Meier method

and log-rank test for comparison between groups. Mean survival time and 95% confidence intervals (CI) were provided. CD66b, CD8, and tumor/blood NLR were dichotomized as high and low based on the median, the 25th percentile, and the 75th percentile values ²⁸ (**Table 2S – supplementary material**). A $P \leq 0.05$ was set for statistical significance.

RESULTS

Patients' characteristics

Clinicopathological features of the sample are described in **Table 1**. Mean age was 58.58 years (range 38-90). The mean OS time of the cohort was 83.90 months (95%CI 73.42 – 94.38), and four patients died during follow-up (8.69%). Mean DFS time was 63.33 months (95% CI 49.29 – 77.37) and recurrence occurred in 13 patients (28.26%) (**Table 3S - supplementary material**). The sample's clinical stage was similarly distributed between early (39.13%) and advanced tumors (43.74%). Two patients (4.34%) presented with distant metastasis at diagnosis. Of the 46 patients included, 35 patients were treated with resective surgery, of which 19 received postoperative chemo-radiotherapy (CRT) or radiotherapy (RT) (**Table 1**). OS was significantly worse in patients treated with CRT/RT alone (**Figure 5S – supplementary material**).

Immunohistochemical results

Photomicrographs of H&E, CK, CD66b, and CD8 are presented in **Figure 1**. The median count of CD66b and CD8 per region are presented in **Tables 4S and 5S supplementary material**. There was no association between clinicopathological features and the median count of positive CD66 and CD8 cells. Different tumor regions presented a positive correlation in the count of CD66b/mm² and CD8/mm² (**Table 6S - supplementary material**). However, there was no correlation between CD8 and CD66b (**Table 6S**), and no correlation between blood and tumor immune cells (**Table 7S - supplementary material**). Median count of CD8 was significantly higher in the stroma than in the parenchyma, both at the IF ($P=0.000$) and TC ($P=0.000$), and the same result was

observed for CD66b (IF: $P=0.019$; TC: $P=0.004$). However, when comparing the IF with the TC there was not statistical difference.

Agreement between the manual and the automatic methods

The measurements of agreement between the counting methods are presented in **Table 2**. The ICC and the correlation were close to 1, which can be considered excellent ²⁹. Bland-Altman graphs demonstrated that the average of differences between the two methods were very close to zero, and most differences were below 100 cells. In addition, there was a tendency for higher bias when cell counts were higher, especially for CD66b (**Figure 2A, B**).

NLR

Blood test results were retrieved from 34 patients. The median blood NLR of the sample was 2.5 (IQR: 1.90). Blood NLR was higher in patients with smoking history than in those without smoking history ($P=0.050$) (**Table 3**).

The median tumor NLR for the IF was 0.09 (IQR: 0.38), and for the TC was 0.098 (IQR: 0.53), and there was no difference in the NLR among different regions ($P=0.990$). Clinicopathological features were not associated with tumor NLR (**Table 3**).

In the tumor, NLR at the IF was positively correlated with the NLR at the TC (**Table 8S - supplementary material**). There was no correlation between tumor and blood NLR (**Table 8S**)

Survival analysis

The survival analysis demonstrated that patients with T1/T2 had better OS than patients with T3/T4 tumors ($P=0.015$; **Figure 3A**). Patients <60 years had better DFS than did patients aged ≥ 60 years (<60: 2197.087 days; 95% CI: 1680.349- 2713.826 vs ≥ 60 : 1277.143 days; 95% CI: 635.052- 1919.234; $P=0.019$) (**Figure 3B**).

At the TC, tumor parenchyma with >12.84 CD8 cells/mm² had better OS than did tumor parenchyma with <12.84 CD8 cells/mm² (CD8 >12.84 : 2739.182 days; 95% CI: 2517.397-2960.966; vs CD8 <12.84 : 1100.400 days; 95% CI: 638.944 – 1561.856; $P=0.017$) (**Figure 3C**).

DFS was better for patients with blood NLR ≥ 1.72 than for patients with NLR <1.72 (NLR ≥ 1.72 : 2115.314 days; 95%CI: 1580.327-2650.302 vs NLR <1.72 : 1237.095 days; 95%CI: 292.909-2181.281; $P=0.045$) (**Figure 3D**). The different cutoff points assigned to dichotomize tumor NLR were not associated with OS and DFS (**Table 9S – supplementary material**).

DISCUSSION

In the present study we investigated both blood and tumor NLR in OSCC patients. Blood NLR index has been used as a proxy for the systemic balance between pro and anti-tumor immune response. We observed that high blood NLR was associated with smoking history, which is in line with the documented effect of cigarette smoke on both pro-inflammatory and immunosuppressive response³⁰.

High blood NLR has been frequently reported as an independent prognostic factor for worse OS^{8, 31}, cancer-specific survival^{7,32}, and distant metastasis probability³³ in OSCC. According to our results, blood NLR was not associated with OS, and surprisingly, high blood NLR (>1.72) was associated with better DFS. In the head and neck region, although most studies in the literature support the association between blood NLR and worse survival, some studies have failed to demonstrate the same association^{3, 34}. The combination with other systemic inflammatory markers^{31, 32}, or even the use of different neutrophil-related inflammatory indexes³⁵ could improve the prognostic performance of blood NLR.

To the best of our knowledge, this is the first study to report the tumor CD66b/CD8 ratio in OSCC. In lung and breast cancer, previous studies have demonstrated that tumor CD66b/CD8 is associated with

survival^{36, 37}. In contrast, in the present work the different cutoff points proposed for CD66b/CD8 were not associated with survival. Similarly, Caldeira et al., 2015 investigated the CD66b/CD3 ratio in OSCC and reported no association with tumor recurrence³⁸. Future research based on a bigger cohort and longer follow-up time would be needed to confirm our results.

Previous studies have demonstrated a moderate inverse correlation between stromal CD8 and blood NLR⁸, and a weak correlation between blood and tumor CD66b³⁹. In contrast, we did not observe a correlation between tumor and peripheral blood cell counts. One explanation is that we calculated blood NLR based on complete blood count and specific markers for neutrophils and cytotoxic T lymphocytes were not used. In addition, previous works have demonstrated that the tumor immune cell population does not always corresponds with the peripheral blood count. Quan et al., 2020 reported that peripheral blood exhibits more CD4 than CD8, whereas tumors presented predominance of CD8 over CD4. In addition, a local expansion of CD8 was observed, likely related to tumor-associated immune stimuli²⁰. Similarly, Fridlender et al., 2009 reported that the recruitment and polarization of neutrophils occurred in the tumor microenvironment and not within the spleen or blood of mice treated with TGF- β antibody⁴⁰. Thus, tumor-derived factors are possibly more important in defining the tumor immune-microenvironment.

At the present study, parenchyma CD8 above 12 cells/mm² at the tumor center was associated with better OS. In contrast, Lequerica-Fernandez et al., 2021 found no association between high parenchyma CD8 (24.65 cells/mm²) and survival⁴¹. While high infiltration of CD8 at the TC has been frequently associated with better OS^{16-18, 42, 43}, results for the IF are conflicting^{17, 18, 43}. Tumor distribution of immune cells is known for influencing treatment response to immunotherapy. Tumors with high infiltration of immune cells, specially at the parenchyma (immune-inflamed), are suggestive of a previous antitumor immune

response, and, thus, respond more often to immunotherapy than tumors with a paucity of immune cells ¹¹

Hendry et al., 2017 proposed a standardized methodology to assess tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors. The group recommended a separate analysis of the tumor stroma and parenchyma, and at the invasive front and tumor center ²⁷. Therefore, we performed a comprehensive analysis of different tumor regions, and it was observed that CD8 and CD66b cells/mm² were significantly higher within the tumor stroma than within tumor parenchyma (at both TC and IF), which is in accordance with the report of Gaafar et al., 2022 ⁴⁴. Moreover, previous studies have reported that CD8 infiltration is significantly higher at the IF than at the TC ^{17, 42, 43}, a result that we didn't observe. An additional observation of our study was that the density of CD8 was higher than that of CD66b, irrespective of tumor region, and the same was observed by Zhou et al., 2020 ⁴².

Tumor infiltrating neutrophils (TAN) have been significantly associated with poor outcomes in solid cancers ⁴⁵, and CD66b is frequently used as a marker for activated TANs ^{46, 47}. At the present study, CD66b count was not associated with clinicopathological features and survival, which agrees with some studies ^{42, 48}. On the other hand, there are reported associations between high CD66b and advanced tumor stage ^{49, 50} and poor cancer-related survival ⁵⁰ in OSCC. Possible heterogeneity sources are tumor regions analyzed and markers used. Like CD8, the tumor region has an impact on the prognostic capabilities of neutrophils ⁵¹. Moreover, the contrasting roles of neutrophils in cancer highlights the need for precise and even multiple biomarkers to study the prognostic impact of TANs on OSCC.

Finally, this study proposed a methodology using the Qupath software, a recently developed open-source image analysis platform, which contains a diverse set of tools for fast, robust, and reliable biomarker research ²⁶. We observed that the agreement and correlation between manual and automatic cell count was excellent. Previous

studies have also shown an excellent correlation between automatic counting using Qupath and manual counting performed by experienced pathologist in breast cancers ^{52, 53} and colon cancer ⁵⁴. In addition, we observed that the bias between methods was higher in cases with intense infiltration of positive cells. Similarly, Berben et al., 2020 noted a trend for overestimation of positive cells using Qupath's detection classifier ⁵³. Overall, our experience was that the proposed method was reliable and much faster in comparison to manual counting. Further validation using a greater cohort, and the application of a fully automated method would improve the method's reliability and efficiency.

In this study, T stage and age were the clinical features associated with survival, which agree with previous studies ⁵⁵⁻⁵⁷. However, the limited number of outcomes in the OS analysis is an important limitation of our study. In addition, there are important markers associated with neutrophil and CD8 T lymphocyte recruitment and activity in the tumor microenvironment, such as the presence of human papillomavirus, TGF- β , and expression of programmed death and its ligands, therefore, the present observations are limited by the absence of these additional analysis.

In this study we analyzed the association between blood NLR and tumor CD66b/CD8 ratio. An association between blood and tumor immune parameters was not observed, which could reflect different roles and controlling mechanisms regarding the systemic and tumor immune responses. Moreover, we performed a detailed analysis of different tumor regions and observed that high CD8 infiltrating tumors nest at the TC was associated with better survival, supporting the impact of the histological immune profile of cancer on patient's prognosis. Finally, the proposed semi-automatic methodology had an excellent agreement with the manual count, with the advantage of being much faster. The development a fully automated method would facilitate even more the discovery of multiple immunohistochemical biomarkers in OSCC samples.

REFERENCES

1. Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer discovery* 2022;**12**;31-46. doi: 10.1158/2159-8290.cd-21-1059.
2. Cupp MA, Cariolou M, Tzoulaki I, Aune D, Evangelou E, Berlanga-Taylor AJ. Neutrophil to lymphocyte ratio and cancer prognosis: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies. *BMC medicine* 2020;**18**;360. doi: 10.1186/s12916-020-01817-1.
3. Mariani P, Russo D, Maisto M *et al.* Pre-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma: Meta-analysis and trial sequential analysis. *Journal of oral pathology & medicine* 2022;**51**;39-51. doi: 10.1111/jop.13264.
4. Tham T, Bardash Y, Herman SW, Costantino PD. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a prognostic indicator in head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Head & neck* 2018;**40**;2546-2557. doi: 10.1002/hed.25324.
5. Takenaka Y, Oya R, Takemoto N, Inohara H. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma treated with immune checkpoint inhibitors: Meta-analysis. *Head & neck* 2022;**44**;1237-1245. doi: 10.1002/hed.26997.
6. Yang L, Huang Y, Zhou L, Dai Y, Hu G. High pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of poor survival prognosis in head and neck squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Head & neck* 2019;**41**;1525-1535. doi: 10.1002/hed.25583.
7. Zubair F, McMahon J, Kryklyas G, Wicks C. Systemic inflammatory response in predicting outcomes of patients undergoing curative resection for oral squamous cell carcinoma. *The British journal of oral & maxillofacial surgery* 2022;**60**;589-595. doi: 10.1016/j.bjoms.2021.10.017.
8. Ruiz-Ranz M, Lequerica-Fernández P, Rodríguez-Santamarta T *et al.* Prognostic implications of preoperative systemic inflammatory

markers in oral squamous cell carcinoma, and correlations with the local immune tumor microenvironment. *Frontiers in immunology* 2022;**13**;941351. doi: 10.3389/fimmu.2022.941351.

9. McFarlane AJ, Fercoq F, Coffelt SB, Carlin LM. Neutrophil dynamics in the tumor microenvironment. *The Journal of clinical investigation* 2021;**131**. doi: 10.1172/jci143759.

10. Yu T, Tang Q, Chen X *et al.* Tgf- β 1 and il-17a comediate the protumor phenotype of neutrophils to regulate the epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine* 2021;**50**;353-361. doi: 10.1111/jop.13122.

11. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017;**541**;321-330. doi: 10.1038/nature21349.

12. Donskov F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Seminars in cancer biology* 2013;**23**;200-207. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.02.001.

13. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B *et al.* Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 2014;**106**;dju124. doi: 10.1093/jnci/dju124.

14. Borsetto D, Tomasoni M, Payne K *et al.* Prognostic significance of cd4+ and cd8+ tumor-infiltrating lymphocytes in head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *Cancers* 2021;**13**. doi: 10.3390/cancers13040781.

15. Wongpattaraworakul W, Gibson-Corley KN, Choi A *et al.* Prognostic role of combined egfr and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. *Frontiers in oncology* 2022;**12**;885236. doi: 10.3389/fonc.2022.885236.

16. Togo M, Yokobori T, Shimizu K *et al.* Diagnostic value of (18)f-fdg-pet to predict the tumour immune status defined by tumoural pd-l1 and cd8(+)tumour-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 2020; **122**;1686-1694. doi: 10.1038/s41416-020-0820-z.

17. Caruntu A, Moraru L, Lupu M *et al.* Prognostic potential of tumor-infiltrating immune cells in resectable oral squamous cell carcinoma. *Cancers* 2021;**13**. doi: 10.3390/cancers13092268.
18. Mukherjee G, Bag S, Chakraborty P *et al.* Density of cd3+ and cd8+ cells in gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma is associated with lymph node metastases and survival. *PloS one* 2020;**15**;e0242058. doi: 10.1371/journal.pone.0242058.
19. Fang J, Li X, Ma D *et al.* Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. *BMC cancer* 2017;**17**;375. doi: 10.1186/s12885-017-3317-2.
20. Quan H, Shan Z, Liu Z *et al.* The repertoire of tumor-infiltrating lymphocytes within the microenvironment of oral squamous cell carcinoma reveals immune dysfunction. *Cancer immunology, immunotherapy* 2020;**69**;465-476. doi: 10.1007/s00262-020-02479-x.
21. Zhang B, Wu C, Zhang Z *et al.* Cxcl12 is associated with foxp3(+) tumor-infiltrating lymphocytes and affects the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncology letters* 2019;**18**;1099-1106. doi: 10.3892/ol.2019.10415.
22. Takahashi H, Sakakura K, Arisaka Y *et al.* Clinical and biological significance of pd-11 expression within the tumor microenvironment of oral squamous cell carcinoma. *Anticancer research* 2019;**39**;3039-3046. doi: 10.21873/anticanres.13437.
23. Ni YH, Zhang XX, Lu ZY *et al.* Tumor-infiltrating cd1a(+) dcs and cd8(+)/foxp3(+) ratios served as predictors for clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma patients. *Pathology oncology research* 2019. doi: 10.1007/s12253-019-00701-5.
24. Furukawa K, Kawasaki G, Naruse T, Umeda M. Prognostic significance of pretreatment lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with tongue cancer. *Anticancer research* 2019;**39**;405-412. doi: 10.21873/anticanres.13126.
25. Boxberg M, Leising L, Steiger K *et al.* Composition and clinical impact of the immunologic tumor microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Journal of immunology* 2019;**202**;278-291. doi: 10.4049/jimmunol.1800242.

26. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA *et al.* Qupath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific reports* 2017;**7**;16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.
27. Hendry S, Salgado R, Gevaert T *et al.* Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: A practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the international immunooncology biomarkers working group: Part 1: Assessing the host immune response, tils in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research. *Advances in anatomic pathology* 2017;**24**;235-251. doi: 10.1097/pap.000000000000162.
28. Ilie M, Hofman V, Ortholan C *et al.* Predictive clinical outcome of the intratumoral cd66b-positive neutrophil-to-cd8-positive t-cell ratio in patients with resectable nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012;**118**;1726-1737. doi: 10.1002/cncr.26456.
29. Cicchetti DV. Guidelines, criteria, and rules of thumb for evaluating normed and standardized assessment instruments in psychology. *Psychological assessment* 1994;**6**;284.
30. Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, Feleszko W. Tobacco smoke induces and alters immune responses in the lung triggering inflammation, allergy, asthma and other lung diseases: A mechanistic review. *International journal of environmental research and public health* 2018;**15**. doi: 10.3390/ijerph15051033.
31. Zhuang Z, Li Y, Hong Y *et al.* A novel prognostic score based on systemic inflammatory biomarkers for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral diseases* 2022;**28**;631-638. doi: 10.1111/odi.13774.
32. Wu M, Ye P, Zhang W, Zhu H, Yu H. Prognostic role of an inflammation scoring system in radical resection of oral squamous cell carcinoma. *BMC oral health* 2022;**22**;226. doi: 10.1186/s12903-022-02261-8.
33. Zanoni DK, Valero C, McGill MR *et al.* Distant metastasis in oral squamous cell carcinoma: Does the neutrophil-to-lymphocyte ratio act as a surrogate of the host immune status? *Oral oncology* 2022;**124**;105641. doi: 10.1016/j.oraloncology.2021.105641.

34. Kumarasamy C, Tiwary V, Sunil K *et al.* Prognostic utility of platelet-lymphocyte ratio, neutrophil-lymphocyte ratio and monocyte-lymphocyte ratio in head and neck cancers: A detailed prisma compliant systematic review and meta-analysis. *Cancers* 2021;**13**. doi: 10.3390/cancers13164166.
35. Song F, Cai H, Liao Y *et al.* The systemic inflammation response index predicts the survival of patients with clinical t1-2n0 oral squamous cell carcinoma. *Oral diseases* 2022;**28**;600-610. doi: 10.1111/odi.13782.
36. Tokumaru Y, Oshi M, Murthy V *et al.* Low intratumoral genetic neutrophil-to-lymphocyte ratio (nlr) is associated with favorable tumor immune microenvironment and with survival in triple negative breast cancer (tnbc). *American journal of cancer research* 2021;**11**;5743-5755. doi:
37. Ilie M, Hofman V, Ortholan C *et al.* Predictive clinical outcome of the intratumoral cd66b-positive neutrophil-to-cd8-positive t-cell ratio in patients with resectable nonsmall cell lung cancer. *Journal* 2012;**118**;1726-1737. doi: 10.1002/cncr.26456.
38. Caldeira PC, de Andrade Sousa A, de Aguiar MC. Differential infiltration of neutrophils in t1-t2 versus t3-t4 oral squamous cell carcinomas: A preliminary study. *BMC research notes* 2015;**8**;569. doi: 10.1186/s13104-015-1541-x.
39. Caldeira PC, Vieira É LM, Sousa AA, Teixeira AL, Aguiar MCF. Immunophenotype of neutrophils in oral squamous cell carcinoma patients. *Journal of oral pathology & medicine* 2017;**46**;703-709. doi: 10.1111/jop.12575.
40. Fridlender ZG, Sun J, Kim S *et al.* Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by tgf-beta: "N1" versus "n2" tan. *Journal* 2009;**16**;183-194. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017.
41. Lequerica-Fernández P, Suárez-Canto J, Rodríguez-Santamarta T *et al.* Prognostic relevance of cd4(+), cd8(+), and foxp3(+) tils in oral squamous cell carcinoma and correlations with pd-l1 and cancer stem cell markers. *Biomedicines* 2021;**9**. doi: 10.3390/biomedicines9060653.
42. Zhou C, Diao P, Wu Y *et al.* Development and validation of a seven-immune-feature-based prognostic score for oral squamous cell

carcinoma after curative resection. *International journal of cancer* 2020;**146**;1152-1163. doi: 10.1002/ijc.32571.

43. Zhou C, Wu Y, Jiang L *et al.* Density and location of cd3(+) and cd8(+) tumor-infiltrating lymphocytes correlate with prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine* 2018;**47**;359-367. doi: 10.1111/jop.12698.

44. Gaafar NM, Osman TA, Ahmed IA *et al.* Characterization of immune cell infiltrate in tumor stroma and epithelial compartments in oral squamous cell carcinomas of sudanese patients. *Clinical and experimental dental research* 2022;**8**;130-140. doi: 10.1002/cre2.501.

45. Shen M, Hu P, Donskov F, Wang G, Liu Q, Du J. Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: A systematic review and meta-analysis. *PloS one* 2014;**9**;e98259. doi: 10.1371/journal.pone.0098259.

46. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* 2008;**8**;618-631. doi: 10.1038/nrc2444.

47. Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP. Cd66a, cd66b, cd66c, and cd66d each independently stimulate neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 1996;**60**;106-117. doi: 10.1002/jlb.60.1.106.

48. Silva RNF, Dallarmi LB, Araujo AKC *et al.* Immunohistochemical analysis of neutrophils, interleukin-17, matrix metalloproteinase-9, and neoformed vessels in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine* 2018;**47**;856-863. doi: 10.1111/jop.12762.

49. Laliberté C, Ng N, Eymael D *et al.* Characterization of oral squamous cell carcinoma associated inflammation: A pilot study. *Frontiers in oral health* 2021;**2**;740469. doi: 10.3389/froh.2021.740469.

50. Li C, Zhao L, Wang Q *et al.* Neutrophils infiltration and its correlation with human papillomavirus status in the oral squamous cell carcinoma. *Cancer management and research* 2019;**11**;5171-5185. doi: 10.2147/cmar.s202465.

51. Shaul ME, Fridlender ZG. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nature reviews. Clinical oncology* 2019;**16**;601-620. doi: 10.1038/s41571-019-0222-4.

52. Bankhead P, Fernández JA, McArt DG *et al.* Integrated tumor identification and automated scoring minimizes pathologist involvement and provides new insights to key biomarkers in breast cancer. *Laboratory investigation* 2018;**98**;15-26. doi: 10.1038/labinvest.2017.131.
53. Berben L, Wildiers H, Marcelis L *et al.* Computerised scoring protocol for identification and quantification of different immune cell populations in breast tumour regions by the use of qupath software. *Histopathology* 2020;**77**;79-91. doi: 10.1111/his.14108.
54. Loughrey MB, Bankhead P, Coleman HG *et al.* Validation of the systematic scoring of immunohistochemically stained tumour tissue microarrays using qupath digital image analysis. *Histopathology* 2018;**73**;327-338. doi: 10.1111/his.13516.
55. Weckx A, Grochau KJ, Grandoch A, Backhaus T, Zöller JE, Kreppel M. Survival outcomes after surgical treatment of oral squamous cell carcinoma. *Oral diseases* 2020;**26**;1432-1439. doi: 10.1111/odi.13422.
56. Capote-Moreno A, Brabyn P, Muñoz-Guerra MF *et al.* Oral squamous cell carcinoma: Epidemiological study and risk factor assessment based on a 39-year series. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2020;**49**;1525-1534. doi: 10.1016/j.ijom.2020.03.009.
57. Ferreira AK, Carvalho SH, Granville-Garcia AF *et al.* Survival and prognostic factors in patients with oral squamous cell carcinoma. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 2021;**26**;e387-e392. doi: 10.4317/medoral.24242.

FIGURES

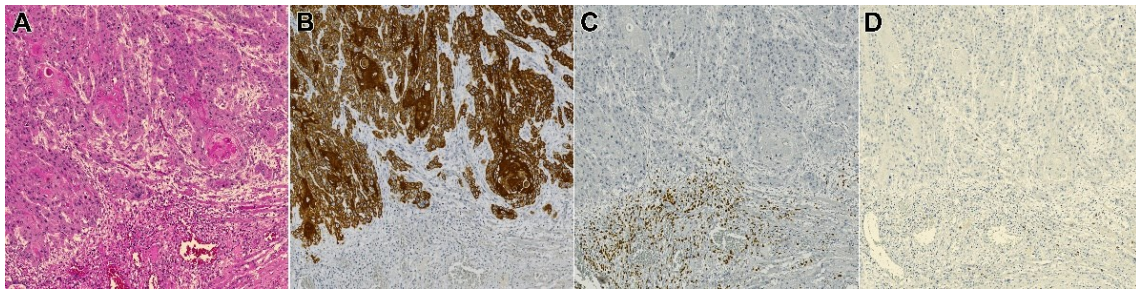


Figure 1: Photomicrograph representing a 1mm² field of the same region stained for **A)** Hematoxylin and eosin; and immunostained for **B)** Cytokeratin; **C)** CD66b neutrophils; and **D)** CD8 T lymphocytes.

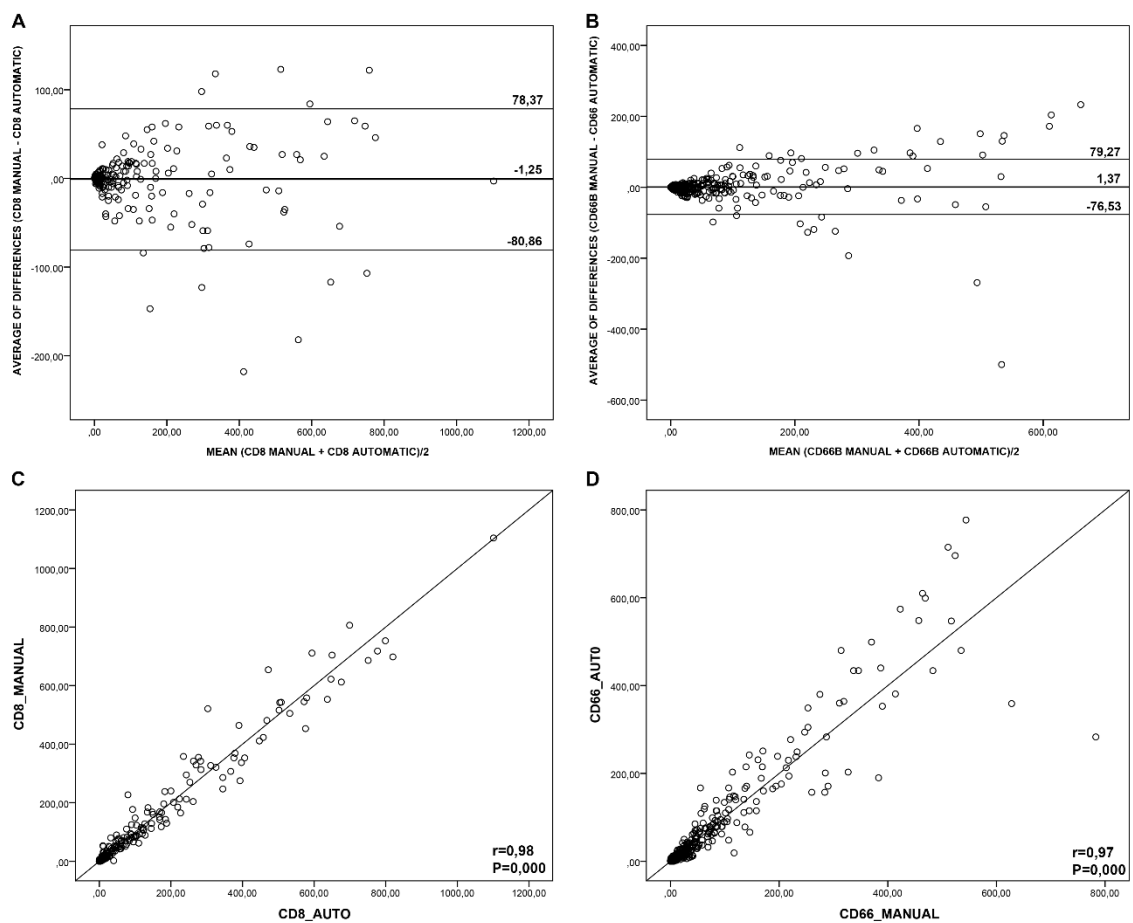


Figure 2: (A-B) Bland-Altman plots from the comparison between resections and biopsy samples of (A) CD8 and (B) CD66b; topmost line corresponds to the upper limit of agreement, the middle line is the average of differences, and the bottom line corresponds to the lower limit of agreement. (C-D) Correlation scatterplot for (C) CD8 and (D) CD66b

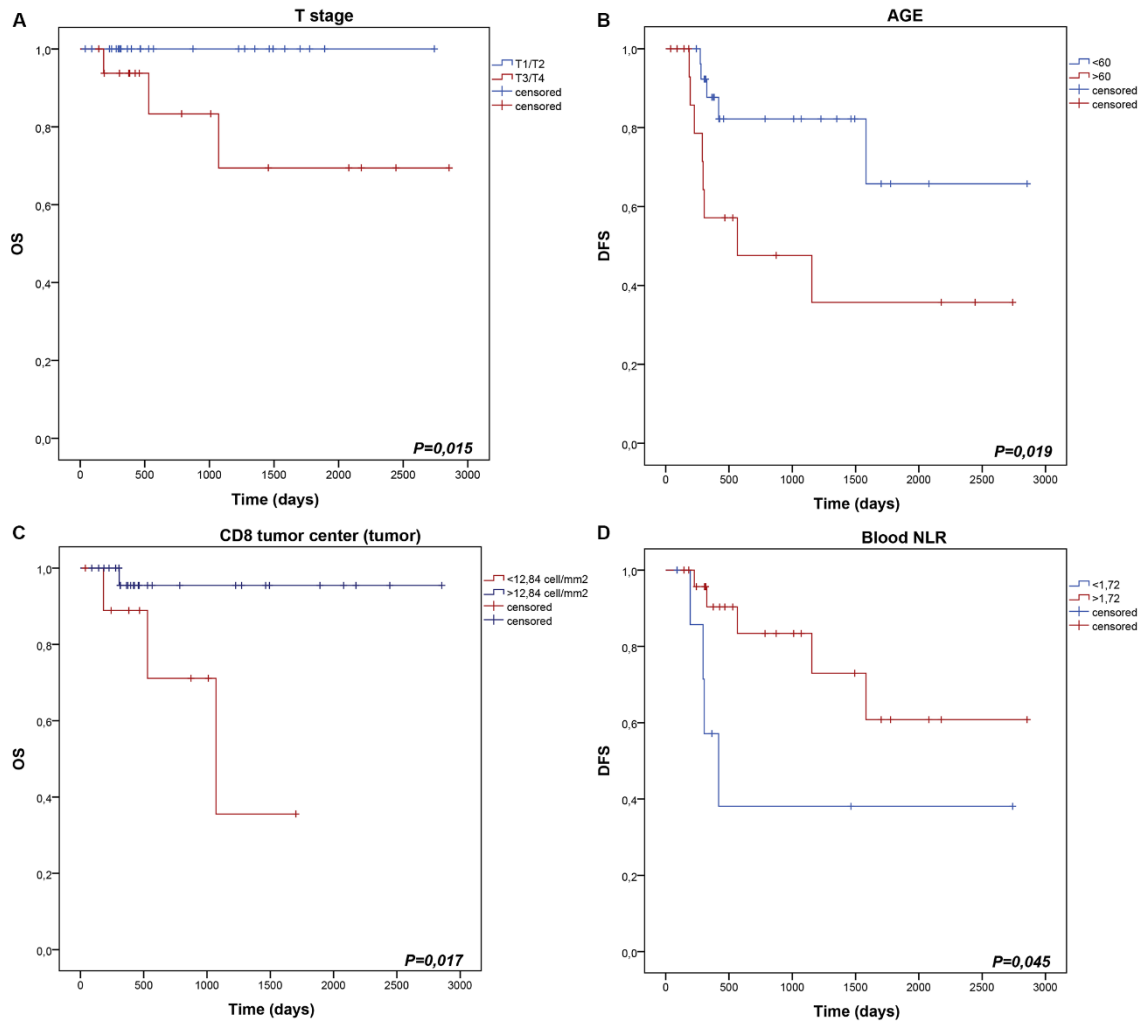


Figure 3: Kaplan-Meier survival curves comparing A) T1/T2 vs T3/T4 tumors; B) <60 years-old vs ≥60 years-old; C) Parenchyma CD8 ≥12.84 at the TC vs parenchyma CD8 <12.84 at the TC; D) Blood NLR ≥1.72 vs blood NLR <1,72.

TABLES

Table 1: Clinicopathological features of the cohort.

Characteristics		Number	%
	Mean±SD	58.58±10.13	
Age	39-59	28	60.9
	>60	18	39.1
Sex	Male	34	73.9
	Female	12	26.1
Smoking history	No	6	13
	Yes	40	87
Alcohol consumption	No	10	21.7
	Yes	34	73.9
Site	Tongue	22	47.8
	FOM	8	17.4
	Other	16	34.8
T	T1	15	32.6
	T2	11	23.9
	T3	11	23.9
	T4	7	15.2
N	N0	24	52.2
	N1	1	2.2
	N2	10	21.7
	N3	2	4.3
M	M0	44	95.7
	M1	2	4.3
HG	1	14	30.43
	2	26	56.52
	3	6	13.05
Clinical stage	1	12	26.1
	2	6	13
	3	4	8.7
	4	16	34.8
Death	N	4	8.69
Recurrence	N	13	28.26
Treatments	Surgery	16	34.78
	Surgery+CRT	8	17.39
	Surgery+ RT	11	23.91
	CRT alone	9	19.57
	RT alone	2	4.35

CRT, chemoradiotherapy; FOM, floor of the mouth; HG, histopathological grade; M, distant metastasis; N, lymph node metastasis; RT, radiotherapy; SD, standard deviation; T, tumor size. Clinical data was missing for Alcohol consumption (2 patients); T stage (2 patients); N stage (9 patients), and clinical stage (8 patients).

Table 2: Measurement of agreement between manual and automatic methods of positive cell count.

Statistical data	CD66B	CD8
Intraclass correlation coefficient	0.96	0.99
Sperman correlation coefficient	0.97	0.98
Average of differences	1.37	-1.25
Standard deviation	39.74	40.62
Upper limit	79.27	78.37
Lower limit	-76.53	-80.86

Table 3: Tumor and blood neutrophil to lymphocyte ratio, according to clinicopathological features.

Characteristics		IF	P	TC	P	Blood	P
Sex	Male	0.09 (0.36)	0.143	0.08 (0.49)	0.294	2.77 (1.87)	0.390
	Female	0.13 (2.03)		0.42 (2.62)		2.18 (1.31)	
Smoking history	No	0.4 (3.08)	0.310	0.75 (*)	0.380	1.75 (0.96)	0.050
	Yes	0.05 (0.26)		0.07 (0.51)		2.9 (1.75)	
Alcohol consumption	No	0.38 (3.07)	0.798	0.32 (4.47)	0.783	1.93 (2.09)	0.467
	Yes	0.08 (0.28)		0.09 (0.61)		2.92 (1.7)	
Site	Tongue	0.09 (0.84)	0.119	0.11 (0.72)	0.800	3.05 (2.06)	0.164
	FOM	0.18 (0.25)		0.19 (0.42)		2.43 (0.85)	
	Other	0.05 (0.72)		0.07 (0.51)		1.9 (2.32)	
T	T1/T2	0.07 (0.87)	0.420	0.11 (0.67)	0.409	2.52 (2.0)	0.478
	T3/T4	0.03 (0.21)		0.05 (0.16)		2.9 (2.16)	
N	N0	0.06 (0.20)	0.500	0.06 (0.51)	0.944	2.17 (2.08)	0.734
	N+	0.18 (0.89)		0.19 (2.08)		3.12 (2.06)	
HG	1	0.09 (0.89)	0.604	0.05 (1.22)	0.676	2.17 (2.13)	0.609
	2	0.09 (0.36)		0.12 (0.60)		2.6 (1.92)	
	3	0.11 (*)		0.05 (*)		2.68 (9.44)	
Clinical Stage	I/II	0.06 (0.21)	0.537	0.07 (0.59)	0.540	2.68 (2.27)	0.937
	III/IV	0.135 (0.71)		0.08 (1.35)		2.56 (1.91)	
Death	No	0.1 (0.48)		0.09 (0.56)	0.824	2.52 (1.99)	0.236
	Yes	-*		0.46 (0.52)		2.66 (1.38)	
Recurrence	No	0.09 (0.36)	0.113	0.11 (0.6)	0.269	2.82 (1.49)	0.064
	Yes	0.15 (1.78)		0.3 (0.63)		1.91 (2.44)	

FOM, floor of the mouth; HG, histopathological grade; IF, invasive front; N, lymph node metastasis; P, p value; TC, tumor center. *Small group size, descriptive measure wasn't calculated. Highlight in bold indicates $P < 0,05$. Kruskal-Wallis (3 groups- post-hoc Bonferroni) and Mann-Whitney (2 groups).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary figures:

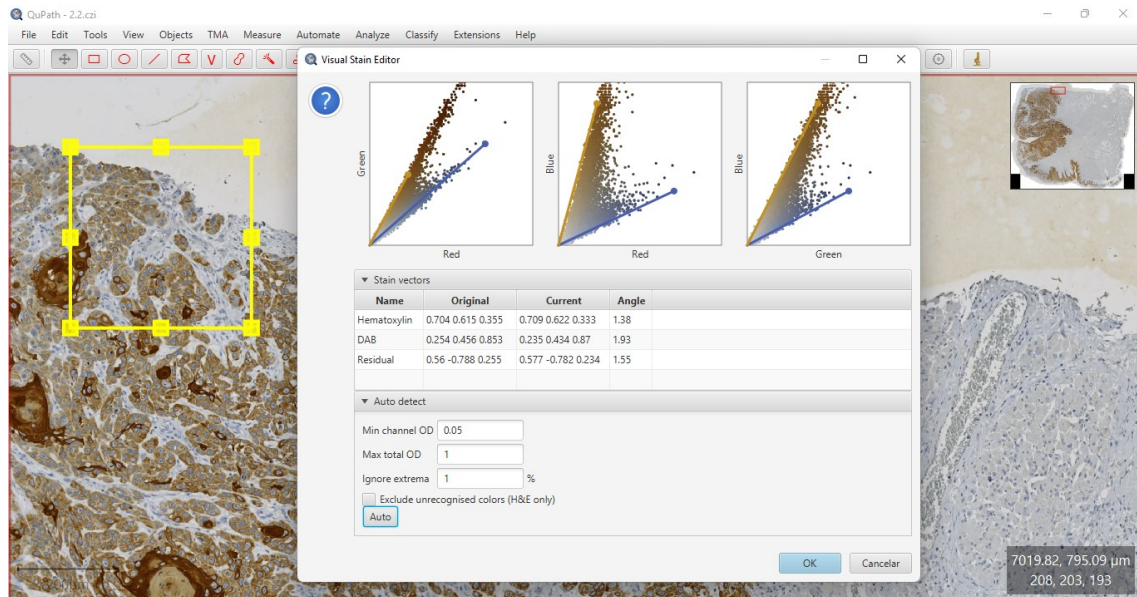


Figure 1S – A representative area containing a sample of the background and a strong sample of hematoxylin and DAB staining was selected, and the *estimate stain vectors* command was applied to identify stain vectors within this region, thus improving stain separation.

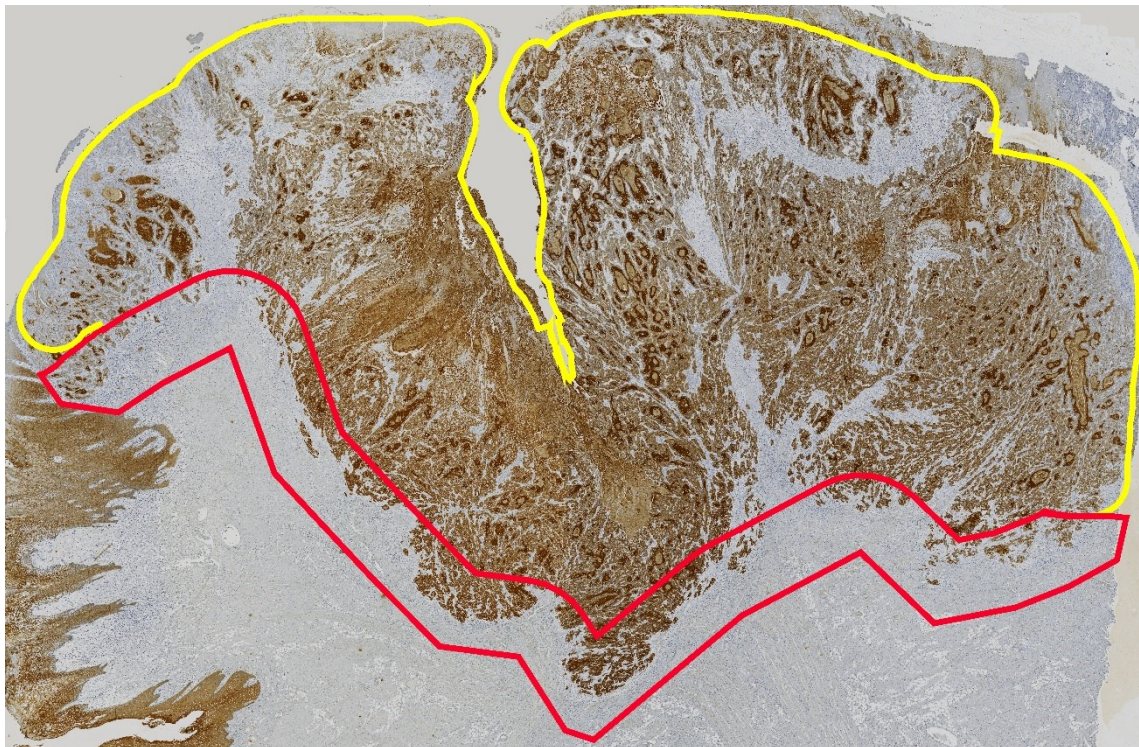


Figure 2S – Tumoral regions of analysis. The area delimited by the red lines corresponds to the invasive front, a 1mm wide area centered at the tumor border. The area immediately above, delimited by the yellow line, corresponds to the tumor center.

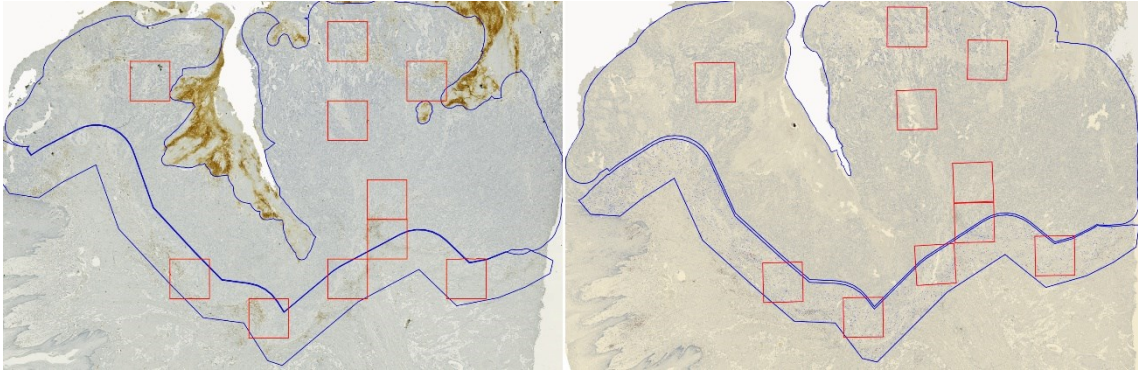


Figure 3S – For each tumoral region, five fields of 1mm² were randomly selected for analysis. In resections, five of these fields were located at the invasive front and five at the tumor center.

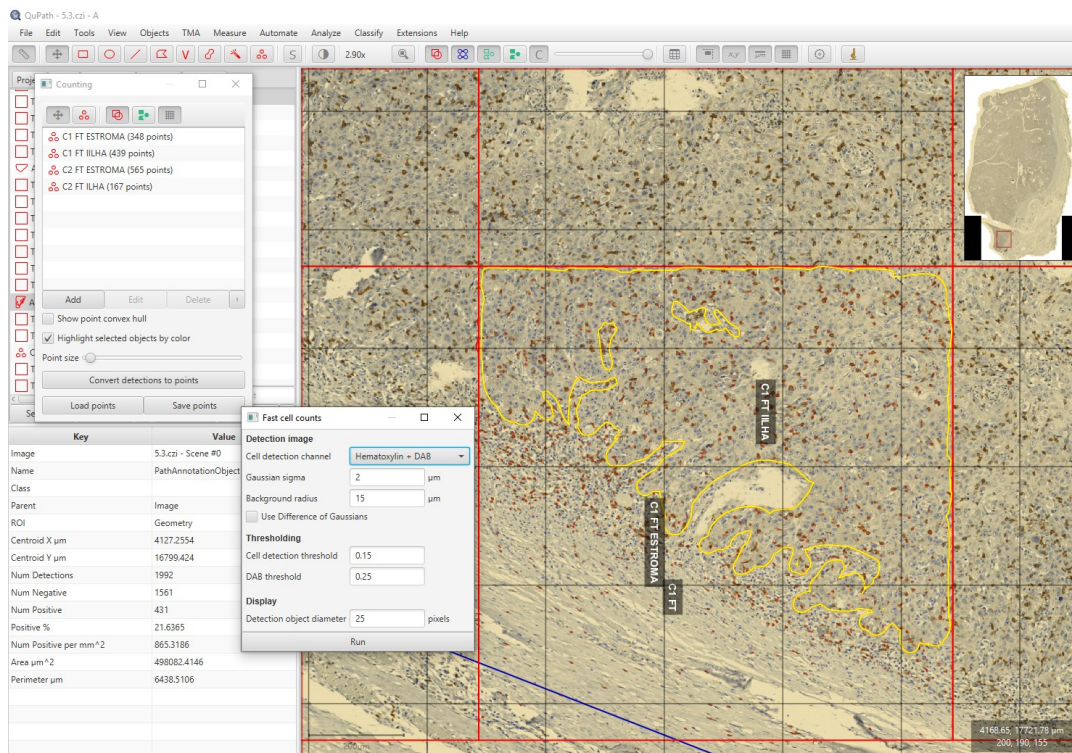


Figure 4S - For each 1mm² field, the positive cell count was performed for the whole field (area delimited by the red line) and separately at the tumor stroma and tumor parenchyma (area delimited by the yellow line), with the aid of cytokeratin-immunostained slides.

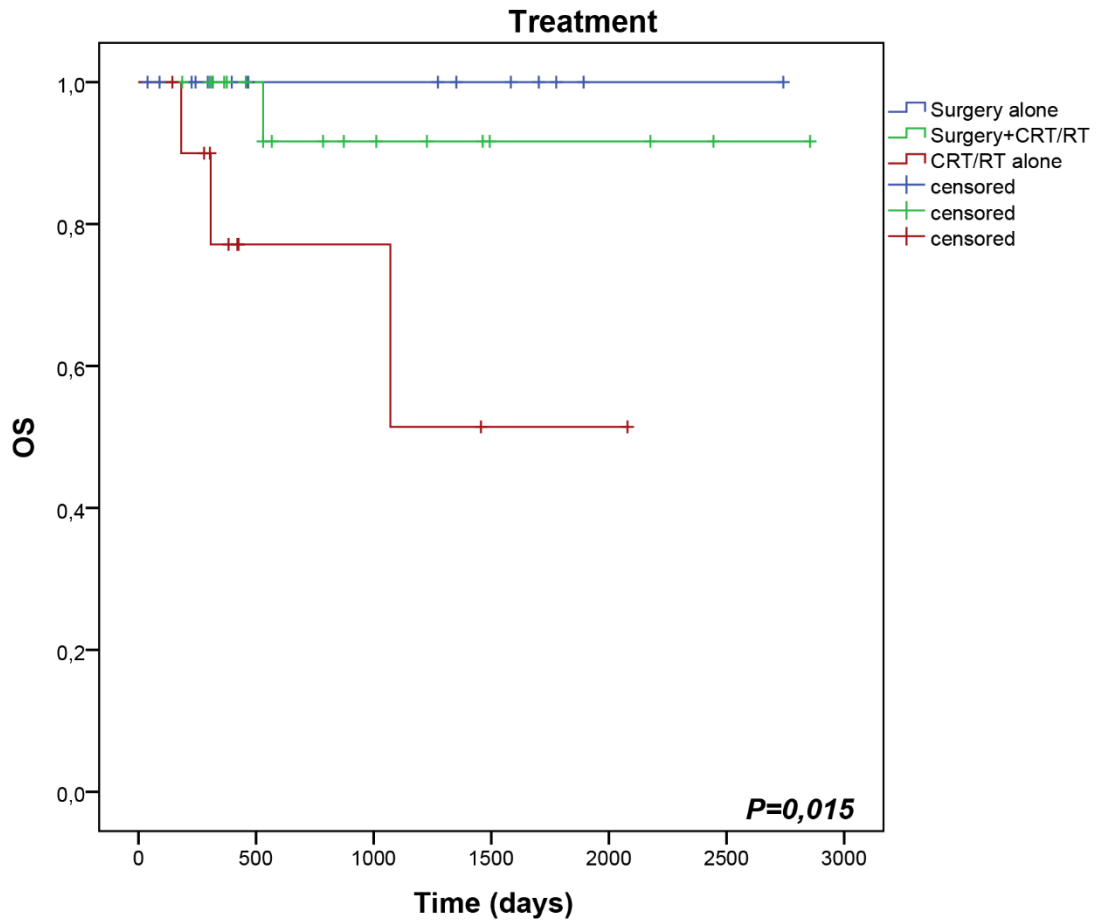


Figure 5S – Kaplan-Meier survival curve comparing survival time between different treatment modalities. OS, overall survival; CRT, chemoradiotherapy; RT, radiotherapy.

Supplementary Tables:

Table 1S: Number of samples analyzed for each tumor region.

Region	Resection	Tumor thickness <2mm	Biopsy	Total
Invasive front	26	5	-	31
Tumor center	26	-	15	41

Table 2S – 25th, 75th percentile, and median for each region of analysis.

		CD8			CD66b		
		25 th	Median	75 th	25 th	Median	75 th
Invasive front	Stroma	161.88	447.20	654.25	10.94	41.84	129.48
	Parenchyma	19.85	59.72	193.53	0.65	7.15	31.38
	Whole field	151.80	366.60	527.00	7.80	34.60	91.25
Tumor center	Stroma	135.89	295.26	534.56	7.39	39.19	148.23
	Parenchyma	12.85	77.77	239.41	1.18	6.11	39.96
	Whole field	93.35	198.40	474.48	5.30	22.20	121.40
		25 th	NLR Median	75 th			
Tumor	Invasive front	0.017	0.090	0.399			
	Tumor center	0.038	0.098	0.569			
Blood		1.72	2.51	3.62			

NLR, neutrophil-lymphocyte ratio, 25th, 25 percentile; 75th, 75 percentile.

Table 3S - Number of events per year of follow-up.

		Overall survival	Disease-free survival	
1 year	Alive	31	No recurrence	27
	Dead	2	Recurrence	9
	Censored	13	Censored	10
3 years	Alive	15	No recurrence	13
	Dead	2	Recurrence	2
	Censored	16	Censored	21
5 years	Alive	6	No recurrence	5
	Dead	0	Recurrence	2
	Censored	11	Censored	8

Table 4S – Median (interquartile range) number of CD66b/mm² at different tumor regions and according to clinical features.

		IF	IF (s)	IF (p)	TC	TC (s)	TC (p)
Sex	Male	34.6 (123.2)	41.92 (141.8)	12.27 (71.2)	18.2 (113.6)	29.3 (135.1)	5.48 (41.6)
	Female	37.8 (392.9)	35.5 (539.13)	2.8 (117.1)	61.7 (290.3)	180.5 (490.8)	22.0 (123.1)
Smoking history	No	370.6 (*)	543.8 (*)	4.2 (*)	300.2 (*)	413.1 (*)	31.01 (*)
	Yes	34 (90.6)	37.6 (139.1)	9.7 (73.4)	19.2 (94.3)	30.2 (145.3)	5.2 (54.3)
Alcohol consumption	No	91.4 (402)	191.5 (508.9)	4.2 (120)	30.8 (307.8)	49.21 (605.7)	13 (121.6)
	Yes	34 (123.8)	37.6 (137.5)	14.6 (99.5)	19.2 (122.3)	43.6 (179.1)	5.2 (92.5)
Site	Tongue	33.4 (209.2)	33.36 (171)	13.4 (171.8)	18 (267.2)	56.1 (209.7)	5.5 (226.2)
	FOM	38.4 (60)	41.8 (98.2)	5.9 (52)	18.2 (52.4)	29.3 (161.5)	8.8 (51.3)
	Other	34.6 (221.6)	51 (264.5)	1.8 (119.9)	28.8 (94.1)	39.2 (103.2)	6.1 (64.5)
T	T1/T2	34.6 (167.7)	51 (174)	7.1 (120)	20.2 (196.8)	56.1 (186.9)	6.7 (68.1)
	T3/T4	33.4 (41.6)	33.4 (60.8)	4.2 (32)	22.2 (19.6)	29.3 (36.1)	5 (9.7)
N	N0	18.2 (91.4)	24.7 (82.1)	4.5 (30.3)	18.1 (172.6)	30.2 (179.6)	4.8 (33.7)
	N+	20.8 (171.9)	29.2 (159.6)	13.4 (243.3)	30.8 (192.8)	49.2 (178.4)	13 (199.4)
HG	1	33.4 (307.2)	33.4 (345.2)	33.5 (149.8)	28.8 (222.9)	39.2 (262.5)	5 (128.4)
	2	34.6 (166.2)	41.8 (156.4)	12.3 (122.1)	30.8 (196.8)	56.1 (203.8)	6.7 (92.5)
	3	49.4 (*)	72.2 (*)	0 (*)	14.2 (*)	21.2 (*)	6.11 (*)
Clinical Stage	I/II	17 (123.2)	23.5 (143.4)	1.8 (15.8)	18 (245.2)	31.1 (209.73)	5.5 (42.6)
	III/IV	27.1 (104.3)	31.3 (112)	21.3 (60)	23.5 (91.1)	34.2 (117)	4.8 (28.7)
Death	No	34 (125.4)	37.64 (163.7)	6.5 (61.8)	21.2 (138.1)	35.1 (160.2)	5.8 (39.8)
	Yes	*	*	*	38 (139.2)	52.8 (200)	7.7 (39.6)
Recurrence	No	33.4 (123.4)	33.4 (145)	4.2 (33.5)	18.2 (113.8)	77.5 (236.6)	50.7 (252.1)
	Yes	62.9 (*)	62.6 (426.2)	90.3 (182.8)	67.1 (256.8)	5.5 (35.3)	8.77

FOM, floor of the mouth; HG, histopathological grade; IF, invasive front; N, lymph node metastasis; p, tumor parenchyma; s, tumor stroma; T, tumor size; TC, tumor center. Kruskal-Wallis (3 groups- post-hoc Bonferroni) and Mann-Whitney (2 groups). * Small group size, descriptive measure could not be calculated.

Table 5S - Median (interquartile range) number of CD8/mm² at different tumor regions and according to clinical features.

		IF	IF (s)	IF (p)	TC	TC (s)	TC (p)
Sex	Male	366.6 (347.8)	447.2 (370.3)	82 (204.1)	201.2 (368.2)	295.1 (399.7)	129.2 (266.7)
	Female	358.6 (446.5)	399.7 (547.9)	37.9 (189.1)	151.6 (454.9)	338.9 (615.7)	40.6 (105.8)
Smoking history	No	112.8 (*)	160.7 (*)	17.9 (*)	160.8 (*)	295.3 (*)	30.7 (*)
	Yes	378.7 (356.8)	467.6 (414.8)	101.9 (204.5)	199.8 (393.4)	325 (416.9)	103.8 (264.3)
Alcohol consumption	No	241.2 (399.6)	521.5 (498.1)	17.9 (88.3)	160.8 (431.2)	295.3 (531.3)	30.7 (131.7)
	Yes	378.7 (389.9)	426.9 (506.5)	102.7 (216.4)	199.8 (366.7)	325 (383.1)	103.8 (258.4)
Site	Tongue	390.8 (284.4)	447.2 (376.3)	57.9 (267.5)	242.4 (406.6)	354.9 (433.9)	50.4 (302.4)
	FOM	241.2 (266.8)	326 (454.4)	40.7 (124.3)	158 (87.2)	265.9 (243.9)	78.5 (109.8)
	Other	443.2 (531.7)	591.3 (657.4)	180.4 (163.7)	288.2 (510.5)	295.1 (665.5)	197.6 (227.7)
T	T1/T2	293.2 (450.7)	385.3 (552.8)	57.9 (203)	198.4 (417.6)	292.3 (450.7)	60 (260.8)
	T3/T4	443.2 (350.6)	488 (365.1)	121.8 (250.1)	336.2 (519.6)	354.9 (670.1)	197.6 (245.7)
N	N0	339.6 (345.1)	395.9 (435.3)	54.3 (167.8)	221.8 (405.1)	325 (467.7)	103.1 (267.1)
	N+	252 (1109)	287.9 (1359)	59.7 (426.4)	160.8 (287.6)	218.1 (303.1)	30.7 (360)
HG	1	366.6 (310.2)	406.5 (369)	180.4 (210.9)	336.2 (418.5)	423.1 (558.4)	50.4 (213.2)
	2	390.8 (463.7)	447.2 (56.7)	59.7 (208.6)	176.8 (388)	295.1 (388.6)	78.5 (274.9)
	3	241.2 (*)	521.5 (*)	43.6 (*)	45 (*)	86.7 (*)	13.1 (*)
Clinical Stage	I/II	312.6 (348.2)	385.3 (461.8)	50.7 (118.2)	201.2 (430.6)	295.1 (444.3)	50.4 (270.9)
	III/IV	309.3 (352)	347.2 (391.2)	120.3 (234.1)	168.8 (393.7)	256.7 (342.5)	94.6 (239.5)
Death	No	339.6 (353.7)	426.9 (436.1)	58.8 (199.7)	199.8 (395.9)	295.2 (451.3)	77.4 (260.9)
	Yes	*	*	*	135 (213.3)	266.6 (376.9)	9.6 (56.5)
Recurrence	No	282.3 (319.1)	363.0 (418.6)	70.85 (216.8)	176.8 (421.7)	292.3 (418.5)	77 (249.3)
	Yes	390.8 (516)	447.2 (685.2)	71.32 (144.3)	288.2 (380.8)	423.1 (504.1)	50.4 (230.6)

FOM, floor of the mouth; HG, histopathological grade; IF, invasive front; N, lymph node metastasis; p, tumor parenchyma; s, tumor stroma; T, tumor size; TC, tumor center. Kruskal-Wallis (3 groups- post-hoc Bonferroni) and Mann-Whitney (2 groups). * Small group size, descriptive measure could not be calculated.

Table 6S – Spearman’s correlation coefficient between CD66b and CD8 at different tumor regions. **(A)** Correlation according to tumor compartments (stroma, parenchyma) and tumor regions (invasive front and tumor center). **(B)** Correlation according to tumor regions only.

A			CD66				CD8			
			IF s	IF p	TC s	TC p	IF s	IF p	TC s	TC p
CD66	IF s	r	1.000	.624**	.791**	.812**	,044	-,045	,115	,114
		P value		.000	.000	.000	,813	,809	,583	,588
		N	31	30	25	25	31	31	25	25
	IF p	r		1.000	.549**	.744**	,183	,325	,258	,391
		P value			.005	.000	,333	,080	,212	,053
		N		30	25	25	30	30	25	25
	TC s	r			1.000	.818**	,127	,158	,202	,208
		P value				.000	,545	,452	,212	,197
		N			40	40	25	25	40	40
	TC p	r				1.000	,092	,162	,273	,245
		P value					,661	,438	,089	,128
		N				40	25	25	40	40
CD8	IF s	r				1,000	,518**	,622**	,611**	
		P value					,003	,001	,001	
		N					31	31	25	25
	IF p	r					1,000	,636**	,791**	
		P value						,001	,000	
		N						31	25	25
	TC s	r						1,000	,698**	
		P value							,000	
		N							40	40
	TC p	r							1,000	
		P value								
		N								40
B			CD66		CD8					
			IF	TC	IF	TC				
CD66	IF	r	1.000	.848**	-.033	-.008				
		P value		.000	.860	.968				
		N	31	25	31	25				
	TC	r		1.000	.130	.228				
		P value			.536	.157				
		N		40	25	40				
CD8	IF	r			1.000	.751**				
		P value				.000				
		N			31	25				
	TC	r				1.000				
		P value								
		N				40				

r, Spearman’s correlation coefficient; N, number of samples in the test; IF, invasive front; s, tumor stroma; p, tumor parenchyma; TC, tumor center. Highlight in bold indicates $P < 0,05$.

Table 7S - Spearman's correlation coefficient between tumor and blood cells.

		Lymphocyte	Segmented
CD66 IF	r	-.301	-.268
	P value	.154	.205
	N	24	24
CD66 TC	r	-.289	-.195
	P value	.121	.303
	N	30	30
CD8 IF	r	-.259	.092
	P value	.221	.668
	N	24	24
CD8 TC	r	-.328	.114
	P value	.077	.550
	N	30	30

r, Spearman's correlation coefficient; N, number of samples in the test; TC, tumor center; IF, invasive front.

Table 8S – Spearman's correlation coefficient among tumor and blood neutrophil to lymphocyte ratio.

		NLR blood	NLR tumor (IF)	NLR tumor (TC)	NLR tumor
NLR blood	r	1.000	-.010	-.065	.006
	Sig.		.964	.734	.974
	N	34	24	30	34
NLR tumor (IF)	r		1.000	.820**	.959**
	Sig.			.000	.000
	N		31	25	31
NLR tumor (TC)	r			1.000	.925**
	Sig.				.000
	N			40	40
NLR tumor	r				1.000
	Sig.				
	N				46

IF, invasive front; NLR, neutrophil to lymphocyte ratio; TC, tumor center. Highlight in bold indicates $P < 0,05$.

Table 9S – P values for Kaplan-Meier's overall and disease-free survival curves comparing high and low categories, according to the cutoff points bases on the 25th percentile, median, 75th percentile and 1 (only neutrophil to lymphocyte ratio) and according to tumor regions.

		OS				DFS			
		25th	Median	75th	1	25th	Median	75th	1
CD8	IF s	0.593	0.335	0.061	-	0.295	0.334	0.148	-
	IF p	0.593	0.335	0.123	-	0.999	0.999	0.572	-
	TC s	0.608	0.652	0.096	-	0.834	0.607	0.758	-
	TC p	0.017	0.259	0.22	-	0.298	0.325	0.891	-
	IF	0.593	0.299	0.091	-	0.337	0.868	0.334	-
	TC	0.608	0.146	0.131	-	0.834	0.842	0.309	-
CD66b	IF s	0.634	0.371	0.516	-	0.723	0.397	0.961	-
	IF p	0.67	0.355	0.134	-	0.413	0.085	0.479	-
	TC s	0.673	0.45	0.39	-	0.273	0.784	0.96	-
	TC p	0.9	0.35	0.964	-	0.859	0.955	0.765	-
	IF	0.634	0.407	0.516	-	0.723	0.491	0.961	-
	TC	0.872	0.45	0.858	-	0.972	0.784	0.948	-
NLR IF	0.634	0.407	0.516	0.777	0.723	0.912	0.424	0,14	
NLR TC	0.87	0.431	0.269	0.511	0.638	0.332	0.711	0,22	
NLR blood	0,75	0.902	0.253	0.637	0.045	0.169	0.701	0.439	

DFS, disease-free survival; IF, invasive front; TC, tumor center; s, tumor stroma; p, tumor parenchyma; NLR, neutrophil- lymphocyte ratio; OS, overall survival. Highlight in bold indicates P<0,05.

Parameters for the automatic count using the *fast cell count* tool:

CD8

```
// Detect positive (and negative) cells by counting smoothed peaks with
'Fast cell counts (brightfield)' command
selectAnnotations();
runPlugin('qupath.opencv.CellCountsCV', '{"stainChannel":
"Hematoxylin + DAB", "gaussianSigmaMicrons": 2.0,
"backgroundRadiusMicrons": 15.0,
"doDoG": false, "threshold": 0.15, "thresholdDAB": 0.25,
"detectionDiameter": 25.0}');
```

CD66B

```
// Detect positive (and negative) cells by counting smoothed peaks with
'Fast cell counts (brightfield)' command
selectAnnotations();
runPlugin('qupath.opencv.CellCountsCV', '{"stainChannel":
"Hematoxylin + DAB", "gaussianSigmaMicrons": 2.0,
"backgroundRadiusMicrons": 15.0,
"doDoG": false, "threshold": 0.15, "thresholdDAB": 0.6,
"detectionDiameter": 25.0}');
```

5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise compartimentalizada do tumor mostrou que a elevada infiltração de linfócitos T CD8+ infiltrando o parênquima do centro tumoral impactaram de maneira positiva na sobrevida dos pacientes com CEB. Esses resultados demonstram a importância da análise de células imunológicas não apenas sob o ponto de vista quantitativo, mas também em relação a distribuição tecidual. Para tanto, o uso de imagens digitalizadas e a aplicação de métodos digitais semiautomatizados tornariam a análise menos laboriosa e mais rápida, permitindo inclusive a análise de múltiplos biomarcadores imuno-histoquímicos. A esse respeito, nossos resultados mostraram uma excelente concordância entre a contagem automática e manual realizada por um avaliador previamente calibrado. Para o futuro, a validação adicional entre avaliadores diferentes e com uma amostra maior serão necessárias para a confirmação dos resultados apresentados.

Finalmente, a ausência de correlação entre a contagem sanguínea e imuno-histoquímica é amparada por estudos anteriores, nos quais demonstrou-se que fatores do microambiente tumoral são potencialmente mais significantes na calibração da resposta imune tumoral.

6 CAPÍTULO 2

USO DE IMAGENS DIGITALIZADAS PARA A ANÁLISE DE
CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE BOCA

6.1 APRESENTAÇÃO

No presente capítulo, procurou-se analisar características histopatológicas associadas com o prognóstico do CEB por meio de imagens completas do tumor digitalizadas a partir de lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina e citoqueratina. Dois avaliadores realizaram a análise de maneira independente com o auxílio do programa de acesso aberto Qupath. Realizou-se todo o processo de maneira online, uma vez que os examinadores envolvidos se encontravam em cidades diferentes. As características histopatológicas analisadas foram: padrão de invasão da frente tumoral, invasão perineural, invasão linfovascular, profundidade de invasão, espessura tumoral e proporção tumor/estroma.

Além das características histopatológicas, analisou-se também a infiltração de neutrófilos CD66+ e linfócitos T CD8+, assim como a razão CD66b/CD8. A análise foi conduzida na área total do tumor disponível na imagem digitalizada, ao contrário do capítulo anterior, no qual a análise foi a partir de campos pré-selecionados. Além disso, buscou-se aplicar o método semiautomático testado anteriormente.

As análises conduzidas são apresentadas como artigo científico, formatado conforme as normas da revista *Head and Neck*, as quais foram acessadas em novembro de 2022.

6.2 ARTIGO

Title: Whole-slide image analysis of histopathological features of oral squamous cell carcinoma

Short title: Histopathological features of oral squamous cell carcinoma

Authors: Msc Andressa Fernanda Paza Miguel¹, Msc Nicole Lone Nascimento¹, PhD Daniella Serafin Couto Vieira², PhD Elena Riet Correa Rivero²

¹Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

²Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. E-mail:

Correspondence: Elena Riet Correa Rivero; riet.elena@gmail.com

Conflict of interest: The authors have none to declare.

Funding: This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC - Number 2021TR1460) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES – Finance Code 001).

Keywords: oral squamous cell carcinoma; tumor budding; perineural invasion; pattern of invasion; depth of invasion.

ABSTRACT

Background: This study aimed to evaluate histological features related to progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) - tumor budding (TB), perineural invasion (PNI), depth of invasion (DOI), tumor thickness (TT), lymphovascular invasion (LVI), pattern of invasion (PI), tumor-stroma ratio (TSR), and tumor neutrophil-lymphocyte ratio (NLR).

Methods: Resection samples from 31 OSCC were included and immunostained with cytokeratin.

Results: TB was high in PNI and LVI-positive tumors and positively correlated with TT. Non-cohesive tumors frequently exhibited PNI, dispersed tumors exhibited the highest DOI and TT, and non-cohesive tumors presented higher CD66b at the invasive front than cohesive tumors. CD66b and NLR at the tumor center were associated with worse disease-free survival.

Conclusion: Invasive cell phenotypes represented by high TB and non-cohesive/dispersed patterns were indicators of tumor aggressiveness related to PNI and LVI. Tumor NLR emerged as a potential prognostic marker, suggesting a pro-tumoral immune response associated with high neutrophil infiltration.

INTRODUCTION

Cancer of the oral cavity and the lip was responsible for 377.713 new cases and 97.370 deaths of the world's cancer burden in 2020 ¹. For oral squamous cell carcinoma (OSCC), the risk assessment is mostly based on the TNM staging according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) and the Union for International Cancer Control (UICC) manual. In the manual's latest edition, depth of invasion and extracapsular spread were included as variables for the T and N classification, respectively, based on the prognostic impact of both features on OSCC survival ².

Depth of invasion (DOI) is histologically measured from the basement membrane of the closest normal mucosa to the deepest point of invasion. Clinically, DOI measurement requires detailed assessment and palpation supplemented by radiographic examination to discriminate between thick exophytic tumors and deeply invasive ulcerated tumors ³. DOI was reported as a prognosticator for overall survival (OS), disease-specific (DSS), and disease-free survival (DFS) for OSCC, and this remained significant with a cut-off of 4mm or 5mm ⁴. Extranodal extension (ENE) is histologically defined as metastatic tumor in the lymph node extending through the fibrous capsule and into the surrounding connective tissue, regardless of the presence of associated stromal reaction ⁵. Clinical determination of ENE must be unequivocal, based on clinical examinations and supported by radiological evidence, and when in doubt, assignment to the lowest categories is recommended ³. As with DOI, ENE was also reported as a significant prognosticator for OS, DSS, and DFS in OSCC ⁴. Besides DOI and ENE, several other histopathological features have been recently associated with the survival of OSCC patients, including perineural invasion (PNI), lymphovascular invasion (LVI), tumor budding (TB), pattern of invasion (PI), and tumor-stroma ratio (TSR), among others ⁴.

The analysis of histopathological features can be improved with tools of digital pathology. Among them, whole-slide images (WSI) from

digitalized slides provide the opportunity to maximize the amount of data that can be extracted from tissue slides and the application of predictive models to identify a variety of clinical endpoints ⁶. In OSCC, the use of WSI has been reported with deep learning and convolutional neural network techniques applied for tissue segmentation, tumor-infiltrating lymphocytes quantification, and cancer diagnosis ^{7,8}. Recently, WSI of hematoxylin and eosin (H&E) and immunohistochemically stained slides were used to analyze the histopathological features TB, TSR, CD3 and CD8 lymphocytes in OSCC samples, and high-risk features presented the worse OS and DFS ⁹. Moreover, the use of WSI in conjunction with automated and semiautomated tools provides the opportunity to analyze multiple immunohistochemical biomarkers in a fast and reliable way in relation to manual counting, and there has been application of it for the detection of immune cell infiltrates ^{9,10}.

The aim of the present study was to analyze histopathological features associated with OSCC prognosis using H&E and immunohistochemically stained WSI. CK and H&E-stained slides were used to analyze TB, TSR, PNI, LVI, PI, and DOI. In addition, we applied a semi-automated method to quantify CD66b neutrophils and CD8 T lymphocytes to evaluate tumor neutrophil to lymphocyte ratio (tNLR). The parameters were study in correlation with one another and as prognosticator for DFS in resected samples of OSCC tumors.

MATERIAL AND METHODS

Population

The present study is based on a retrospective cohort of 171 patients with OSCC diagnosed between 2013-2018. Inclusion criteria were primary OSCC treated with resective surgery, follow-up data, and primary tumor available for immunohistochemistry. Exclusion criteria were recurrent or secondary OSCC and preoperative chemo-radiotherapy. Thirty-one patients were included in the final sample. A single examiner collected the following clinicopathological data: age, sex,

smoking/drinking habits, site, TNM stage, histopathological grade, and follow-up information.

Follow-up data were retrieved from the clinical records in June 2020, and last up-date was December 2021. Clinical endpoint was disease-free survival (DFS), defined as the time from the date of surgery to the date of death, recurrence, or the date of last follow up, which ever occurred first.

The institutional ethical committee review board approved this study (number 17674419.9.0000.0121) and patients' identity remained anonymous during data collection, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Immunohistochemical reactions and whole-slide image acquisition

Immunohistochemical reactions were performed using the labeled polymer method (EnVision Dual Link System-HRP, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) to detect cytokeratin (1:50; clone AE1/AE3 - Dako Corporation, Carpinteria, USA), CD66b-positive neutrophils (1:500; clone G10F5; BD Biosciences), and CD8-positive T lymphocytes (ready-to-use; Clone C8/144B; Dako, Denmark). Glass slides were scanned on Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss Microscopy) at 40x (0.11 $\mu\text{m}/\text{pixel}$), and the images were imported to the open-source software QuPath (v.0.3.2) ¹¹.

First, the *estimate stain vectors* command was used on each image to improve stain separation using color deconvolution ¹¹. Using cytokeratin (CK) immunostained slides, an annotation was drawn with the *polygon* tool around the whole tumor limited to its borders. The invasive margin was determined by expanding the tumor borders by 500 μm . The invasive front (IF) was defined as an 1mm wide area centered at the tumor border, and the tumor center (TC) was the remaining area ¹².

Tumor budding

Two examiners counted the number of TB using CK-immunostained images. A calibration was performed by double counting

15 randomly selected cases with a 21-day interval (interobserver agreement 0.966). Next, one observer (AFPM) performed the TB count on the remaining sample (intra-observer agreement 0.932). The highest tumor bud area (hotspot) was identified at the IF, an area of 0.785 mm²¹³ was drawn using the rectangle tool, the buds were manually marked using the *points* tool, and the total count of buds was automatically generated by the program. TB was defined as a single cell or a cell cluster of up to 4 tumor cells¹³. Then, patients were grouped using a two-tier system as low budding <5 and high budding ≥5¹⁴.

Tumor-stroma ratio

One examiner blinded to clinical features calculated the tumor/stroma ratio (TSR) based on the whole tumor area using CK-immunostained images. With the pixel classification tool, thresholds for DAB (3,3'-diaminobenzidine) and hematoxylin stains were visually determined and tumor/stroma areas were automatically generated, as well as the percentage of each compartment in relation to the whole tumor area. The tumor percentage was divided by the stromal percentage to calculate TSR, and a value above 1 indicated tumor tissue predominance (low stroma), while values below 1 indicated a stromal tissue predominance (high stroma)¹⁵. The tutorial for measuring areas is publicly available on Qupath website (<https://qupath.readthedocs.io/en/latest/index.html>) and served as a guide to calculate TSR.

Histopathological features: DOI, PNI, LVI, and PI

Two examiners (AFPM and NLN) assessed the histopathological features in H&E and CK images. Criteria were defined during a calibration meeting, then, the assessments were made independently and cross-checked. In case of disagreements, a third examiner was consulted (ERCR).

DOI was calculated as the perpendicular distance from the basement membrane from the closest adjacent normal mucosa to the

deepest point of invasion. Tumor thickness (TT) was calculated as the perpendicular distance from the highest point of the tumor surface to the deepest point of invasion ¹⁶ (**Figure 1S – Supplementary material**). TT and DOI were further categorized into <5 mm; 5-<10 mm, and ≥ 10 mm ³.

Perineural invasion (PNI) was defined as tumoral cells infiltrating through the nerve sheath or encircling at least one third of the nerve ¹⁷. Lymphovascular invasion (LVI) was defined as the unequivocal presence of tumor cell within the blood or lymphatic endothelial lining or focally adhered to the vascular wall ¹⁸. Finally, the pattern of invasion (PI) was assessed at the invasive front and the worst area was considered and classified as i) cohesive, broad sheets of cancer cells and/or tumor nests with more than 15 cells across; ii) non-cohesive, narrow strands or small groups with less than 15 tumor cells, or single infiltrating tumor cells were observed; iii) dispersed pattern, individual cells infiltrating at a distance of at 1mm from the main tumor ¹⁹ (**Figures 2S and 3S – Supplementary material**).

Semi-automated counting of immune cells and neutrophil to lymphocyte ratio (NLR)

One examiner performed the analysis blinded to the clinical characteristics. Analysis of CD8 and CD66b positive cells was performed using the *fast cell count* command for each tumoral region (whole tumor, tumor center, and invasive front). Positive cells were detected by separating stains using color deconvolution and identifying peaks in the sum of hematoxylin and DAB channels ¹¹. The method's reliability was previously tested against manual counting, and the agreement between methods was considered excellent (**Supplementary material**). Results are presented as positive cells/mm² of tumor area. Tumor NLR was calculated by dividing the CD66b/mm² for the CD8/mm², for each tumoral region.

Statistical analysis

The Gaussian's distribution of continuous variables was verified with the Shapiro Wilk's test. Normally distributed variables were described with mean and standard deviation (SD), and comparisons between groups were made with Student's T-test (2 groups) and ANOVA's test (3 groups). Mean differences and 95% confidence intervals (95%CI) were presented and effect size (ES) was calculated with Hedges' g. Non-normally distributed variables were described with median and interquartile range (IQR), and comparisons between groups were made with Mann-Whitney's test (2 groups) and Kruskal-Wallis' test (3 groups), and the ES r was calculated. Formulas and cut-of points to the effect size calculations are presented in the **Supplementary material**. The correlation between two continuous variables was tested with the Pearson's (normal distribution) and Spearman's (non-normal distribution) coefficient. Categorical variables are described with percentages and associations were tested with Fisher's exact test. In case of statistically significant association, logistic regression analysis was performed, and odds ratio (OR) and 95%CI were generated. DFS curves were plotted with Kaplan-Meyer and log-rank test for comparisons. Time until event and 95%CI are provided. For the DFS analysis, the median was used to categorize CD66b, CD8, and NLR. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Clinical features

The sample's mean age was 56.87 ± 9.39 years. Men (77.4%), smokers (87.1%), and drinkers (76.7%) composed most of our sample. Tumors were frequently at an early stage (58%) and well/moderately differentiated (90.3%). Adjuvant therapy was administered to 54.95% of patients, nine (29.03%) patients presented recurrence and one (3.2%) patient died (**Table 1**). Mean follow-up time was 32.15 ± 26.88 months and median follow-up time was 18.8 months (interquartile range 39.53 months). The mean DFS was 63.49 months (95%CI: 47.90-79.08 months).

Tumor budding, TSR, and histopathological features

Twenty-three cases had identifiable adjacent normal mucosa to measure DOI, whereas TT was measured on the entire sample. Mean DOI was 5.84mm \pm 3.81mm and TT was 6.5mm \pm 3.82mm, with a mean difference (DOI-TT) of -0.67 mm \pm 0.91mm (range -3.40mm – 1.45mm) and median -0.57 (IQR: 0.81). In most cases (86.95%), DOI was lower than TT (**Supplementary material – Table 1S**). Moreover, DOI was <5mm in 8 patients, between 5 - <10mm in 12 cases, and \geq 10mm in 3 cases. TT was <5mm in 10 patients, between 5 - <10mm in 14 patients, and \geq 10mm in 7 cases.

PNI was observed in 35.5% of cases and LVI in 25.8% (**Table 1; Figure 1**). The most frequent PI was non-cohesive (45.2%), followed by dispersed (38.7%) and cohesive (16.1%) (**Table 1**). The median number of TB was 16 (IQR: 25), and the mean TSR was 0.7 \pm 0.41.

Well differentiated tumors exhibited lower TB than moderate (Mann-Whitney test; $P=0.002$; $r=0.59$ – large ES) and poor (Mann-Whitney's test $P=0.011$; $r=0.75$ – large ES) differentiated tumors (**Table 2**). The number of TB was higher in the dispersed pattern in comparison to cohesive (Mann-Whitney's test; $P=0.001$; $r=0.78$ – large ES) and non-cohesive (Mann-Whitney's test, $P=0.029$, $r=0.43$ – medium ES) patterns. Tumors with LVI presented higher TB number than tumors without LVI (Mann Whitney test; $P=0.018$, $r=0.43$ – medium ES), and tumors with PNI presented higher TB than tumors without PNI (Mann Whitney test; $P=0.002$, $r=0.56$ – large ES) (**Table 3**).

DOI was higher in the dispersed pattern than in the cohesive ($P=0.033$; mean difference: 5.60; 95%CI: 1.34-9.85; Hedges' g: 1.62 – very large ES), and TT was higher in the dispersed pattern than in the cohesive ($P=0.003$; mean difference: 7.14; 95%CI: 2.87-11.39; Hedges' g: 1.81 – very large ES). TT was higher in tumors with PNI than in tumors without ($P=0.001$; mean difference: 4.84; 95%CI: 2.02-7.65; Hedges' g: 1.28 – very large ES) (**Table 3**). There was an association between the PI and PNI, wherein all cases with cohesive pattern had no PNI, and the

dispersed pattern exhibited PNI more frequently than the cohesive pattern (OR: 18.00; 95%CI: 2.47 – 131.28; $P=0.004$) (**Table 4**).

There was a strong positive correlation between DOI and TT (Pearson coefficient: 0.971; $P=0.000$) and a moderate positive correlation between TT and TB (Spearman's coefficient: 0.407; $P=0.023$) (**Supplementary material – Table 2S**).

Immune cells and tumor NLR

Median and interquartile range of immunohistochemical markers are presented in the **Supplementary material – Table 3S**.

The number of positive CD66b and the NLR value tended to be higher in advanced stage and lymph node positive tumors, while positive CD8 tended to be lower in advanced and lymph node positive tumors, however, no statistical difference was reached (**Supplementary material – Tables 4S, 5S, and 6S**).

The number of CD66b at the IF was higher in the non-cohesive pattern than in the cohesive pattern ($P=0.025$, Mann-Whitney test; $r=0.52$ – large ES) (**Table 5; Figure 2**).

There was a moderate positive correlation between CD66b at the IF and TT (Spearman coefficient: 0.386; $P=0.032$) and CD66b on the whole tumor and TT (Spearman coefficient: 0.345; $P=0.057$). There was a negative moderate correlation between CD66b at the TC and TB (Spearman coefficient: -0.453; $P=0.023$) and between NLR at the TC and TB (Spearman coefficient: -0.493; $P=0.012$) (**Supplementary material – Table 7S**).

Survival analysis

Results from the survival analysis are presented in the **Supplementary material – Table 8S**. High CD66b at the TC had a worse DFS survival than low CD66b TC. Similarly, high NLR at the TC presented worse DFS than low NLR TC (**Figure 3**). Other

clinicopathological features were not associated with DFS (**Supplementary material – Table 8S**).

DISCUSSION

In our sample of resected OSCC tumors, we observed a high frequency of males and prevalence of tobacco and alcohol consumption. Moreover, tumors at an early stage were slightly more frequent than advanced tumors, well and moderate grade predominated over poor histopathological grade, and approximately half of the sample received some type of adjuvant therapy. These findings are similar to previous studies, except for the clinical stage, which is frequently reported as advanced in OSCC ²⁰⁻²². However, clinical stage was not available in 22% of cases, therefore, the frequency of advanced tumors could be higher. We observed a 29% rate of recurrence, similar to the 26% rate reported by Weckx et al., (2020) ²², and lower than the 40% rate observed by Capote-Moreno et al., (2020) ²⁰. Only one patient died during our follow-up time (3%), which is a considerably lower rate than previously reported (19-72%) ²⁰⁻²², probably because of our smaller sample size and lower follow-up duration.

In general, DOI was lower than TT, however, the difference was below 1mm in 73.9% of cases, and it was above 2 mm in just one case. If we had categorized the sample using the 5mm cut-off point ¹⁶, only one case would have changed categories, wherein DOI would be below and TT above 5mm. These results are consistent with the ones reported by Dirven et al., (2017). The authors observed that DOI was usually lower than TT, and as T category modulators, the use of TT instead of DOI changed the T category in 5.7% and the clinical stage in 3.9% of cases, always by one category. Moreover, disease-specific survival analysis showed that the risk stratification was similar whether using DOI or TT as T category modulators ¹⁶. In our study, DOI or TT were not associated with DFS, however, they were associated with high-risk histopathological features, wherein DOI and TT were higher in dispersed tumors, and TT

was higher in tumors with PNI and was moderately correlated with TB count.

Although low-risk clinical features predominated in our sample, high-risk histopathological features were frequently observed, like non-cohesive/dispersed pattern of invasion, high TB count, and low TSR. We also noted that TB progressively increased from cohesive to dispersed pattern, which is expected, since the criteria to classify a tumor as non-cohesive or dispersed was the presence of small clusters or individual tumor cells¹⁹. It has been suggested that TB is a histopathological marker for epithelial-mesenchymal transition (EMT) in carcinomas^{14,23}. Molecular changes related to EMT are observed in TB cells, such as increased expression of transcription factors, like SNAIL²³, and proteins associated with cell motility, like vimentin, and loss of proteins related to cell adhesion, such as e-cadherin²⁴. EMT is the most prominent cell program used by epithelial malignant cells to acquire an invasive phenotype leading to invasion and metastasis²⁵, and, in OSCC, TB has been associated with worse overall, disease-specific, and disease-free survival⁴. In our sample, even though not associated with survival, TB was higher in cases exhibiting LVI and PNI, which are also high-risk histopathological features for worse survival⁴.

In this study, we observed that PNI occurred in 35% of cases. Schmidt et al., 2022 reported a similar prevalence of 42% when using immunohistochemistry to identify PNI²⁶. On the other hand, the prevalence of H&E-based PNI identification is lower, varying between 17-26%²⁶⁻²⁸. OSCC is known for having a particular affinity for nerve involvement, and rates of PNI may go as high as 82%²⁹. The presence of PNI is a prognosticator for worse overall, disease-specific, and disease-free survival⁴. In OSCC, the molecular mechanism for nerve invasion results from the interaction between tumor cells and components of the nerve, especially Schwann cells. Tumor cells begin to communicate with the nerve before becoming in contact with it and can induce transcriptome changes on nerves in a distance-dependent manner²⁶. In addition, it has been demonstrated that malignant cells

from PNI-positive tumors express neurotrophic proteins, such as nerve growth factor and its receptor tropomyosin receptor kinase A, which act as chemoattractant for cancer cells by triggering EMT changes, thus promoting cell invasiveness and facilitating PNI ²⁹.

In the present study, we associated high CD66b at the tumor center with worse DFS. The study from Zhou et al., (2020) performed a similar analysis to ours, separating tumor center from invasive margin. In contrast to our results, the authors reported no significant association between DFS and CD66b, and an association between high CD8 at the TC and improved overall survival and DFS ³⁰. In our study, high CD8 was generally observed in association with early-stage disease and negative lymph nodes, however, statistical significance was not reached. Furthermore, we observed that NLR above 0.16 at the tumor center was associated with worse DFS. Previous studies have associated blood NLR with survival in OSCC ³¹⁻³³, therefore, we suggest that tumor NLR could potentially be used as prognosticator in OSCC. The tumor microenvironment is an important regulator of tumor immunity, and often immunosuppressive factors, such as the transforming growth factor beta (TGF- β), can induce a pro-tumoral phenotype on neutrophils, while suppressing the activity of effector cells, like CD8 lymphocytes ³⁴. In this regard, tumor NLR could work as a marker for the balance between the pro-tumoral and anti-tumoral immune response.

In our study, the invasive front of non-cohesive tumors presented higher CD66b infiltration than cohesive tumors. Our observation is supported by the work of Yu et al., (2021), which demonstrated that OSCC cell lines cultured with neutrophil-conditioned medium presented increased migration and invasiveness. Furthermore, OSCC cells exhibited a mesenchymal morphology, increased expression of vimentin, metalloproteinase 9, n-cadherin, and reduced expression of e-cadherin, suggesting the occurrence of EMT ³⁵. Therefore, pro-tumoral neutrophils could promote changes in the phenotype of tumor cells, which would histologically correspond with a non-cohesive pattern of invasion. Furthermore, TGF- β is a master regulator of both neutrophil polarization

and EMT changes ^{35,36}, thus, since neutrophils in our sample were associated with worse survival and our cases frequently exhibited high TB, we speculate that these changes could be a consequence of TGF- β expression, which is frequently elevated in OSCC ³⁵.

In the present work we proposed a digital analysis of whole-image slides using an open-source software. The methodology presented as a solution for the changes imposed by the COVID pandemic, when the access to the university's facilities was restricted, and many students were returning to their hometowns. During the analysis, the three examiners were located at different cities, thus, the scanned images provided the opportunity to continue or research. In general, our experience with the software and digital analysis was excellent, and, even with the return of presential activities, our group will continue to use and perfect this methodology, especially to maintain and achieve new collaborations with other researchers and institutions from other regions.

In conclusion, we observed that high-risk histopathological features were frequent in our sample, and they were often associated with one another. The use of DOI or TT did not have a significant impact on tumor measurement, however, DOI was mostly lower than TT. Histopathological markers of cell invasiveness, such as pattern of invasion and tumor budding were associated with the occurrence of PNI and LVI, which are features previously associated with regional spread, survival, and recurrence of OSCC ⁴. Finally, high CD66b and NLR at the tumor center were prognosticators for worse DFS, and CD66b at the invasive front was higher in non-cohesive tumors. These findings are indicative of pro-tumoral neutrophils, and, in association with the high frequency of non-cohesive/dispersed tumors and high TB in the sample, are suggestive of TGF- β signaling.

REFERENCES

1. Bosetti C, Carioli G, Santucci C, et al. Global trends in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality. *International journal of cancer*. 2020;147(4):1040-1049 doi: 10.1002/ijc.32871.
2. Amin M, Edge S, Greene F, et al. *AJCC Cancer Staging Manual (8th edition)*. Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017.
3. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017;67(2):122-137 doi: 10.3322/caac.21389.
4. Dolens EDS, Dourado MR, Almangush A, et al. The Impact of Histopathological Features on the Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Comprehensive Review and Meta-Analysis. *Frontiers in oncology*. 2021;11:784924 doi: 10.3389/fonc.2021.784924.
5. Arun I, Maity N, Hameed S, et al. Lymph node characteristics and their prognostic significance in oral squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2021;43(2):520-533 doi: 10.1002/hed.26499.
6. Kothari S, Phan JH, Stokes TH, Wang MD. Pathology imaging informatics for quantitative analysis of whole-slide images. *Journal of the American Medical Informatics Association*. 2013;20(6):1099-1108 doi: 10.1136/amiajnl-2012-001540.
7. Shaban M, Khurram SA, Fraz MM, et al. A Novel Digital Score for Abundance of Tumour Infiltrating Lymphocytes Predicts Disease Free Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Scientific reports*. 2019;9(1):13341 doi: 10.1038/s41598-019-49710-z.
8. Halicek M, Shahedi M, Little JV, et al. Head and Neck Cancer Detection in Digitized Whole-Slide Histology Using Convolutional Neural Networks. *Scientific reports*. 2019;9(1):14043 doi: 10.1038/s41598-019-50313-x.

9. Sung YE, Kim MS, Lee YS. Proposal of a scoring system for predicting pathological risk based on a semiautomated analysis of whole slide images in oral squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2021;43(5):1581-1591 doi: 10.1002/hed.26621.
10. Berben L, Wildiers H, Marcelis L, et al. Computerised scoring protocol for identification and quantification of different immune cell populations in breast tumour regions by the use of QuPath software. *Histopathology*. 2020;77(1):79-91 doi: 10.1111/his.14108.
11. Bankhead P, Fernández JA, McArt DG, et al. Integrated tumor identification and automated scoring minimizes pathologist involvement and provides new insights to key biomarkers in breast cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2018;98(1):15-26 doi: 10.1038/labinvest.2017.131.
12. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Advances in anatomic pathology*. 2017;24(5):235-251 doi: 10.1097/pap.000000000000162.
13. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern pathology*. 2017;30(9):1299-1311 doi: 10.1038/modpathol.2017.46.
14. Wang C, Huang H, Huang Z, et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine*. 2011;40(7):545-551 doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01041.x.
15. van Pelt GW, Kjær-Frifeldt S, van Krieken J, et al. Scoring the tumor-stroma ratio in colon cancer: procedure and

- recommendations. *Virchows Archiv*. 2018;473(4):405-412 doi: 10.1007/s00428-018-2408-z.
16. Dirven R, Ebrahimi A, Moeckelmann N, Palme CE, Gupta R, Clark J. Tumor thickness versus depth of invasion - Analysis of the 8th edition American Joint Committee on Cancer Staging for oral cancer. *Oral oncology*. 2017;74:30-33 doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.09.007.
 17. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*. 2009;115(15):3379-3391 doi: 10.1002/cncr.24396.
 18. Mascitti M, Zhurakivska K, Togni L, et al. Addition of the tumour-stroma ratio to the 8th edition American Joint Committee on Cancer staging system improves survival prediction for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2020;77(5):810-822 doi: 10.1111/his.14202.
 19. Müller S, Boy SC, Day TA, et al. Data Set for the Reporting of Oral Cavity Carcinomas: Explanations and Recommendations of the Guidelines From the International Collaboration of Cancer Reporting. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2019;143(4):439-446 doi: 10.5858/arpa.2018-0411-SA.
 20. Capote-Moreno A, Brabyn P, Muñoz-Guerra MF, et al. Oral squamous cell carcinoma: epidemiological study and risk factor assessment based on a 39-year series. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2020;49(12):1525-1534 doi: 10.1016/j.ijom.2020.03.009.
 21. da Silva Souto AC, Vieira Heimlich F, Lima de Oliveira L, et al. Epidemiology of tongue squamous cell carcinoma: A retrospective cohort study. *Oral diseases*. 2021 doi: 10.1111/odi.13897.
 22. Weckx A, Grochau KJ, Grandoch A, Backhaus T, Zöller JE, Kreppel M. Survival outcomes after surgical treatment of oral squamous cell carcinoma. *Oral diseases*. 2020;26(7):1432-1439 doi: 10.1111/odi.13422.
 23. Hong KO, Oh KY, Shin WJ, Yoon HJ, Lee JI, Hong SD. Tumor budding is associated with poor prognosis of oral squamous cell

- carcinoma and histologically represents an epithelial-mesenchymal transition process. *Human pathology*. 2018;80:123-129 doi: 10.1016/j.humpath.2018.06.012.
24. Attramadal CG, Kumar S, Boysen ME, Dhakal HP, Nesland JM, Bryne M. Tumor Budding, EMT and Cancer Stem Cells in T1-2/N0 Oral Squamous Cell Carcinomas. *Anticancer research*. 2015;35(11):6111-6120 doi:
 25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674 doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
 26. Schmitd LB, Perez-Pacheco C, Bellile EL, et al. Spatial and Transcriptomic Analysis of Perineural Invasion in Oral Cancer. *Clinical cancer research*. 2022;28(16):3557-3572 doi: 10.1158/1078-0432.ccr-21-4543.
 27. Wei PY, Li WY, Tai SK. Discrete Perineural Invasion Focus Number in Quantification for T1-T2 Oral Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngology--head and neck surgery*. 2019;160(4):635-641 doi: 10.1177/0194599818808510.
 28. Alkhadar H, Macluskey M, White S, Ellis I. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: Incidence, prognostic impact and molecular insight. *Journal of oral pathology & medicine*. 2020;49(10):994-1003 doi: 10.1111/jop.13069.
 29. Misztal CI, Green C, Mei C, et al. Molecular and Cellular Mechanisms of Perineural Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma: Potential Targets for Therapeutic Intervention. *Cancers*. 2021;13(23) doi: 10.3390/cancers13236011.
 30. Zhou C, Diao P, Wu Y, et al. Development and validation of a seven-immune-feature-based prognostic score for oral squamous cell carcinoma after curative resection. *International journal of cancer*. 2020;146(4):1152-1163 doi: 10.1002/ijc.32571.
 31. Tham T, Bardash Y, Herman SW, Costantino PD. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a prognostic indicator in head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Head & neck*. 2018;40(11):2546-2557 doi: 10.1002/hed.25324.

32. Mariani P, Russo D, Maisto M, et al. Pre-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma: Meta-analysis and trial sequential analysis. *Journal of oral pathology & medicine*. 2022;51(1):39-51 doi: 10.1111/jop.13264.
33. Yang L, Huang Y, Zhou L, Dai Y, Hu G. High pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of poor survival prognosis in head and neck squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Head & neck*. 2019;41(5):1525-1535 doi: 10.1002/hed.25583.
34. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell*. 2009;16(3):183-194 doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017.
35. Yu T, Tang Q, Chen X, et al. TGF- β 1 and IL-17A mediate the protumor phenotype of neutrophils to regulate the epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine*. 2021;50(4):353-361 doi: 10.1111/jop.13122.
36. Ling Z, Cheng B, Tao X. Epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: Challenges and opportunities. *International journal of cancer*. 2021;148(7):1548-1561 doi: 10.1002/ijc.33352.

FIGURES

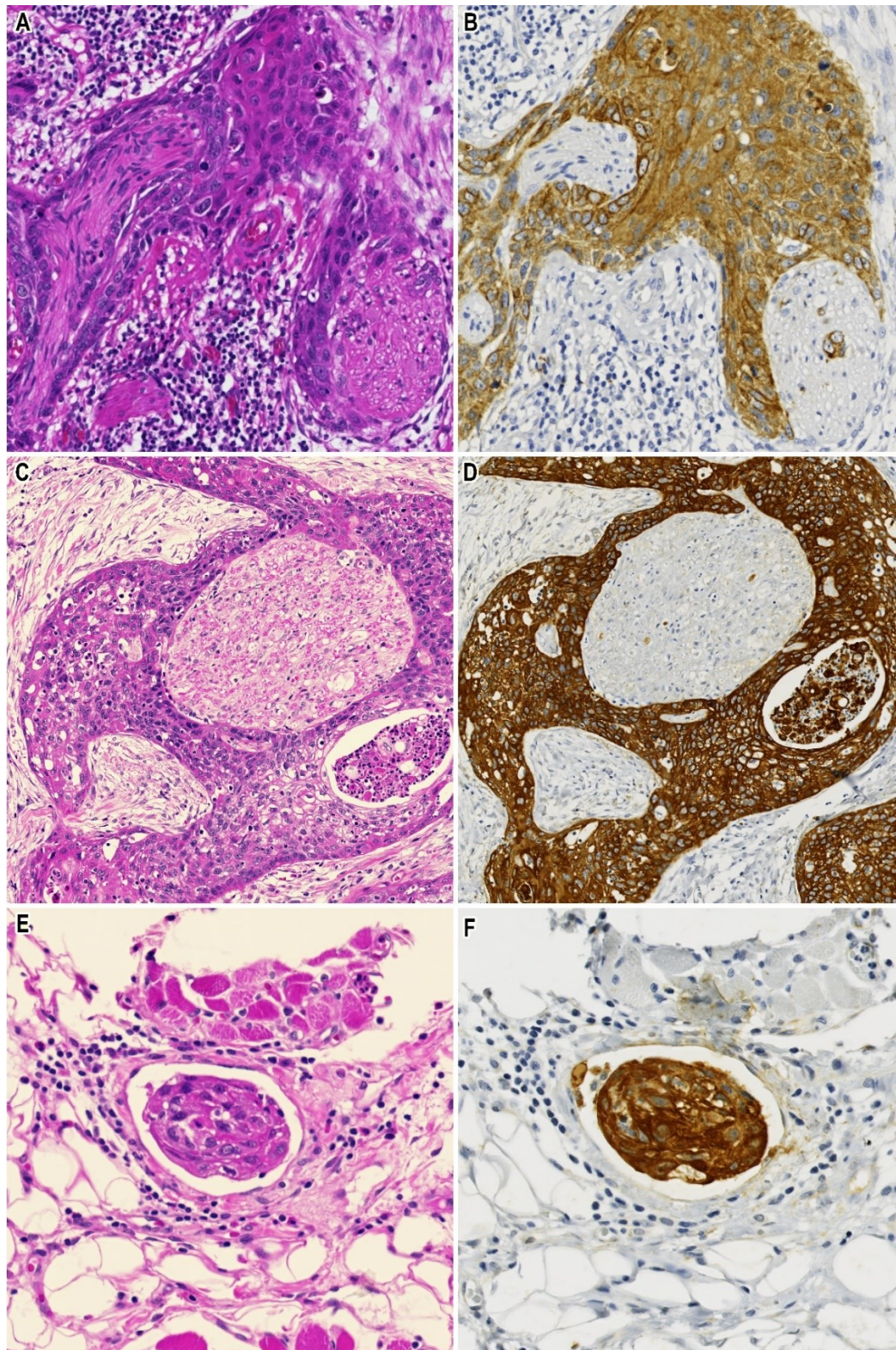


Figure 1: (A-D) Perineural invasion. (A) Hematoxylin and eosin-stained image showing partial encirclement of the nerve sheath by tumoral cells. (B) The same region seen in (A) stained with cytokeratin and showing invasion of the nerve sheath by tumoral cells. (C) Hematoxylin and eosin-stained and (D) cytokeratin-immunostained images showing complete encirclement of the nerve sheath by tumoral cells. (E) Hematoxylin and eosin-stained and (F) cytokeratin-immunostained image showing tumoral cells within the vascular space.

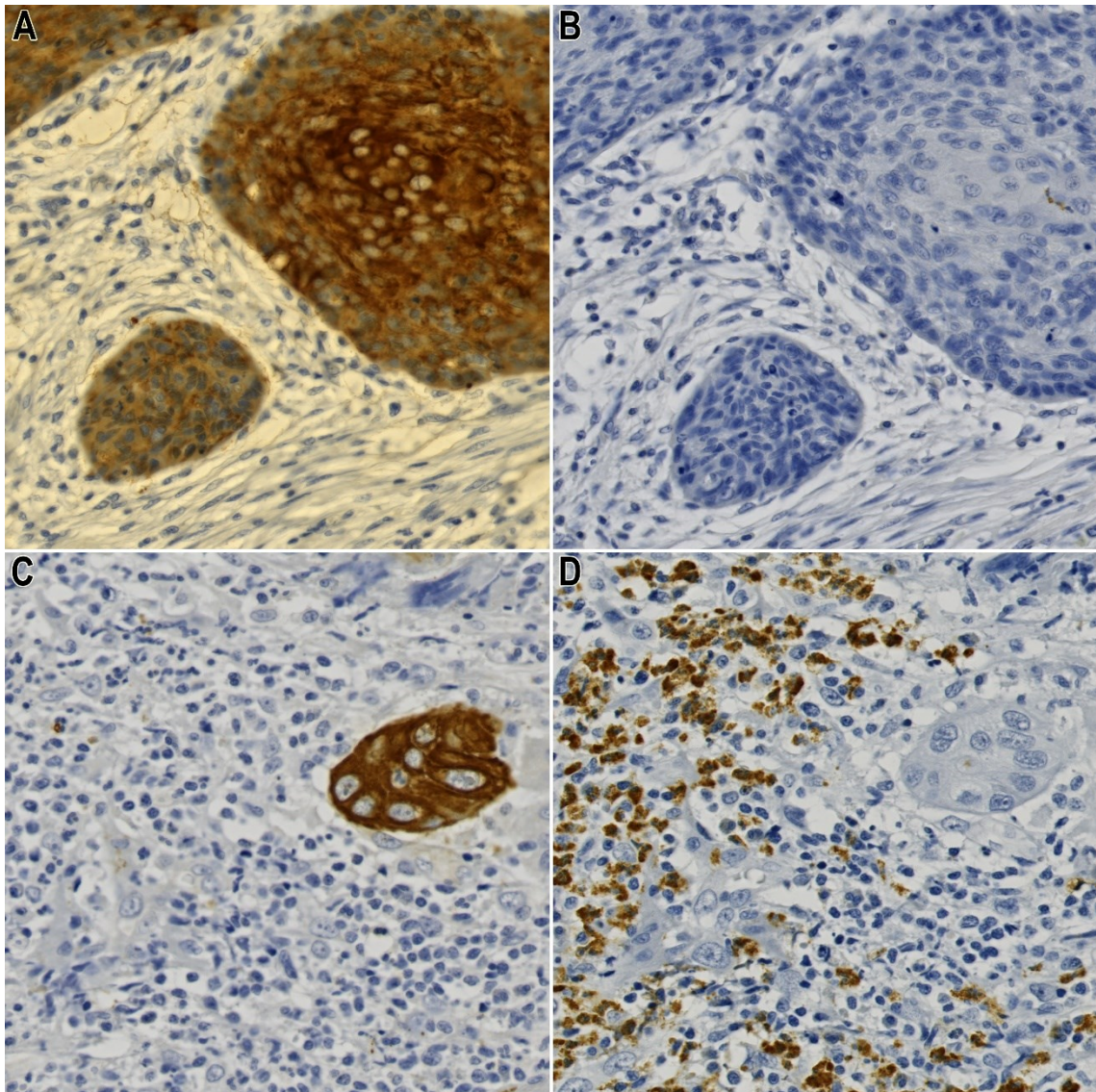


Figure 2: (A) Cytokeratin-immunostained and (B) CD66b-immunostained images showing low infiltration of CD66b positive cells at the invasive front of cohesive tumors. (C) Cytokeratin-immunostained and (D) CD66b-immunostained images showing high infiltration of CD66b positive cells at the invasive front of non-cohesive tumors.

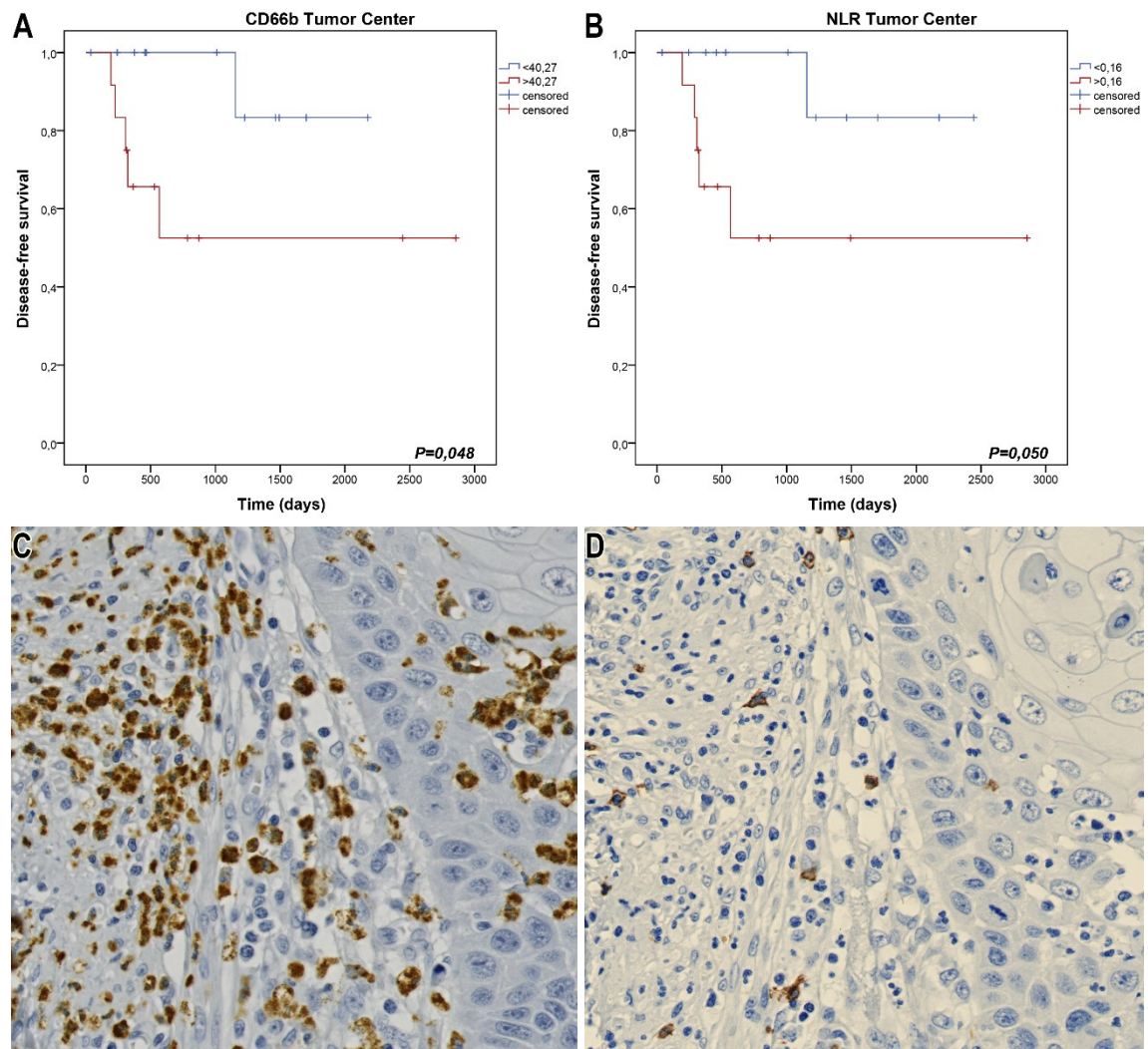


Figure 3: (A) Kaplan-Meier survival curve of disease-free survival comparing high CD66b and low CD66b (cut-off point: 40,27 cells/mm²) at the tumor center. (B) Kaplan-Meier survival curve of disease-free survival comparing high neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and low NLR (cut-off point: 0,16) at the tumor center. (C) CD66b-immunostained and (D) CD8-immunostained images of the tumor center of the same region exhibiting high CD66b and low CD8 positive cells/mm².

Table 1: Clinical features of the sample

Clinical features		N (%)
Age	<60	18 (58.1)
	>60	13 (41.9)
Sex	Male	24 (77.4)
	Female	7 (22.6)
Smoking	No	4 (12.9)
	Yes	27 (87.1)
Drinking	No	6 (20.0)
	Yes	23 (76.7)
Site	Tongue	15 (48.4)
	Floor of the mouth	6 (19.4)
	Other	10 (32.3)
T*	T1	11 (35.48)
	T2	6 (29.03)
	T3	6 (19.36)
	T4	3 (9.68)
N*	N-	20 (64.51)
	N+	5 (16.13)
Stage*	I	8 (25.80)
	II	6 (19.36)
	III	3 (9.68)
	IV	7 (22.58)
HG	Well	9 (29.0)
	Moderate	19 (61.3)
	Poor	3 (9.7)
PNI	No	20 (64.5)
	Yes	11 (35.5)
LVI	No	23 (74.2)
	Yes	8 (25.8)
PI	Cohesive	5 (16.1)
	Non-cohesive	14 (45.2)
	Dispersed	12 (38.7)
TB	<5	4 (12.9)
	≥5	27 (87.1)
TSR	≥1 – low stroma	8 (25.8)
	<1 – high stroma	23 (74.2)
Treatment	Resection	14 (45.2)
	Resection + RQT	7 (22.6)
	Resection + RT	10 (32.3)
Outcome event	No	21 (67.74)
	Yes	10 (32.26)

T, tumor size; N, lymph node involvement; HG, histopathological grade; NI, not informed; PNI, perineural invasion; LVI, lymphovascular invasion; PI, pattern of invasion; TB, tumor budding; TSR, tumor-stroma ratio; RQT, radio-chemotherapy; RT, radiotherapy. * There was missing data on T stage (2 patients), N stage (6 patients), and clinical stage (7 patients).

Table 2: Tumor-stroma ratio (TSR), Depth of invasion (DOI), Tumor thickness (TT), and Tumor budding according to clinical features.

		TSR		DOI		TT		TB	
		Mean (SD)	P	Mean (SD)	P	Mean (SD)	P	Median (IQR)	P
Age	<60	0.72 (0.43)	0.778	5.85 (3.96)	0.987	7.07 (4.65)	0.961	17 (32)	0.737
	>60	0.68 (0.40)		5.82 (3.85)		6.99 (3.98)		16 (19)	
Sex	Male	0.65 (0.32)	0.366	5.70 (3.96)	0.755	7.23 (4.64)	0.654	18 (29)	0.274
	Female	0.92 (0.65)		6.33 (3.61)		6.38 (3.10)		11 (14)	
Smoking	No	0.96 (0.51)	0.255	6.22 (5.11)	0.857	6.54 (3.98)	0.808	11 (15)	0.262
	Yes	0.67 (0.40)		5.78 (3.75)		7.11 (4.42)		18 (29)	
Drinking	No	0.80 (0.43)	0.703	5.30 (4.55)	0.738	8.07 (5.08)	0.581	18 (28)	0.896
	Yes	0.72 (0.41)		6.07 (3.95)		6.92 (4.32)		16 (19)	
Site	Tongue+FOM	0.73 (0.43)	0.645	5.91 (3.87)	0.899	6.71 (3.92)	0.55	16 (22)	0.441
	Other	0.65 (0.40)		5.69 (3.97)		7.72 (5.18)		20 (28)	
T	T1/T2	0.63 (0.33)	0.551	6.02 (4.07)	0.628	6.57 (4.13)	0.233	14 (22)	0.32
	T3/T4	0.72 (0.41)		4.97 (2.45)		8.74 (4.78)		19 (25)	
N	N-	0.63 (0.32)	0.675	5.12 (3.58)	0.187	6.00 (4.08)	0.416	11 (23)	0.408
	N+	0.55 (0.43)		8.18 (3.37)		7.63 (3.13)		18 (7)	
Stage	I/II	0.61 (0.34)	0.935	5.21 (3.79)	0.497	5.69 (4.00)	0.282	9 (24)	0.419
	III/IV	0.60 (0.35)		6.45 (3.40)		7.47 (3.68)		18 (8)	
HG	Well	0.56 (0.25)	0.185	4.58 (4.06)	0.247	5.63 (4.74)	0.466	5 (9) ^a	0.001
	Moderate	0.80 (0.44)		6.87 (3.71)		7.43 (3.80)		19 (27) ^b	
	Poor	0.40 (0.29)		3.02 (.65)		8.75 (6.61)		62 (39) ^b	
Outcome	No	0.68 (0.38)	0.620	6.01 (3.46)	0.779	7.38 (4.20)	0.528	18 (23)	0.327
	Yes	0.76 (0.50)		5.52 (4.65)		6.32 (4.67)		8 (22)	

TSR, tumor-stroma ratio; DOI, depth of invasion; TT, tumor thickness; TB, tumor budding; SD, standard deviation; IQR, interquartile range; P, P value; FOM, floor of the mouth; T, tumor size; N, lymph node involvement; HG, Histopathological grade. TSR, DOI, and TT: T student's test (2 groups) and ANOVA test (3 groups). TB: Mann-Whitney's test (2 groups) and Kruskal-Wallis' test (3 groups). Statistical significance: P<0,05 (highlighted in bold). Superscript different letters indicate statistical difference between groups.

Table 3: Tumor-stroma ratio (TSR), Depth of invasion (DOI), Tumor thickness (TT), and Tumor budding according to histopathological features.

		TSR		DOI		TT		TB	
		Mean (SD)	P	Mean (SD)	P	Mean (SD)	P	Median (IQR)	P
PI	Cohesive	0.83 (0.15)	0.244	1.90 (3.03) ^a	0.042	2.37 (3.14) ^a	0.003	0.0 (1.0) ^a	0.001
	Non-cohesive	0.82 (0.46)		5.91 (3.64) ^{ab}		6.59 (3.51) ^{ab}		16.0 (16.0) ^a	
	Dispersed	0.55 (0.34)		7.51 (3.28) ^b		9.51 (3.95) ^b		32.0 (43.75) ^b	
PNI	No	0.70 (0.40)	0.97	4.94 (3.60)	0.089	5.32 (3.45)	0.001	8.5 (19.75)	0.002
	Yes	0.71 (0.46)		7.89 (3.74)		10.16 (4.05)		37.0 (46.0)	
LVI	No	0.67 (0.33)	0.506	5.50 (3.90)	0.369	6.46 (4.18)	0.210	11.0 (20.0)	0.018
	Yes	0.79 (0.59)		7.44 (3.37)		8.70 (4.51)		33.5 (47.5)	

PI, pattern of invasion; PNI, perineural invasion; LVI, lymphovascular invasion; TSR, tumor-stroma ratio; TB, tumor budding; DOI, depth of invasion; TT, tumor thickness; SD, standard deviation; IQR, interquartile range; P, P value. TSR, DOI, and TT: T student's test (2 groups) and ANOVA test (3 groups, post-hoc: Tuckey's test). TB: Mann-Whitney's test (2 groups) and Kruskal-Wallis' test (3 groups). Statistical significance: P<0,05 (highlighted in bold). Superscript different letters indicate statistical difference between groups.

Table 4: A) Perineural invasion (PNI) and lymphovascular invasion (LVI) according to the pattern of invasion; **B)** LVI according to the PNI.

A)		PNI		P	LVI		P
		No	Yes		No	Yes	
		N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
PI	Cohesive	5 (100.0)	0 (0)	0.001	5 (100.0)	0 (0)	0.256
	Non-cohesive	12 (85.7)	2 (14.3)		11 (78.6)	3 (21.4)	
	Dispersed	3 (25.0)	9 (75.0)		7 (58.3)	5 (41.7)	

B)		LVI		P
		No	Yes	
		N (%)	N (%)	
PNI	No	17 (85.0)	3 (15.0)	0.095
	Yes	6 (54.5)	5 (45.5)	

PI, pattern of invasion; PNI, perineural invasion; LVI, lymphovascular invasion; P, P value. Fisher's exact test. Statistical significance: $P < 0,05$ (highlighted in bold).

Table 5: Median (interquartile range) of positive CD66b/mm², CD8/mm², and neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) according to histopathological features.

	PI			PNI		LVI	
	Cohesive	Non-cohesive	Dispersed	No	Yes	No	Yes
CD66b IF	6.76 (38.39) ^a	75.55 (281.43) ^b	29.88 (68.82) ^{ab}	24,81 (65,79)	45,67 (243,75)	26,21 (109,17)	48,23 (152,34)
P		0.049			0.261		0.437
CD66b TC	81.32 (0.00)	72.49 (168.18)	12.37 (55.10)	52,61 (95,89)	8,62 (105,64)	40,27 (79,86)	45,34 (156,04)
P		0.38			0.572		0.754
CD66b WT	6.76 (35.49)	47.45 (120.90)	21.85 (52.02)	29,98 (46,12)	22,09 (119,82)	23,84 (47,93)	47,07 (125,37)
P		0.245		0.359		0,386	
CD8 IF	184.79 (86.02)	259.72 (374.81)	315.20 (226.84)	212,28 (311,54)	385,81 (360,06)	239,77 (256,51)	478,89 (327,19)
P		0.78		0.338		0.121	
CD8 TC	160.37 (0.00)	157.52 (412.69)	167.86 (284.14)	126,58 (291,14)	214,41 (395,28)	121,31 (299,95)	218,10 (575,03)
P		0.946		0.687		0.475	
CD8 WT	154.95 (151.03)	133.65 (273.91)	256.19 (268.82)	146,47 (211,57)	275,71 (835,02)	154,95 (248,47)	323,14 (555,80)
P		0.513		0.279		0.237	
NLR IF	0.04 (0.21)	0.26 (1.79)	0.08 (0.09)	0,15 (0,26)	0,13 (0,68)	0,17 (0,37)	0,09 (0,41)
P		0.112		0.555		0.982	
NLR TC	0.44 (0.00)	1.02 (2.21)	0.05 (0.26)	0,43 (1,76)	0,06 (0,57)	0,41 (0,83)	0,04 (1,05)
P		0.263		0.403		0.588	
NLR WT	0.04 (0.3)	0.39 (1.64)	0.09 (0.1)	0,15 (0,42)	0,09 (0,52)	0,12 (0,52)	0,04 (0,44)
P		0.080		1.000		0.877	

PI, pattern of invasion; PNI, perineural invasion; LVI, lymphovascular invasion; IF, invasive front; TC, tumor center; WT, whole tumor; NLR, neutrophil-lymphocyte ratio. Mann-Whitney's test (2 groups) and Kruskal-Wallis' test (3 groups). Statistical significance set at P<0,05 (highlighted in bold). Superscript different letters indicate statistical difference between groups.

Supplementary material

Semi-automated count of immunohistochemical markers

One examiner blinded to the clinical features performed the semi-automated count, after an initial calibration (intra-observer agreement: 0.98 [CD66b] and 0.979 [CD8]). The agreement between manual and semi-automated methods was tested on 208 randomly chosen 1mm² fields from 46 oral squamous cell carcinoma samples. The agreement was considered excellent.

Table: Agreement between manual and semi-automated methods.

	CD66B	CD8
Intraclass correlation coefficient	0.96	0.99
Sperman's correlation coefficient	0.97	0.98
Average of differences	1.37	-1.25
Standard deviation	39.74	40.62
Upper limit	79.27	78.37
Lower limit	-76.53	-80.86

Workflow

The workflow for the semi-automated analysis was as follows:

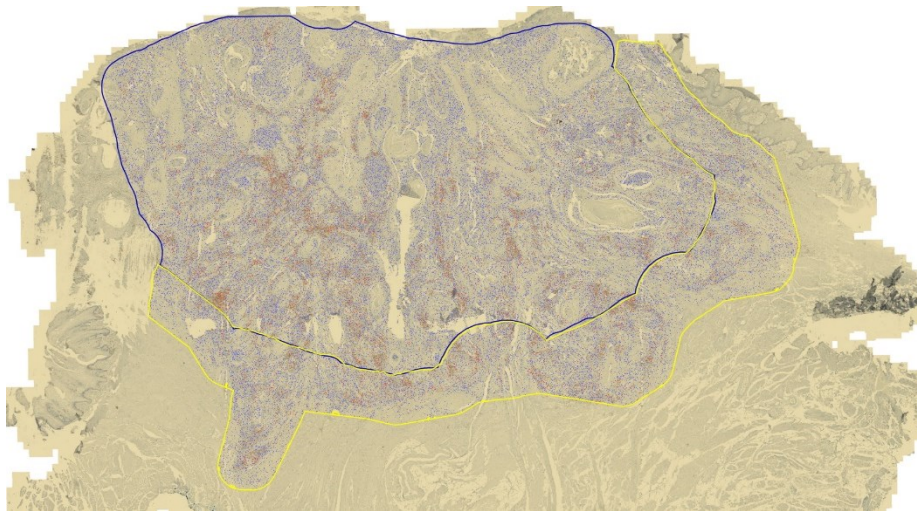
- a) Creation of an annotation around each tumoral region of analysis: invasive front, tumor center, and whole tumor (invasive front + tumor center).
- b) "Estimate stain vectors" command to improve stain separation.
- c) "Analyze → Cell detection → Fast cell count".
- d) The parameters for the semi-automated count for each immunohistochemical marker were:

CD8: // Detect positive (and negative) cells by counting smoothed peaks with 'Fast cell counts (brightfield)' command; selectAnnotations(); runPlugin('qupath.opencv.CellCountsCV', '{"stainChannel": "Hematoxylin + DAB", "gaussianSigmaMicrons": 2.0, "backgroundRadiusMicrons": 15.0, "doDoG": false, "threshold": 0.15, "thresholdDAB": 0.25, "detectionDiameter": 25.0}').

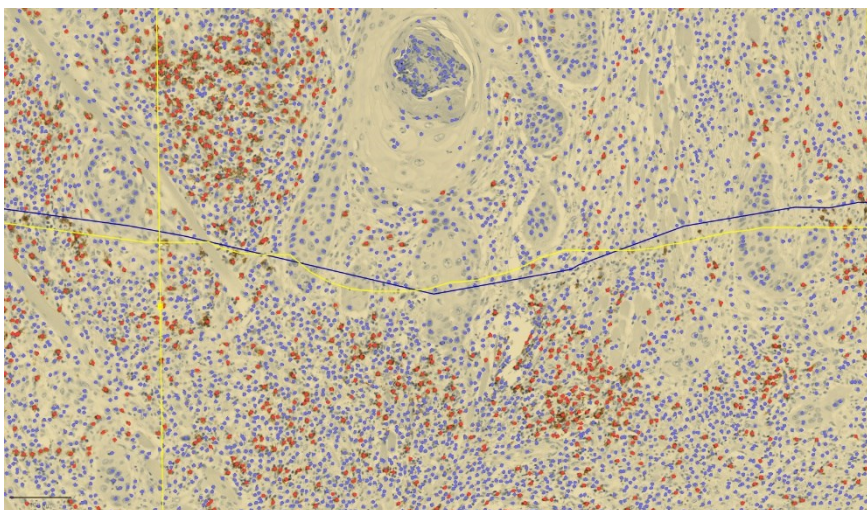
CD66B : // Detect positive (and negative) cells by counting smoothed peaks with 'Fast cell counts (brightfield)' command; selectAnnotations(); runPlugin('qupath.opencv.CellCountsCV', '{"stainChannel":

"Hematoxylin + DAB", "gaussianSigmaMicrons": 2.0, "backgroundRadiusMicrons": 15.0, "doDoG": false, "threshold": 0.15, "thresholdDAB": 0.6, "detectionDiameter": 25.0}').

- e) The program provides the number of positive cells per mm^2 automatically for each annotation in the image.
- f) One examiner performed each step individually to every case of the sample.



Results from the "fast cell count" to detect CD8 positive cell. The blue annotation delimits the tumor center, and the yellow annotation delimits the invasive front. The whole tumor is the sum of the two regions.



Results from the "fast cell count" to detect CD8 positive cell. Red dots correspond to positive cells and blue dots correspond to negative cells.

Effect size calculation ¹⁻³:

a) Effect size Mann-Whitney's test (r):

$$r = z / \sqrt{n}$$

*z: provided by SPSS after Mann-Whitney's test

n: group size

Formula for z:

$$z^* = \frac{U - \frac{n_1 \times n_2}{2} - 0,5}{\sqrt{n_1 \times n_2 \times \frac{(n_1 + n_2 + 1)}{12}}}$$

Values of r and effect size conclusion:

<0,1: Irrisory

<0,3: Small

<0,5: Medium

>0,5: Large

b) Effect size for Student's T-test (Hedge's g):

$$\text{Hedge's } g = \text{Cohen's } d \times (1 - 3 / 4 \times [n_1 + n_2]^{-9})$$

Cohen's $d = (\text{Median group 1} / \text{Median group 2}) / \text{combined standard deviation}$

*n: sample size of the group

Hedge's g values and effect size conclusion:

<0,1: Null

<0,2: Very small

<0,5: Small

<0,8 Medium

<1,2: Large

>1,2: Very large

References:

1. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd ed. Hillsdale, NJ: Routledge; 1988.
2. Fritz CO, Morris PE, Richler JJ. Effect size estimates: current use, calculations, and interpretation. *Journal of experimental psychology. General*. 2012;141(1):2-18.
3. Kerby DS. The simple difference formula: An approach to teaching nonparametric correlation. *Comprehensive Psychology*. 2014;3:11. IT. 13.11.

Supplementary tables

Table 1S: Case by case comparison between depth of invasion (DOI) and tumor thickness (TT).

DOI	TT	DOI-TT
6.6	5.15	1.45
6.63	6.58	0.05
0.4	0.60	-0.20
2.94	3.12	-0.18
6.4	6.58	-0.18
0.358	0.93	-0.57
8.6	9.20	-0.60
12.01	12.62	-0.61
7.99	8.98	-0.99
5.07	6.02	-0.95
0.4	1.90	-1.50
6.82	8.58	-1.76
12.4	12.70	-0.30
6.79	7.40	-0.61
3.48	4.00	-0.52
6.57	8.16	-1.59
13.32	14.31	-0.99
9.7	9.52	0.18
1.33	1.48	-0.15
1.74	2.12	-0.38
2.56	5.96	-3.40
5.7	5.80	-0.10
6.45	7.90	-1.45

DOI, depth of invasion; TT, tumor thickness.

Table 2S: Correlation between depth of invasion (DOI), tumor thickness (TT), tumor-stroma ratio (TSR), and tumor budding (TB).

		DOI	TT	TSR
DOI	Pearson's coefficient	1	.971**	.342
	P value		.000	.130
TT	Pearson's coefficient	.971**	1	.073
	P value	.000		.711
TSR	Pearson's coefficient	.342	.073	1
	P value	.130	.711	
TB	Spearman's coefficient	.314	.407*	-.184
	P value	.145	.023	.348

DOI, depth of invasion; TT, tumor thickness, TSR, tumor-stroma ratio; TB, tumor budding. Statistical difference set at $P < 0,05$. Bold letters indicates statistical differences.

Table 3S: Descriptive measures of the number of positive CD66b, CD8 and neutrophil-lymphocyte ratio (NLR), according to tumoral regions.

		25 percentile	Median	75 percentile	90 percentile
CD66b	Invasive front	10.46	34.89	119.49	360.47
CD66b	Tumor center	6.85	40.27	107.76	340.78
CD66b	Whole tumor	6.76	23.84	72.04	350.61
CD8	Invasive front	135.08	287.36	491.84	741.71
CD8	Tumor center	57.11	160.37	361.78	838.78
CD8	Whole tumor	105.87	194.10	370.58	920.31
NLR	Invasive front	0.04	0.13	0.40	2.16
NLR	Tumor center	0.04	0.16	1.26	2.57
NLR	Whole tumor	0.05	0.12	0.56	2.08

NLR, neutrophil to lymphocyte ratio.

Table 4S: Median (interquartile range) of the positive CD66b/mm² for each tumoral region, according to clinical features.

		IF		TC		WT	
		Median (IQR)	<i>P</i>	Median (IQR)	<i>P</i>	Median (IQR)	<i>P</i>
Age	<60	38.45 (94.14)	0.984	20.31 (126.80)	0.851	21.85 (52.09)	0.594
	>60	26.21 (132.26)		47.15 (105.25)		36.12 (99.78)	
Sex	Male	38.45 (106.74)	0.908	40.27 (105.64)	0.926	23.05 (70.37)	0.872
	Female	26.21 (294.14)		27.24 (263.98)		36.12 (65.73)	
Smoking	No	156.83 (562.31)	0.842	7.34 (762.97)	0.969	33.53 (432.16)	0.932
	Yes	34.89 (107.03)		43.71 (99.29)		23.84 (65.14)	
Drinking	No	45.59 (382.60)	0.813	16.11 (406.85)	1.000	34.66 (180.00)	0.896
	Yes	42.00 (108.23)		57.42 (110.12)		23.84 (78.18)	
Site	Tongue+FOM	42 (107.03)	0.983	32.39 (85.09)	0.934	23.84 (53.59)	1.000
	Other	30.55 (109.17)		47.15 (107.45)		29.19 (121.05)	
T	T1/T2	22.59 (121.83)	0.277	40.27 (115.50)	0.804	23.05 (89.23)	0.801
	T3/T4	40.07 (260.13)		16.11 (73.76)		29.10 (31.20)	
N	N-	21.20 (91.47)	0.447	23.92 (78.41)	0.444	22.73 (45.53)	0.621
	N+	33.56 (161.60)		24.51 (167.39)		22.09 (153.97)	
Stage	I/II	13.63 (92.02)	0.057	7.04 (84.26)	0.310	8.58 (51.41)	0.329
	III/IV	45.26 (153.73)		35.83 (108.81)		36.12 (76.92)	
HG	Well	26.21 (77.40)	0.545	47.15 (425.29)	0.372	23.84 (78.27)	0.619
	Moderate	45.26 (224.69)		24.51 (102.00)		38.03 (78.18)	
	Poor	34.89 (45.97)		16.11 (56.76)		18.42 (46.38)	
Outcome	No	33.56 (45.97)	0.201	12.37 (67.91)	0.064	21.61 (47.79)	0.201
	Yes	75.55 (240.77)		103.23 (227.98)		41.01 (107.10)	

IF, invasive front; TC, tumor center; WT, whole tumor; IQR, interquartile range; P, P value; FOM, floor of the mouth; T, tumor size; N, lymph node involvement; Histopathological grade. Mann-Whitney's test (2 groups) and Kruskal-Wallis' test (3 groups). Statistical significance: P<0,05.

Table 5S: Median (interquartile range) of the positive CD8/mm² for each tumoral region, according to clinical features.

		IF		TC		WT	
		Median (IQR)	<i>P</i>	Median (IQR)	<i>P</i>	Median (IQR)	<i>P</i>
Age	<60	263.60 (306.39)	0.312	140.09 (203.76)	0.317	174.52 (253.54)	0.352
	>60	287.36 (477.99)		286.89 (485.71)		297.96 (705.83)	
Sex	Male	246.33 (347.56)	0.253	160.37 (290.71)	0.877	174.52 (284.81)	0.800
	Female	374.75 (393.22)		222.72 (413.86)		297.96 (424.49)	
Smoking	No	476.13 (785.04)	0.214	352.65 (749.57)	0.783	440.08 (643.25)	0.441
	Yes	252.89 (336.33)		140.84 (290.97)		154.95 (198.43)	
Drinking	No	439.74 (573.17)	0.356	343.41 (539.35)	1.000	349.31 (569.23)	0.694
	Yes	252.89 (330.86)		140.84 (260.07)		154.95 (176.67)	
Site	Tongue+FOM	252.89 (246.46)	0.884	106.30 (230.11)	0.229	154.95 (200.42)	0.693
	Other	354.59 (378.90)		286.89 (249.59)		298.04 (264.71)	
T	T1/T2	212.03 (320.05)	0.202	77.09 (276.70)	0.065	143.96 (298.87)	0.170
	T3/T4	364.39 (291.08)		343.41 (592.02)		286.84 (525.38)	
N	N-	270.13 (265.95)	0.336	191.08 (325.28)	0.444	215.38 (274.63)	0.272
	N+	117.02 (661.97)		61.52 (442.43)		56.98 (508.83)	
Stage	I/II	270.16 (391.64)	0.357	221.78 (395.28)	0.717	248.77 (393.77)	0.357
	III/IV	184.79 (256.12)		140.09 (279.56)		154.95 (233.54)	
HG	Well	252.89 (235.87)	0.447	119.81 (298.67)	0.435	236.67 (186.71)	0.559
	Moderate	342.96 (369.58)		214.41 (436.08)		194.10 (704.95)	
	Poor	129.61 (442.48)		37.01 (319.88)		54.13 (326.85)	
Outcome	No	239.77 (286.77)	0.416	140.09 (294.29)	0.270	194.10 (56.98)	0.574
	Yes	380.44 (369.58)		286.89 (355.20)		218.89 (424.49)	

IF, invasive front; TC, tumor center; WT, whole tumor; IQR, interquartile range; P, P value; FOM, floor of the mouth; T, tumor size; N, lymph node involvement; Histopathological grade. Mann-Whitney's test (2 groups) and Kruskal-Wallis' test (3 groups). Statistical significance: P<0,05.

Table 6S: Median (interquartile range) of the neutrophil-lymphocyte ratio for each tumoral region, according to clinical features.

		IF		TC		WT	
		Median (IQR)	<i>P</i>	Median (IQR)	<i>P</i>	Median (IQR)	<i>P</i>
Age	<60	0.18 (0.27)	0.570	0.25 (1.63)	0.940	0.20 (0.40)	0.710
	>60	0.08 (1.21)		0.16 (0.85)		0.07 (0.85)	
Sex	Male	0.15 (0.33)	0.560	0.16 (0.57)	0.830	0.11 (0.35)	0.950
	Female	0.07 (1.90)		0.89 (1.82)		0.12 (1.70)	
Smoking	No	0.96 (2.11)	0.842	1.63 (2.03)	0.783	0.86 (2.05)	0.887
	Yes	0.13 (0.26)		0.15 (0.64)		0.12 (0.36)	
Drinking	No	0.23 (1.97)	0.937	1.63 (2.28)	0.538	0.49 (1.82)	1.000
	Yes	0.13 (0.26)		0.27 (0.64)		0.12 (0.37)	
Site	Tongue+FOM	0.13 (0.26)	0.950	0.43 (1.167)	0.357	0.18 (0.52)	0.819
	Other	0.12 (0.70)		0.15 (0.34)		0.09 (0.36)	
T	T1/T2	0.14 (0.76)	0.836	0.41 (1.80)	0.288	0.11 (0.97)	0.836
	T3/T4	0.11 (0.19)		0.06 (0.34)		0.11 (0.27)	
N	N-	0.08 (0.23)	0.243	0.14 (0.46)	0.559	0.10 (0.26)	0.243
	N+	0.24 (2.37)		0.41 (3.71)		0.36 (2.94)	
Stage	I/II	0.06 (0.25)	0.136	0.13 (0.58)	0.545	0.06 (0.25)	0.108
	III/IV	0.22 (1.17)		0.28 (1.98)		0.27 (1.38)	
HG	Well	0.08 (1.08)	0.849	0.46 (1.99)	0.509	0.12 (0.98)	0.952
	Moderate	0.18 (0.39)		0.16 (0.72)		0.12 (0.52)	
	Poor	0.17 (0.33)		0.05 (2.55)		0.10 (0.89)	
Outcome	No	0.10 (0.26)	0.633	0.09 (0.04)	0.244	0.09 (0.31)	0.416
	Yes	0.18 (0.34)		0.61 (0.16)		0.23 (0.07)	

IF, invasive front; TC, tumor center; WT, whole tumor; IQR, interquartile range; P, P value; FOM, floor of the mouth; T, tumor size; N, lymph node involvement; Histopathological grade. Mann-Whitney's test (2 groups) and Kruskal-Wallis' test (3 groups). Statistical significance: $P < 0.05$.

Table 7S: Spearman's correlation coefficient between immunohistochemical and histopathological features.

		CD66b			CD8			NLR		
		IF	TC	WT	IF	TC	WT	IF	TC	WT
CD66 IF	Spearman's coefficient	1.000	.737**	.894**	-.113	.084	-.078	.848**	.647**	.803**
	P value		.000	.000	.547	.690	.676	.000	.000	.000
CD66 TC	Spearman's coefficient	.737**	1.000	.898**	-.068	.241	.142	.607**	.723**	.685**
	P value	.000		.000	.748	.246	.497	.001	.000	.000
CD66 WT	Spearman's coefficient	.894**	.898**	1.000	-.051	.155	.013	.783**	.736**	.811**
	P value	.000	.000		.786	.458	.947	.000	.000	.000
CD8 IF	Spearman's coefficient	-.113	-.068	-.051	1.000	.796**	.869**	-.543**	-.538**	-.537**
	P value	.547	.748	.786		.000	.000	.002	.005	.002
CD8 TC	Spearman's coefficient	.084	.241	.155	.796**	1.000	.921**	-.375	-.442*	-.400*
	P value	.690	.246	.458	.000		.000	.064	.027	.048
CD8 WT	Spearman's coefficient	-.078	.142	.013	.869**	.921**	1.000	-.484**	-.474*	-.513**
	P value	.676	.497	.947	.000	.000		.006	.017	.003
NLR IF	Spearman's coefficient	.848**	.607**	.783**	-.543**	-.375	-.484**	1.000	.786**	.957**
	P value	.000	.001	.000	.002	.064	.006		.000	.000
NLR TC	Spearman's coefficient	.647**	.723**	.736**	-.538**	-.442*	-.474*	.786**	1.000	.906**
	P value	.000	.000	.000	.005	.027	.017	.000		.000
NLR WT	Spearman's coefficient	.803**	.685**	.811**	-.537**	-.400*	-.513**	.957**	.906**	1.000
	P value	.000	.000	.000	.002	.048	.003	.000	.000	
TSR	Spearman's coefficient	.113	.005	.103	.293	.007	.019	.004	.086	.014
	P value	.568	.980	.601	.131	.975	.924	.982	.682	.944
TB	Spearman's coefficient	.230	-.454*	.035	.129	.044	.083	.078	-.493*	-.026
	P value	.213	.023	.851	.488	.833	.659	.678	.012	.891
DOI	Spearman's coefficient	.267	.079	.282	-.013	-.148	-.166	.295	.170	.333
	P value	.217	.754	.192	.952	.559	.449	.172	.499	.121
TT	Spearman's coefficient	.386*	.116	.345	.107	.093	.048	.339	.071	.313
	P value	.032	.580	.057	.568	.658	.799	.062	.735	.086

IF, invasive front; TC, tumor center; WT, whole tumor; TSR, tumor-stroma ratio; TB, tumor budding; DOI, depth of invasion; TT, tumor thickness. Statistical difference set at P<0,05; Bold letters indicate statistical differences.

Table 8S: Results of the Kaplan-Meier analysis for disease-free survival. Time until event (days), 95% confidence intervals, and P values.

DFS		Number of events	Time	95% confidence interval		P
Treatment	Surgery	7	1433.193	794.870	2071.516	0.060
	Surgery + RQT	3	2351.353	1832.750	2869.956	
Age	<60	4	2133.172	1527.078	2739.267	0.137
	>60	6	1449.167	745.846	2152.488	
Sex	Male	7	1967.078	1434.974	2499.182	0.464
	Female	3	1376.333	521.996	2230.671	
Smoking	No	2	1242.750	328.110	2157.390	0.496
	Yes	8	1960.070	1460.658	2459.482	
Drinking	No	2	1476.667	697.101	2256.232	0.928
	Yes	8	1852.175	1314.076	2390.274	
Site	Tongue+FOM	7	1480.464	1077.454	1883.474	0.848
	Other	3	2054.000	1309.714	2798.286	
T	1 2	8	1679.969	1133.140	2226.799	0.203
	3 4	1	2532.250	1940.516	3123.984	
N	No	7	-*	-	-	0.142
	Yes	0	-	-	-	
Stage	I/II	6	1671.186	1041.159	2301.213	0.175
	III/IV	1	2202.778	1757.022	2648.534	
HG	Well	3	-	-	-	0.695
	Moderate	7	-	-	-	
	Poor	0	-	-	-	
PI	Cohesive	1	2251.800	1394.195	3109.405	0.629
	Non-cohesive	6	1651.707	979.330	2324.084	
	Dispersed	3	1718.424	1029.721	2407.127	
PI	Cohesive	1	2251.800	1394.195	3109.405	0.408
	Non-cohesive/dispersed	9	1781.287	1246.146	2316.428	
PNI	No	8	1695.964	1158.901	2233.027	0.353
	Yes	2	2197.091	1377.349	3016.832	
LVI	No	9	1722.550	1222.029	2223.071	0.312
	Yes	1	2491.000	1830.483	3151.517	
TSR	<50%	3	1883.875	1014.827	2752.923	0.971
	>50%	7	1597.558	1120.078	2075.039	
TB	<5	0	-	-	-	0.126
	>5	10	-	-	-	
DOI	<5 mm	4	1372.250	539.504	2204.996	0.562
	5-9 mm	3	1791.705	1182.197	2401.212	
	≥10 mm	1	1060.000	367.056	1752.944	
TT	<5 mm	5	1445.725	689.166	2202.284	0.371
	5-9 mm	3	1883.993	1343.841	2424.145	
	≥10 mm	2	1984.571	991.677	2977.465	

Continuation

DFS		Number of events	Time	95% confidence interval		P
CD66b IF	<34,89	4	2033.000	1453.822	2612.178	0.354
	>34,89	6	1560.972	784.729	2337.214	
CD66b TC	<40,27	1	2005.833	1701.367	2310.300	0.048
	>40,27	5	1664.252	876.793	2451.711	
CD66b WT	<23,84	3	2200.149	1684.149	2716.149	0.093
	>23,84	7	1633.419	954.895	2311.943	
CD8 IF	>287,36	4	1879.667	1206.333	2553.000	0.852
	<287,36	6	1860.679	1241.380	2479.977	
CD8 TC	>160,37	3	1281.273	879.427	1683.118	0.800
	<160,37	4	1980.069	1294.878	2665.260	
CD8 WT	>194,09	5	1586.780	855.540	2318.020	0.597
	<194,09	5	1964.257	1337.831	2590.684	
NLR IF	<0,13	4	2059.857	1500.019	2619.695	0.341
	>0,13	6	1655.373	939.969	2370.777	
NLR TC	<0,16	1	2229.167	1844.781	2613.552	0.050
	>0,16	5	1669.502	885.057	2453.947	
NLR WT	<0,12	4	2179.228	1625.275	2733.181	0.285
	>0,12	6	1763.201	1090.499	2435.902	

DFS, disease-free survival; RQT, radio-chemotherapy; FOM, floor of the mouth; T, tumor size; N, lymph node involvement; HG, histopathological grade; PI, pattern of invasion; PNI, perineural invasion; LVI, lymphovascular invasion; TSR, tumor-stroma ratio; TB, tumor budding; DOI, depth of invasion; TT, tumor thickness, IF, invasive front; TC, tumor center; WT, whole tumor. Statistical difference set at $P < 0.05$. Bold letters indicate statistical differences. *- time until event could not be calculated.

Supplementary figures

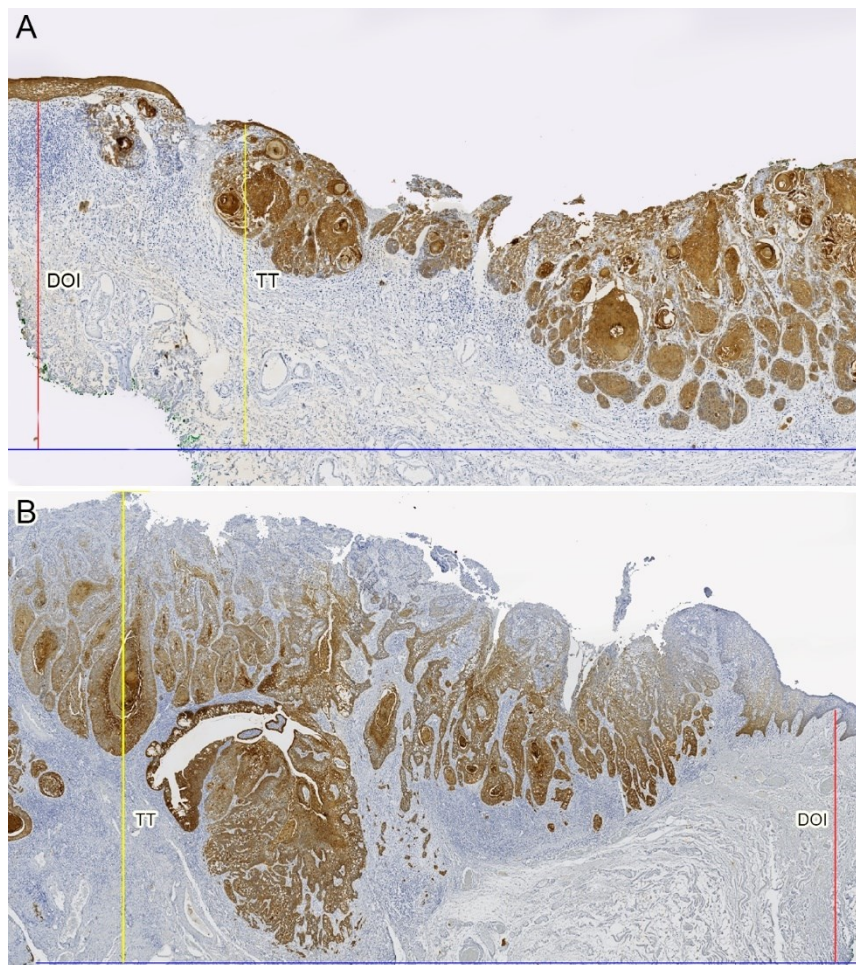


Figure 1S: Method to calculate depth of invasion (DOI- red line) and tumor thickness (TT- yellow line). DOI was calculated from the nearest healthy basal membrane to the deepest point of tumor invasion. TT was calculated from the highest point of the tumor surface to the deepest point of tumor invasion. **A)** An endophytic tumor wherein DOI is greater than TT. **B)** Exophytic tumor wherein DOI is smaller than TT.

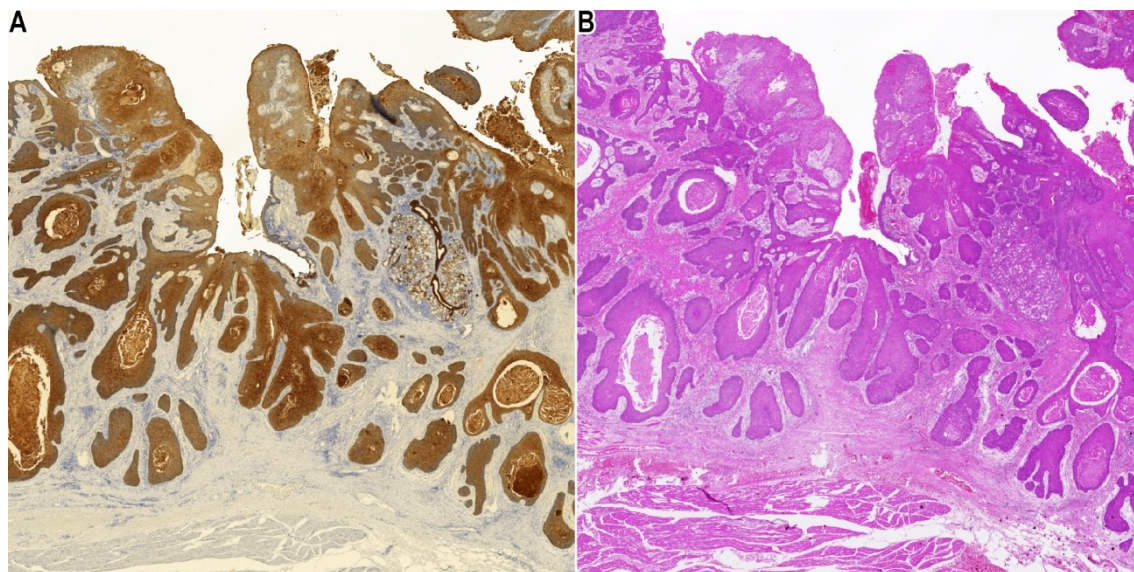
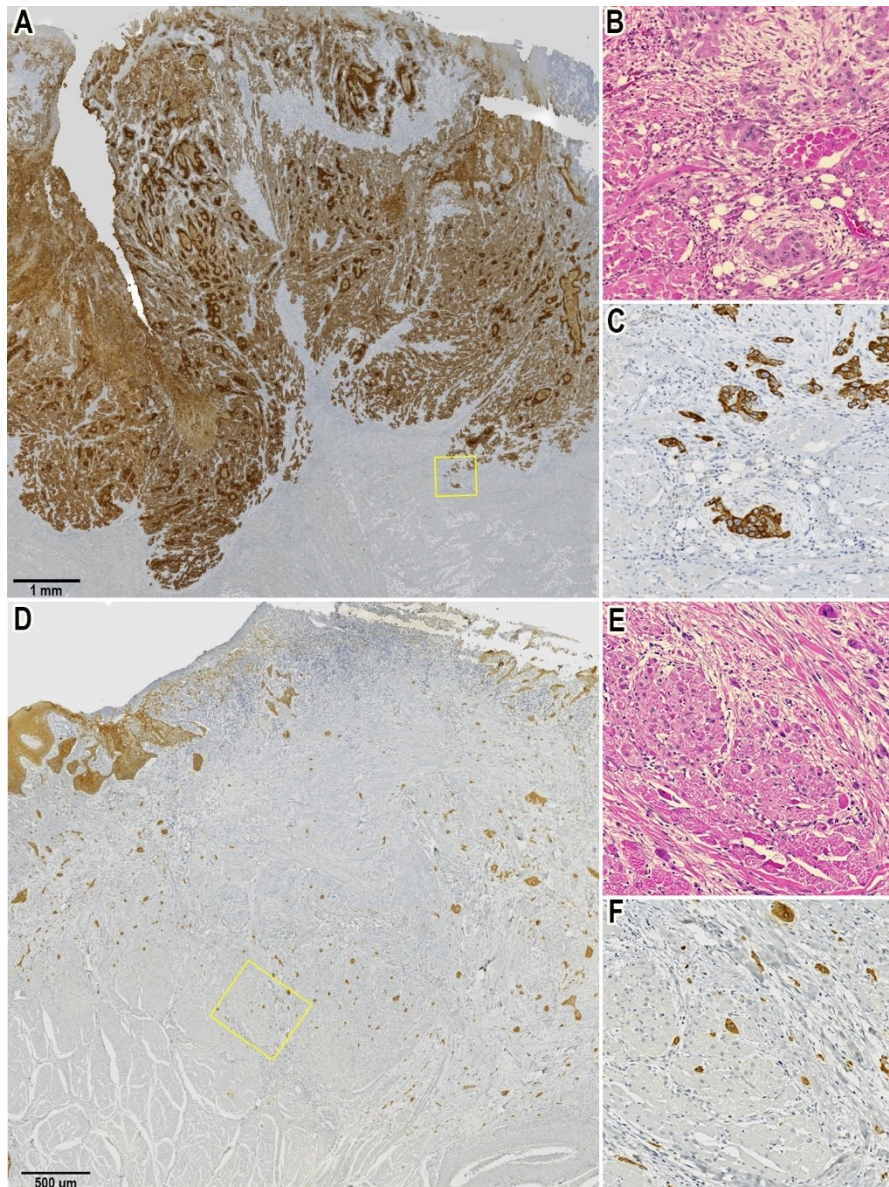


Figure 2S: Pattern of invasion cohesive, characterized by broad sheets of cancer cells and/or tumor nests with more than 15 cells across. A) Cytokeratin-immunostained slide. B) Hematoxylin and eosin-stained slide.



3S: (A) Pattern of invasion non-cohesive, characterized by narrow strands or small groups with less than 15 tumor cells, or single infiltrating tumor cells; Amplification of the yellow square region showed in (B) hematoxylin and eosin-stained image and (C) Cytokeratin-immunostained image. (D) Pattern of invasion dispersed, characterized by individual cells infiltrating at 1mm from the main tumor; Amplification of the yellow square region showed in (E) hematoxylin and eosin-stained image and (F) Cytokeratin-immunostained image.

6.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, analisou-se características histopatológicas consideradas de alto risco para o prognóstico do CEB. Observou-se que características histopatológicas indicativas de transição epitélio-mesenquimal exibiram associação com características de invasão tecidual, como invasão perineural e linfovascular. Além disso, observou-se que o tamanho e profundidade tumoral foram maiores em tumores com características invasivas.

Observou-se também que neutrófilos no centro do tumor impactaram de maneira negativa a sobrevida dos pacientes, e que uma relação de alta infiltração de neutrófilos com baixa infiltração de linfócitos T CD8 também impactou de maneira negativa a sobrevida dos pacientes. Esses resultados sugerem a polarização dos neutrófilos intratumorais para o fenótipo pro-tumoral. Além disso, a alta infiltração de neutrófilos na frente de invasão foi mais alta em tumores exibindo padrão de invasão não coeso, dado que também é sugestivo de neutrófilos pró-tumorais.

7 CAPÍTULO 3

ANÁLISE DO BROTAMENTO TUMORAL EM RESSECÇÕES
CIRÚRGICAS E BIÓPSIAS INCISIONAIS DE PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMOIDE DE BOCA

7.1 APRESENTAÇÃO

A pesquisa apresentada nesse capítulo tem por objetivo investigar a usabilidade de biópsias incisionais para avaliar critérios histopatológicos do carcinoma epidermoide de boca que tenham impacto sobre o prognóstico do paciente. Dentre os critérios histopatológicos mais recentes, destacamos a análise de brotamentos tumorais e da proporção parênquima/estroma tumoral, sobre os quais há um significativo volume de pesquisa demonstrando o alto potencial prognóstico dessas variáveis quando analisadas em ressecções cirúrgicas. Entretanto, ainda há escassez de pesquisas que suportem a análise dessas variáveis em biópsias incisionais. Os resultados obtidos por essa pesquisa são apresentados em formato de artigo científico formatado conforme as normas da revista *Histopathology*, as quais foram acessadas em novembro de 2022.

7.2 ARTIGO

Title: Tumor budding, tumor-stroma ratio, and tumor thickness: agreement between resections and matched biopsies of oral squamous cell carcinoma.

Tumor budding in oral cancer biopsy and resection.

Authors: Msc Andressa Fernanda Paza Miguel¹, PhD Daniella Serafin Couto Vieira², PhD Elena Riet Correa Rivero²

¹Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

²Department of Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. E-mail:

Correspondence: Elena Riet Correa Rivero; riet.elena@gmail.com

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC - Number 2021TR1460) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES – Finance Code 001).

Word count: 2714 words

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate tumor budding (TB), tumor/stroma ratio (TSR), and tumor thickness (TT) in resections and matched biopsies of oral squamous cell carcinoma (OSCC). A retrospective cohort of 61 cases of OSCC was selected. Cytokeratin-immunostained slides were used to assess TB, TSR, and TT. Agreement between resections and matched biopsies was verified by the intraclass correlation coefficient, Bland-Altman graph, and Cohen's kappa coefficient. Kaplan-Meier survival curves were plotted to test the impact of clinical and histopathological features on patient's overall survival (OS) and disease-free survival (DFS). In resections, TB was higher in tumors with worse grade of differentiation, and TT was greater in high TB tumors. In biopsies, tumors from alive patients exhibited lower stromal proportion than tumors of patients that died; and TT and TB were positively correlated. Overall, the agreement between resections and matched biopsies was poor for all variables. Histopathological features were underestimated in biopsies, as resections exhibited higher TB count (+14 buds), greater TT (+6.63mm), and lower TSR (-0.78) in comparison to matched biopsies. OS was worse in T3/T4 tumors compared to T1/T2 tumors. In conclusion, biopsies tended to underestimate histopathological features. However, biopsies were accurate to detect high TB, high TT, and low TSR, which are high risk characteristics. In these cases, biopsies could be useful to complement clinical staging and treatment.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck; oral squamous cell carcinoma; tumor budding; tumor-stroma ratio; tumor thickness.

INTRODUCTION

Lip and oral cavity cancer accounted for over 370.000 new cases and 170.000 deaths in 2020, which corresponds to approximately 2% of the world cancer burden ¹. Overall survival (OS) and disease-specific survival (DSS) rates are approximately 60%, and about 40% of patients develop recurrence in the first two years after diagnosis ². Clinical factors, such as lymph node metastasis (LNM) at diagnosis, tumor size (T), and clinical stage are the main independent risk factors for survival in such patients ²⁻⁴.

The American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control (AJCC/UICC) has changed the staging system of OSCC in the 8th edition of its staging manual. At this last TNM staging, two histopathological features were included, depth of invasion (DOI) and extracapsular spread/extranodal extension, as parameters to grade T and N stages ^{5,6}. Indeed, histopathological characteristics are associated with tumor behavior, and many have an impact on overall and recurrence-free survival in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients ⁷⁻¹⁰. However, the World Health Organization (WHO) histopathologic grading system remains differentiation-based ¹¹. A recently revised grading system combining histopathological features with tumor budding was able to independently predict poor OS and disease-free survival (DFS) better than the WHO system. Surprisingly, it was noted that even well-differentiated tumors presented tumor buds and were, therefore, upgraded into worse histopathological grades ¹².

Tumor budding (TB) is defined as single cells or a group of 4 or less cells at the invasive front of solid tumors ¹³, which undergoes phenotypic changes to increase cell invasiveness and tumor aggressiveness ¹⁴. TB was first described in colorectal cancer, and in 2016 the first recommendations for TB reporting in solid tumors were published ¹³. In OSCC, these recommendations were validated ¹⁵, and TB has been demonstrated as a good independent prognosticator for survival ^{8,10,16,17}. Although the invasive front is standard for TB

assessment, TB analysis in preoperative biopsies has been associated with N stage and survival¹⁸⁻²². However, the agreement between biopsies and matched surgical resections is controversial to support its clinical use for TB assessment¹⁹⁻²².

To improve its clinical performance, scores combining TB with other histopathological features, such as tumor thickness (TT)²³ and tumor-stroma ratio (TSR)²⁴, have been proposed. The BD score, combining TB and TT, is considered an independent risk factor for survival¹⁰ and can be assessed in both resected tumors and preoperative biopsies²². Similarly, TSR assessment is considered fast, simple, and feasibly performed in hematoxylin and eosin-stained slides²⁵. In OSCC, TSR has been considered a good prognosticator for survival, combined or not with TB grade^{8,26,27}.

The aim of this study was to examine TB, TT, and TSR in OSCC. Furthermore, we verified the agreement between resections and matched biopsies, and the impact of these histopathological parameters on patient's outcome, individually and combined as a score.

METHODOLOGY

Study population

The present study analyzed a sample of 61 patients from a retrospective cohort of 171 patients with OSCC diagnosed at the Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, Brazil, between 2013-2018. Inclusion criteria were primary OSCC, no preoperative chemo-radiotherapy, and availability of tissue samples. Exclusion criteria were recurrent or secondary OSCC. One examiner retrieved from clinical files: age, sex, smoking/drinking habits, site, TNM, histopathological grade, follow-up information, and treatment modality.

Follow-up data from 46 patients were collected in June 2020 and the last up-date was December 2021. Mean follow-up time was 27.81 months (range 1-95). Clinical endpoints were OS and DFS, defined as

the time from the date of diagnosis to the date of death (OS), recurrence (DFS), or the date of last follow up.

This study was approved by the institutional ethical committee review board (number 17674419.9.0000.0121). Patients' identity remained anonymous through-out the study, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Histopathological evaluation

Among the 61 cases included, 31 samples were obtained from surgical resections, of which 14 had matched preoperative biopsies; and 30 samples were obtained from diagnostic biopsies. When multiple blocks were available, the block containing the most invasive part of the tumor was chosen. Immunohistochemistry was performed with an anti-cytokeratin antibody (1:50; clone AE1/AE3 - Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) by means of the labelled polymer method (EnVision Dual Link System-HRP, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) (**Supplementary material**). Glass slides were scanned on Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss Microscopy) at 40x (0.11 $\mu\text{m}/\text{pixel}$), and the images were imported to the open-source software QuPath (v.0.3.2). Pre-processing was applied to estimate stain vectors of the image and normalize hematoxylin and 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) stains. In resections, an annotation was drawn using the *polygon tool* around the whole tumor limited to its borders. Then, the invasive front was determined by expanding the tumor borders by 1mm (**Figure 1A**)²⁸.

For TB, the whole sample was scanned and one area containing the highest count of tumor buds (hotspot) was selected. In resections, the hotspot was located within the invasive front. Using the rectangle tool, an area of 0.785 mm² was drawn¹³, the buds were manually marked using the *points tool*, and the total count of buds was automatically informed by the program (**Figure 1A and B**). Two observers, a PhD student (AFPM) and an experienced pathologist (ERCR), counted the buds from 15 randomly selected cases and recounted it 21 days later (interobserver agreement 0.966). Next, one observer (AFPM) performed the TB count

on the remaining sample (intra-observer agreement 0.932). TB was defined as a single cell or a cell cluster of up to 4 tumor cells¹³. Subsequently, patients were grouped using a two-tier system (low budding <5; high budding ≥5) and a three-tier system (low budding <5; intermediate budding 5-9; high budding ≥10)^{29 13}.

The whole tumor was used to calculate tumor/stroma ratio (TSR) in resections (**Figure 1C**), whereas in preoperative biopsies an area of 1mm² containing the highest TSR was selected (**Figure 1D**). The tutorial for measuring areas is publicly available on Qupath website (<https://qupath.readthedocs.io/en/latest/index.html>) and served as a guide to calculate TSR (**Supplementary material**). The tumor percentage was divided by the stromal percentage, and a TSR above 1 indicated tumor tissue predominance (low stroma), while TSR below 1 indicated a stromal tissue predominance (high stroma)²⁵.

In resections and biopsies, tumor thickness (TT) was measured from the tumor surface to the tumor's deepest part and categorized as low <4 and high ≥4mm²³.

According to the BD score, samples were classified as follows²³:

- Low risk: TB <5 buds AND TT <4 mm;
- Intermediate risk: TB ≥5 buds OR TT ≥4 mm;
- High risk: TB ≥5 buds AND TT ≥4 mm.

According to the TSR-TB score, samples were classified as follows²⁷:

- Low risk: TSR<1 AND TB<5 buds;
- Intermediate risk: TSR≥1 OR TB ≥5 buds;
- High risk: both TSR≥1 AND TB ≥5 buds.

Statistical analysis

Shapiro-Wilk's test was used to test the normality of quantitative variables. Non-parametric tests, Mann-Whitney (two groups) and Kruskal-Wallis test (three groups), were selected and variables were described with median and interquartile range (IQR) . The correlation

between quantitative variables was tested with Spearman's coefficient test. Chi-square test and Fisher exact test were used to analyze associations between categorical variables. Kaplan-Meier survival curves were plotted and comparison between groups was performed using the log-rank test. For continuous variables, agreement between resections and matched biopsies was tested with the intraclass correlation coefficient (ICC) and Bland-Altman graph, for which the average of differences and upper/lower limits of agreement were calculated. After categorization, agreement was measured with the Cohen's Kappa test, sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV). A $P \leq 0.05$ was set for statistical significance.

RESULTS

The clinicopathological characteristics of the population according to the type of sample are presented in **supplementary table 1S**. Resective surgery was performed on 35 patients, combined or not with post-operative radiochemotherapy (RQT), and 26 patients were treated with RQT alone (**Supplementary Table 1S**).

Overall, advanced clinical stage was more frequent in biopsies (96%) than in resections (41.7%). Resections exhibited higher TB (median: 18; IQR: 25 vs median: 4; IQR: 19; $P=0.005$), higher TT (median: 7.26, IQR: 7.66 vs median: 4.11; IQR: 1.22; $P=0.000$); and lower TSR than biopsies (median: 0.65; IQR: 0.55 vs median: 1.13; IQR: 1.75; $P=0.007$). Histopathological features of the whole sample are described in **tables 2S and 3S (Supplementary material)**.

Resections

Moderate ($P=0.037$) and poor-differentiated ($P=0.004$) tumors exhibited higher TB than well-differentiated tumors (**Table 1A**). TT was higher in T3/T4 tumors than in T1/T2 tumors ($P=0.049$) (**Table 1A**), and in high TB than in low TB (tree-tier system: $P=0.003$; two-tier system $P=0.002$ - **Table 2A**). There was no correlation between TB, TSR, and

TT (**Supplementary material - Table 4S**). As categorical variables, there was no association between the histopathological features and clinical parameters (**Supplementary material - Table 5S**).

Biopsies

Patients that died exhibited a TSR lower than 1 (high stroma), while patients alive had a TSR above 1 (low stroma) ($P=0.007$; **Table 1B**). TT was higher in female patients than it was in male patients ($P=0.042$; **Table 1B**). According to Spearman's coefficient test, TT and TB were positively correlated ($r=0.388$; $P=0.034$ - **Supplementary material - Table 4S**).

Agreement between resection and matched biopsies

The agreement between resections and matched biopsies are presented in **table 6S (supplementary material)**.

As quantitative variables, resections exhibited higher TB count (+14 buds), higher TT (+6.63 mm), and lower TSR (-0.78) than did matched biopsies (**Table 3**). For all variables, the bias between resections and biopsies increased when the mean measurements become higher (**Figure 2A-C**).

As categorical variables, the agreement between resections and biopsies were 64.28% (TB tree-tier), 78.57% (TB two-tier); 53.84% (TSR), and 30.76% (TT).

Survival

On the Kaplan-Meyer analysis, clinical variables T, N, and clinical stage were dichotomized. For the whole sample, OS was significantly better for T1/T2 than for T3/T4 ($P=0.049$), and DFS was better for patients bellow 60 years (**Figure 3A and B**). TB, TSR, and TT were not associated with survival (**Supplementary material Table 7S**).

DISCUSSION

In this study, TB in resection samples was higher in poor and moderately differentiated tumors than it was in well differentiated ones, which agrees with previous studies ²⁹⁻³¹. However, there was no association between TB and survival time, which is in contrast with previous works, on which high TB was an independent prognosticator for worse OS ^{14,29,32,33}, disease-specific survival ²⁷, DFS ^{27,32,33}, regional recurrence ³⁴, and late LNM ³⁵. Other clinical and histopathological features frequently associated with TB in the literature are TT ^{19,33,36}, tumor size ^{19,29,36}, LNM at diagnosis ^{19,29,30,33,35-37}, extranodal extension ¹⁹, late LNM ³⁸, pattern of invasion ^{30,33,38}, and clinical stage ²⁹.

In preoperative biopsies, TB assessment is reported for several tumors, and it is frequently associated with LNM ³⁹. In OSCC, biopsy TB has been linked with the number of metastatic lymph nodes ¹⁹, LNM at diagnosis ^{18,20,21}, TT ²¹, clinical stage ²¹, mode of invasion ⁴⁰, histological grade ¹⁸, and worse survival outcomes ^{18,20}. In our biopsy samples, there wasn't an association between TB and clinical parameters. However, we noted that TB was significantly higher in resected tumors than it was in preoperative biopsies, which is in accordance with previous reports ^{21,22}. Since biopsies often don't include the tumor's invasive margin, especially in extensive lesions, it is expected that the TB count would be lower in biopsies in comparison to resections. This is specifically important for inoperable tumors, where TB can only be assessed on the diagnostic biopsy. A previous study demonstrated that in biopsies a cutoff of 3 buds could be more sensitive to predict LNM ¹⁸. Therefore, a lower cutoff point would be an alternative to reduce false low TB cases (false negatives), in which neck dissections would not be recommended.

In the present work, the agreement between resections and matched biopsies using TB as a quantitative variable showed a poor ICC (0.062). Resections presented higher TB than the matched biopsy, and the bias between samples became higher as the mean TB count increased, which indicates that high biopsy TB could be even higher in the resected tumor. As a categorical variable, TB agreement rate was similar from previous studies ^{19,21,22}, nonetheless, Cohen's kappa was

poor for both the two-tier and three-tier systems. Further analysis demonstrated that sensitivity (83%) and PPV (90%) were high, whereas specificity (50%) and NPV (33%) were low, suggesting that biopsies are better to predict high than low TB in resections.

In comparison with previous studies, our results showed slightly higher sensitivity and considerably lower specificity^{19,21,22}, probably because there were few cases graded as low TB in the present sample. Furthermore, differences across studies could be due to different areas of analysis¹³, different cutoff values for high TB (3 buds²⁰, 5 buds^{21,22}, 10 buds¹⁹), biopsy quality and inclusion of tumor borders^{19,20}, and the use of H&E^{19,21,22} or CK immunostained slides²⁰.

Overall, biopsies tended to underestimate TT in comparison to the matched resections. Almangush et al.²² also reported greater TT in resections than in biopsies. Histological measurement of TT in biopsies is difficult because in most cases the sample is fragmented, superficial, and don't contain the most invasive part of the tumor. Moreover, TT can be measured in resections from several points, while in biopsies the area is limited²². These biopsies' inherent limitations could be overcome by clinical alternatives to TT measurement, such as computer tomography, magnetic resonance imaging, and intraoral ultrasonography, which have shown good correlations with histopathological TT and depth of invasion^{41,42}.

As for TSR, most of our biopsy samples exhibited TSR above 1 (tumor predominance), while TSR in resections were mostly below 1 (stroma predominance). This was expected, because biopsies are frequently superficial, which corresponds with a higher proportion of tumor area. Moreover, we measured TSR in biopsies using the hotspot method. Thus, measurement of TSR from biopsies may not be accurate due to small and fragmented samples, which may not contain the area with the highest stromal proportion. Furthermore, we calculated TSR with the aid of CK-immunostained slides to improve the dissociation between tumor and stromal areas. In this regard, a previous study reported a

higher agreement than ours for TSR measurement from biopsies in comparison with matched resections (73%)⁴³. However, the authors used H&E-stained digitalized images, which could account for the difference in agreement in comparison to our study (53% agreement).

The main limitations of this study are the small sample size and retrospective design, which resulted in loss of important clinical information, mostly follow-up data, hindering a more powerful statistical analysis. Therefore, the present remarks should be interpreted with caution and conclusions are applicable to our sample.

The clinical use of biopsies to assess histopathological features relies mostly on its ability to predict LNM. From our results, biopsies tended to underestimate TB, TSR, and TT. Nonetheless, biopsies performed better at detecting poor histopathological features, in which instance, TB, TSR, and TT could be considered as additional information to provide a better treatment plan for OSCC patients.

REFERENCES

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL *et al.* Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2021;**71**;209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
2. Capote-Moreno A, Brabyn P, Muñoz-Guerra MF *et al.* Oral squamous cell carcinoma: Epidemiological study and risk factor assessment based on a 39-year series. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2020;**49**;1525-1534. doi: 10.1016/j.ijom.2020.03.009.
3. Weckx A, Grochau KJ, Grandoch A, Backhaus T, Zöller JE, Kreppel M. Survival outcomes after surgical treatment of oral squamous cell carcinoma. *Oral diseases* 2020;**26**;1432-1439. doi: 10.1111/odi.13422.
4. Ferreira AK, Carvalho SH, Granville-Garcia AF *et al.* Survival and prognostic factors in patients with oral squamous cell carcinoma.

Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal 2021;**26**;e387-e392. doi: 10.4317/medoral.24242.

5. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK. *Ajcc cancer staging manual*. New York: Springer, 2017.

6. Moeckelmann N, Ebrahimi A, Tou YK *et al*. Prognostic implications of the 8th edition american joint committee on cancer (ajcc) staging system in oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 2018;**85**:82-86. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.08.013.

7. Sethi S, Ohri S, Aggarwal P, Grewal H. Histopathological factors in oral squamous cell carcinoma-should a clinician look beyond clinical staging? *Journal of oral and maxillofacial surgery* 2021;**79**:1694-1705. doi: 10.1016/j.joms.2021.02.014.

8. Elseragy A, Bello IO, Wahab A *et al*. Emerging histopathologic markers in early-stage oral tongue cancer: A systematic review and meta-analysis. *Head & neck* 2022;**44**:1481-1491. doi: 10.1002/hed.27022.

9. Almangush A, Bello IO, Coletta RD *et al*. For early-stage oral tongue cancer, depth of invasion and worst pattern of invasion are the strongest pathological predictors for locoregional recurrence and mortality. *Virchows Archiv* 2015;**467**:39-46. doi: 10.1007/s00428-015-1758-z.

10. Wahab A, Onkamo O, Pirinen M, Almangush A, Salo T. The budding and depth of invasion model in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oral diseases* 2022;**28**:275-283. doi: 10.1111/odi.13671.

11. El-Naggar AK, Chan J, Grandis J, Takata T, Slotweg P. *Who classification of head and neck tumours*. Lyon, 2017;p. 105–111.

12. Elseragy A, Salo T, Coletta RD *et al*. A proposal to revise the histopathologic grading system of early oral tongue cancer incorporating tumor budding. *The American journal of surgical pathology* 2019;**43**:703-709. doi: 10.1097/pas.0000000000001241.

13. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y *et al*. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the international tumor

budding consensus conference (itbcc) 2016. *Modern pathology* 2017;**30**;1299-1311. doi: 10.1038/modpathol.2017.46.

14. Jensen DH, Dabelsteen E, Specht L *et al.* Molecular profiling of tumour budding implicates $\text{tgf}\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. *The Journal of pathology* 2015;**236**;505-516. doi: 10.1002/path.4550.

15. Xie N, Yu P, Liu H *et al.* Validation of the international tumor budding consensus conference (2016) recommendations in oral tongue squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine* 2019;**48**;451-458. doi: 10.1111/jop.12856.

16. Karjol U, Jonnada P, Annavarjula V, Cherukuru S, Chandranath A, Anwar A. Prognostic role of tumor budding in carcinoma tongue: A systemic review and meta-analysis. *Cureus* 2020;**12**;e9316. doi: 10.7759/cureus.9316.

17. Dolens EDS, Dourado MR, Almangush A *et al.* The impact of histopathological features on the prognosis of oral squamous cell carcinoma: A comprehensive review and meta-analysis. *Frontiers in oncology* 2021;**11**;784924. doi: 10.3389/fonc.2021.784924.

18. Seki M, Sano T, Yokoo S, Oyama T. Tumour budding evaluated in biopsy specimens is a useful predictor of prognosis in patients with cN0 early stage oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2017;**70**;869-879. doi: 10.1111/his.13144.

19. Noda Y, Ishida M, Ueno Y, Fujisawa T, Iwai H, Tsuta K. Novel pathological predictive factors for extranodal extension in oral squamous cell carcinoma: A retrospective cohort study based on tumor budding, desmoplastic reaction, tumor-infiltrating lymphocytes, and depth of invasion. *BMC cancer* 2022;**22**;402. doi: 10.1186/s12885-022-09393-8.

20. Seki M, Sano T, Yokoo S, Oyama T. Histologic assessment of tumor budding in preoperative biopsies to predict nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Head & neck* 2016;**38 Suppl 1**;E1582-1590. doi: 10.1002/hed.24282.

21. Acharya S, Raj M, Hallikeri K, Desai A. Histological assessment of budding and depth of invasion (bd) model in biopsies of oral squamous

cell carcinoma. *Journal of oral and maxillofacial pathology* 2020;**24**;581. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_236_19.

22. Almangush A, Leivo I, Siponen M *et al.* Evaluation of the budding and depth of invasion (bd) model in oral tongue cancer biopsies. *Virchows Archiv* 2018;**472**;231-236. doi: 10.1007/s00428-017-2212-1.

23. Almangush A, Coletta RD, Bello IO *et al.* A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2015;**44**;143-150. doi: 10.1016/j.ijom.2014.10.004.

24. Almangush A, Heikkinen I, Bakhti N *et al.* Prognostic impact of tumour-stroma ratio in early-stage oral tongue cancers. *Histopathology* 2018;**72**;1128-1135. doi: 10.1111/his.13481.

25. van Pelt GW, Kjær-Frifeldt S, van Krieken J *et al.* Scoring the tumour-stroma ratio in colon cancer: Procedure and recommendations. *Virchows Archiv* 2018;**473**;405-412. doi: 10.1007/s00428-018-2408-z.

26. Kang J, Su M, Xu Q, Wang C, Yuan X, Han Z. Tumour-stroma ratio is a valuable prognostic factor for oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral diseases* 2021;**29**;628-638. doi: 10.1111/odi.14013.

27. Dourado MR, Miwa KYM, Hamada GB *et al.* Prognostication for oral squamous cell carcinoma patients based on the tumour-stroma ratio and tumour budding. *Histopathology* 2020;**76**;906-918. doi: 10.1111/his.14070.

28. Hendry S, Salgado R, Gevaert T *et al.* Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: A practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the international immunooncology biomarkers working group: Part 1: Assessing the host immune response, tils in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research. *Advances in anatomic pathology* 2017;**24**;235-251. doi: 10.1097/pap.000000000000162.

29. Wang C, Huang H, Huang Z *et al.* Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine* 2011;**40**;545-551. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01041.x.

30. Xu B, Salama AM, Valero C *et al.* The prognostic role of histologic grade, worst pattern of invasion, and tumor budding in early oral tongue squamous cell carcinoma: A comparative study. *Virchows Archiv* 2021;**479**;597-606. doi: 10.1007/s00428-021-03063-z.
31. Chaitra B, Burela M, Kasula L, Inuganti RV, Vaddatti T. Correlative study of tumor budding, mode of invasion and lymphocytic host response with known clinicopathological prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral and maxillofacial pathology* 2020;**24**;484-491. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_178_20.
32. Sung YE, Kim MS, Lee YS. Proposal of a scoring system for predicting pathological risk based on a semiautomated analysis of whole slide images in oral squamous cell carcinoma. *Head & neck* 2021;**43**;1581-1591. doi: 10.1002/hed.26621.
33. Xie N, Wang C, Liu X *et al.* Tumor budding correlates with occult cervical lymph node metastasis and poor prognosis in clinical early-stage tongue squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine* 2015;**44**;266-272. doi: 10.1111/jop.12242.
34. Hori Y, Kubota A, Yokose T *et al.* Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes and tumor budding in early oral tongue carcinoma. *The Laryngoscope* 2021;**131**;2512-2518. doi: 10.1002/lary.29589.
35. Hamada M, Ebihara Y, Nagata K *et al.* Podoplanin is an efficient predictor of neck lymph node metastasis in tongue squamous cell carcinoma with low tumor budding grade. *Oncology letters* 2020;**19**;2602-2608. doi: 10.3892/ol.2020.11358.
36. Bjerkli IH, Laurvik H, Nginamau ES *et al.* Tumor budding score predicts lymph node status in oral tongue squamous cell carcinoma and should be included in the pathology report. *PloS one* 2020;**15**;e0239783. doi: 10.1371/journal.pone.0239783.
37. Angadi PV, Patil PV, Hallikeri K, Mallapur MD, Hallikerimath S, Kale AD. Tumor budding is an independent prognostic factor for prediction of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *International journal of surgical pathology* 2015;**23**;102-110. doi: 10.1177/1066896914565022.

38. Shimizu S, Miyazaki A, Sonoda T *et al.* Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: With special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion. *PloS one* 2018;**13**;e0195451. doi: 10.1371/journal.pone.0195451.
39. Almangush A, Youssef O, Pirinen M, Sundström J, Leivo I, Mäkitie AA. Does evaluation of tumour budding in diagnostic biopsies have a clinical relevance? A systematic review. *Histopathology* 2019;**74**;536-544. doi: 10.1111/his.13793.
40. Leite CF, Silva KDD, Horta MCR, de Aguiar MCF. Can morphological features evaluated in oral cancer biopsies influence in decision-making? A preliminary study. *Pathology, research and practice* 2020;**216**;153138. doi: 10.1016/j.prp.2020.153138.
41. Majumdar KS, Kaul P, Kailey VS *et al.* Radiological tumor thickness as a clinical predictor of pathological depth of invasion in oral squamous cell carcinoma: A retrospective analysis. *European archives of oto-rhino-laryngology* 2022;**280**;1417-1423. doi: 10.1007/s00405-022-07692-1.
42. Klein Nulent TJW, Noorlag R, Van Cann EM *et al.* Intraoral ultrasonography to measure tumor thickness of oral cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oral oncology* 2018;**77**;29-36. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.12.007.
43. Bello IO, Wennerstrand PM, Suleymanova I *et al.* Biopsy quality is essential for preoperative prognostication in oral tongue cancer. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2021;**129**;118-127. doi: 10.1111/apm.13104.
44. Monaghan TF, Rahman SN, Agudelo CW *et al.* Foundational statistical principles in medical research: Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 2021;**57**. doi: 10.3390/medicina57050503.
45. Joshi P, Pol J, Chougule M, Jadhav K, Patil S, Patil S. Tumor budding - a promising prognostic histopathological parameter in oral squamous cell carcinoma - a comparative immunohistochemical study.

Journal of oral and maxillofacial pathology 2020;**24**;587. doi:
10.4103/jomfp.JOMFP_74_20.

FIGURES

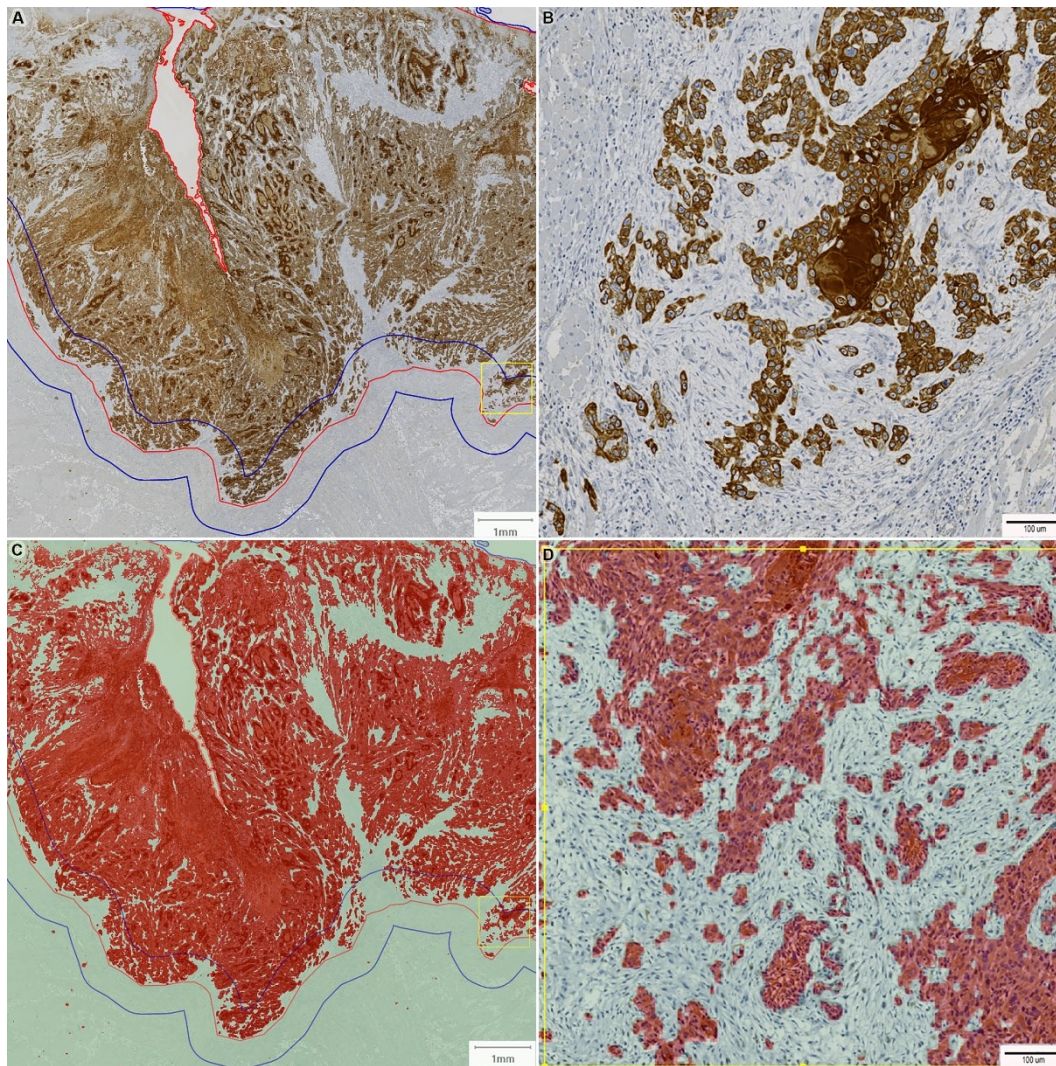


Figure 1: Cytokeratin-immunostained slides to demonstrate (A) Tumoral regions, the red line indicates the tumor borders; the blue line corresponds to the tumor invasive front, which was defined as a 1mm wide region centered at the tumor border; the yellow square corresponds to a 0.785 mm² area defined to assess tumor budding, which appears magnified at (B); (C and D) Pixel classification results from stain separation of positive DAB and hematoxylin background; tumor area is highlighted in red and stromal area in green.

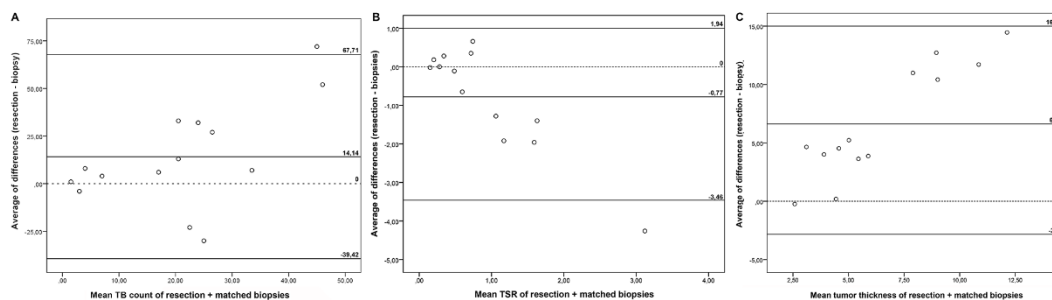


Figure 2: (A, B, C) Bland-Altman plots from the comparison between resections and biopsy samples of (A) tumor budding (TB); (B) tumor/stroma ratio (TSR); and (C) tumor thickness; topmost line refers to the upper limit of agreement, the middle line is the average of differences, and the bottom line refers to the lower limit of agreement; the dashed line refers to the line of zero. (D) Kaplan-Meyer overall survival curve (OS) comparing the time until death between T1/T2 and T4/T4 tumors; (D) Kaplan-Meyer disease-free survival (DFS) curve comparing the time until recurrence among different categories of tumor budding (TB), in which 0-4 low budding, 5-9 intermediate budding, and >10 high budding.

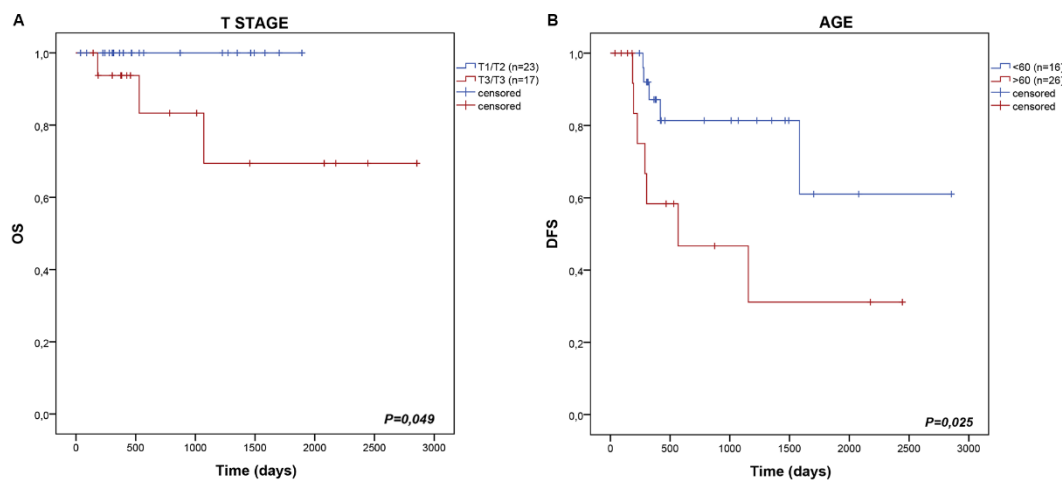


Figure 3: (A) Kaplan-Meyer overall survival curve (OS) comparing the time until death between T1/T2 and T4/T4 tumors; (B) Kaplan-Meyer disease-free survival (DFS) curve comparing the time until recurrence among patients <60 and ≥60 years old.

TABLES

Table 1: Median (interquartile range) of tumor budding count, tumor thickness, and tumor/stroma ratio according to clinical parameters.

		Resection			Biopsy		
		TB	TT	TSR	TB	TT	TSR
Age	39-59	18 (30.25)	5.42 (8.76)	0.68 (0.52)	3.5 (21.5)	4.05 (1.43)	1.04 (1.23)
	>60	19 (18)	7.63 (5.75)	0.61 (0.79)	5.5 (17)	4.16 (0.89)	1.9 (2.56)
Sex	Male	19.00 (28.75)	6.44 (6.88)	0.68 (0.46)	4.00 (21.00)	4.01 (1.34)	1.66 (2.32)
	Female	16.00 (12.00)	76.63 (11.22)	0.43 (1.04)	9.00 (16.00)	4.18 (0.62)	0.95 (0.71)
History of smoking	No	16.00 (14.00)	7.53 (6.91)	1.18 (0.95)	39.5 (-)*	4.46 (-)*	0.785 (-)*
	Yes	19.00 (27.75)	7.05 (8.26)	0.63 (0.57)	4.00 (14.00)	4.08 (1.26)	1.23 (2.12)
Alcohol consumption	No	19.50 (29.50)	8.36 (13.05)	0.56 (0.86)	7.00 (34.00)	4.17 (1.60)	0.62 (0.4)
	Yes	18.00 (19.00)	6.83 (4.62)	0.76 (0.51)	4.00 (10.00)	4.10 (1.46)	1.23 (2.32)
Site	Tongue	18.00 (20.00)	6.37 (6.18)	0.47 (0.50)	6.00 (23.75)	3.66 (1.94)	1.31 (2.44)
	FOM	13.50 (27.50)	6.27 (6.02)	0.96 (0.68)	2.00 (34.00)	3.69 (1.95)	0.41 (2.30)
	Other	23.00 (39.50)	7.60 (8.07)	0.61 (0.66)	4.00 (8.00)	4.13 (0.45)	1.21 (1.38)
T	T1/T2	17.00 (23.50)	5.97 (4.53)	0.63 (0.56)	9.00 (22.75)	4.10 (1.67)	0.93 (2.33)
	T3/T4	19.00 (25.00)	12.19 (8.63)	0.48 (0.70)	4.00 (19.75)	4.11 (1.48)	1.12 (1.90)
N	N-	13.50 (25.00)	6.84 (6.38)	0.57 (0.48)	9.00 (23.00)	4.13 (0.16)	0.62 (1.75)
	N+	18.50 (13.75)	7.05 (4.96)	0.37 (0.69)	4.00 (17.75)	3.53 (1.73)	1.45 (2.36)
HG	Well	8.00 (10.00)	7.26 (11.94)	0.43 (0.50)	2.00 (7.75)	4.09 (1.35)	1.56 (2.83)
	Moderate	19.50 (24.00)	7.18 (4.30)	0.84 (0.70)	8.00 (20.75)	4.13 (1.05)	1.12 (1.42)
	Poor	47.50 (46.25)	10.86 (14.30)	0.39 (0.47)	12.00 (22.00)	3.56 (2.04)	1.36 (1.64)
Stage	I/II	13.00 (25.75)	5.97 (5.40)	0.57 (0.52)	7 (-)*	4.18 (-)*	0.62 (-)*
	III/IV	18.00 (13.75)	7.40 (8.86)	0.47 (0.58)	4.00 (22.50)	4.05 (1.48)	1.22 (1.74)
Death	No	18.00 (27.75)	7.40 (6.73)	0.63 (0.50)	10.00 (24.50)	4.13 (1.89)	1.04 (1.57)
	Yes	8 (-)*	3 (-)*	1.89 (-)*	9.00 (34.00)	4.17 (4.61)	0.22 (0.21)
Recurrence	No	18.00 (27.00)	6.83 (6.12)	0.72 (0.61)	9.00 (22.00)	4.13 (2.22)	0.81 (1.19)
	Yes	14.00 (28.75)	8.24 (8.98)	0.57 (0.46)	22.50 (56.75)	4.20 (2.14)	1.09 (2.28)

FOM, floor of the mouth; HG, histopathological grade; N, lymph node status; N-, negative lymph node; N+, positive lymph node; T, tumor size; TB, tumor budding; TSR, tumor-stroma ratio; TT, tumor thickness. (-)* there was not sufficient data to calculate interquartile range. Kruskal-Wallis (3 groups- Dunn-Bonferroni post-hoc) and Mann-Whitney (2 groups) tests. Bold fonts were used for highlight P>0.05.

Table 2: Median (interquartile range) of **A)** tumor/stroma ratio and tumor thickness according to different tumor budding categories; **B)** tumor budding count according to different tumor/stroma ratios and tumor thickness categories.

A		Resection		Biopsy	
		TSR	TT	TSR	TT
	Low	0.62 (0.55)	5.14 (6.78)	1,75 (2,7)	3,85 (1,73)
TB	Intermediate	0.61 (1.04)	5.43 (5.57)	1,14 (1,67)	4,15 (1,53)
	High	0.7 (0.62)	7.56 (8.70)	1,04 (1,19)	4,14 (0,82)
	Low	0.62 (0.55)	5.14 (6.78)	1,75 (2,7)	3,85 (1,73)
TB	High	0.64 (0.61)	7.26 (8.40)	1,04 (1,2)	4,14 (0,68)
B		Resection		Biopsy	
		TB count			
TSR	<50%	17.5 (10)		4 (19)	
	≥50%	18 (27)		8 (33)	
TT	<4mm	6.5 (24)		2.5 (8)	
	≥4 mm	19 (25)		9 (23)	

TB; tumor budding; TSR, tumor-stroma ratio; TT, tumor thickness. Kruskal-Wallis (3 groups- Dunn-Bonferroni post-hoc) and Mann-Whitney (2 groups) tests. Bold fonts were used for highlight P>0.05.

Table 3: Agreement between resections and matched biopsies

QUANTITATIVE	TB	TSR	TT
Average of differences	14.14	-0.78	6.63
Standard deviation	27.32	1.37	4.83
Upper limit of agreement	67.71	1.90	16.10
Lower limit of agreement	-39.42	-3.46	-2.84
CATEGORICAL	TB	TSR	TT
Sensitivity	83.0%	58.0%	25.0%
Specificity	50.0%	0.0%	100.0%
PPV	90.9%	87.0%	100.0%
PNV	6428.0%	0.0%	10.0%
Kappa	0.276	-0.147	0.049
ICC	0.062	0.261	0.185

ICC, intraclass correlation coefficient; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; TB, tumor budding; TSR, tumor-stroma ratio; TT, tumor thickness.

SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

Immunohistochemistry

Tissue samples were fixed in 10% buffered formalin, processed, and embedded in paraffin. Immunohistochemistry was performed in three-micrometer sections, mounted on slides coated with 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Deparaffinized slides were hydrated in decreasing alcohol concentrations and then immersed in a 6% H₂O₂/methanol solution to inhibit endogenous peroxidase activity. Antigen retrieval was performed with a 40 min water bath on 0.01M citrate buffer (pH 6.0), at 96°C (Merck, Darmstadt, Hessen, Germany). The blocking of non-specific binding sites was carried out with 5% skimmed milk diluted in phosphate-buffered saline solution (PBS) for 40 min, at room temperature. Incubation with primary antibodies against anti-cytokeratin (1:50; clone AE1/AE3 - Dako Corporation, Carpinteria, USA) was done at 4° C, overnight. Immunodetection was performed with the EnVision system (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) for one hour, at room temperature. After two rinses with PBS, slides were incubated with diaminobenzidine (DAB) (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) for three minutes. Counterstaining was performed with Harris hematoxylin. Negative controls were included in all reactions by omitting the primary antibody and replacing it with PBS solution.

Tumor-stroma analysis

The step-by-step tutorial for measuring areas is publicly available on Qupath's website (<https://qupath.readthedocs.io/en/latest/index.html>) and served as a guide to calculate TSR (Supplementary material).

Classify → pixel classification → create threshold → channel DAB → smoothing sigma 0.5; threshold 0.08; above threshold: tumor; below threshold: stroma → measure.

Tumor and stromal area are generated separately in μm^2 and as a percentage value corrected to the tumor area (Figure 1S). The stroma's percentage was annotated for each case.

The process was conducted manually for each image to ensure optimal segmentation between tumor and stroma. Furthermore, salivary glands were manually removed to avoid it being interpreted as tumor tissue.

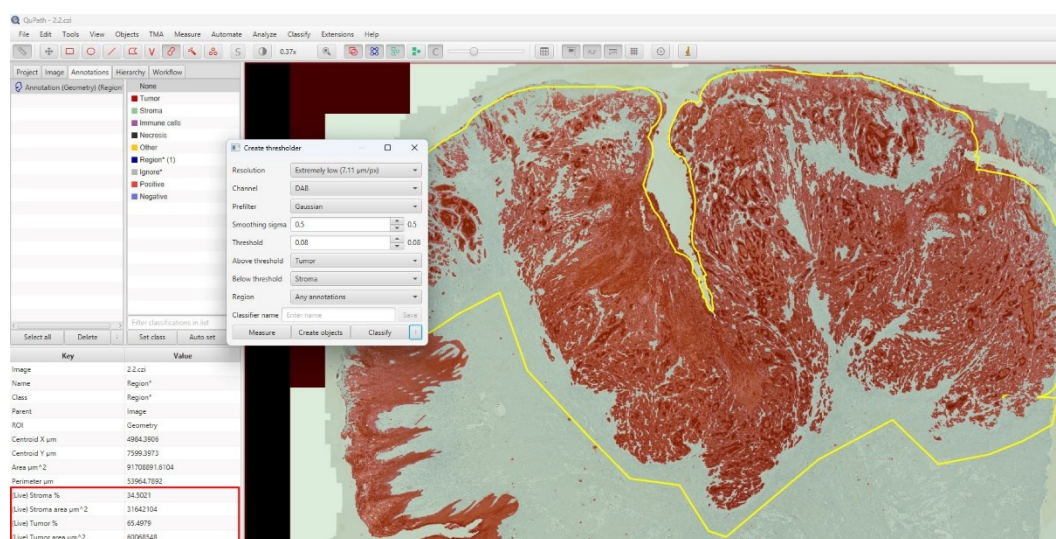


Figure 1S: Pixel classification parameters for stain separation of positive DAB and hematoxylin background. In the bottom left corner, it is possible to see the live stromal and tumor area calculation provided by the software.

SUPPLEMENTARY TABLES

Table 1S: Clinical parameters according to type of sample.

		Resection (n=31)	Biopsy (n=30)	All (n=61)
	Mean ± SD (range)	56.87 ± 9 (39-74)	59.47 ± 11 (48-90)	58 ± 10 (39-90)
Age	39-59	20 (64.5)	18 (60.0)	38 (62.3)
	>60	11 (35.5)	12 (40.0)	23 (37.7)
Sex	Male	24 (77.4)	23 (76.7)	47 (77)
	Female	7 (22.6)	7 (23.3)	14 (23)
Smoking history	No	3 (9.7)	2 (7.4)	5 (8.6)
	Yes	28 (90.3)	25 (92.6)	53 (91.4)
Alcohol consumption	No	6 (20.7)	3 (11.5)	9 (16.4)
	Yes	23 (79.3)	23 (88.5)	46 (83.6)
Site	Tongue	14 (45.2)	12 (40.0)	26 (42.6)
	Floor of the mouth	8 (25.8)	3 (10.0)	11 (18)
	Other	9 (29.0)	15 (50.0)	24 (39.4)
T	T1	11 (37.9)	2 (7.7)	13 (23.6)
	T2	9 (31.0)	4 (15.4)	14 (25.5)
	T3	6 (20.7)	8 (30.8)	15 (27.3)
	T4	3 (10.3)	12 (46.2)	25 (53.2)
N	N0	18 (75.0)	7 (30.4)	4 (8.5)
	N1	1 (4.2)	3 (13.0)	13 (27.7)
	N2	5 (20.8)	8 (34.8)	5 (10.6)
	N3	0 (0.0)	5 (21.7)	22 (46.8)
HG	Well	7 (22.58)	8 (26.67)	15 (24.6)
	Moderate	20 (64.52)	18 (60)	38 (62.3)
	Poor	4 (12.90)	4 (13.33)	8 (13.1)
Stage	I	8 (33.3)	1 (4.0)	9 (18.4)
	II	6 (25.0)	0 (0.0)	6 (12.2)
	III	3 (12.5)	5 (20.0)	8 (16.3)
	IV	7 (29.2)	19 (76.0)	26 (53.1)
TB	Mean ± SD (range)	22.68 ± 20 (0-81)	11.63 ± 16 (0-72)	17 ± 18.67 (0-81)
TB two-tier system	Low*	4 (12.9)	16 (53.3)	20 (32.8)
	High	27 (87.1)	14 (46.7)	41 (67.2)
TB three-tier system	Low*	4 (12.9)	16 (53.3)	20 (32.8)
	Intermediate	5 (16.1)	4 (13.3)	9 (14.8)
	High	22 (71.0)	10 (33.3)	32 (52.5)
TSR	Mean ± SD (range)	0.69±0.42 (0.08-1.89)	1.58±1.36 (0-5.76)	1.13±1.09 (0-5.76)
TT	Mean ± SD (range)	7.92±4.82 (1.45-19.36)	3.78±1.03 (0.98-5.59)	5.88±4.06 (0.98-19.36)
Treatment	Radiotherapy	10	4	14
	Radio-chemotherapy	9	22	31

Continuation

		Resection (n=31)	Biopsy (n=30)	All (n=61)
Death	No	28 (96.6)	10 (76.9)	38 (62.29)
	Yes	1 (3.4)	3 (23.1)	4 (6.56)
Recurrence	No	21 (72.4)	9 (69.2)	30 (49.18)
	Yes	8 (27.6)	4 (30.8)	12 (19.67)
Treatment	Surgery	12 (38.7)	1 (3.3)**	13 (21.3)
	Surgery+RQT/RT	19 (54.8)	3 (10.0)**	22 (36.06)
	RQT/RT	0	26 (86.7)	26 (42.6)

HG, histopathological grade; N, lymph node status; N-, negative lymph node; N+, positive lymph node; RQT, radiochemotherapy; RT, radiotherapy; SD, standard deviation; T, tumor size; TB, tumor budding; TSR, tumor/stroma ratio; TT, tumor thickness *8,2% of the sample had zero TB. ** Four patients were primarily treated with resective surgery, however, only the preoperative biopsy was available for analysis. Kruskal-Wallis (3 groups- Dunn-Bonferroni post-hoc) and Mann-Whitney (2 groups) tests. Bold fonts were used for highlight P>0.05.

Table 2S: Median (interquartile range) of tumor budding count, tumor/stroma ratio, and tumor thickness according to clinical parameters, in the whole sample.

WHOLE SAMPLE		TB	TSR	TT
Age	39-59	11.5 (31)	0.74 (0.5)	4.35 (4.31)
	>60	12.5 (14)	0.62 (1.05)	7.26 (4.93)
Sex	Male	11 (30)	0.74 (0.53)	4.77 (4.85)
	Female	16 (17)	0.62 (0.93)	7.53 (5.18)
History of smoking	No	11.5 (13)	0.9 (0.85)	5.85 (6.02)
	Yes	11.5 (27)	0.72 (0.52)	4.94 (5.05)
Alcohol consumption	No	11.5 (19)	0.72 (0.82)	4.17 (5.44)
	Yes	11.5 (22)	0.72 (0.61)	5.43 (4.43)
Site	Tongue	17 (25)	0.56 (0.49)	4.94 (6.2)
	Floor of the mouth	11 (44)	0.73 (0.66)	7.67 (6.75)
	Other	9 (13)	0.89 (1.27)	4.2 (1.76)
T	T1/T2	11 (16)	0.61 (0.4)	5.84 (4.7)
	T3/T4	19 (33)	0.87 (1.44)	4.15 (5.14)
N	N-	9.5 (24)	0.62 (0.48)	5.9 (5.02)
	N+	15 (20)	0.79 (0.95)	4.41 (4.36)
HG	Well	4 (9)*	0.72 (0.49)	4.17 (5.84)
	Moderate	14 (22)*	0.62 (0.57)	5.84 (3.57)
	Poor	23 (47)*	0.835 (1.17)	4.32 (10.50)
Clinical stage	I/II	9 (20)	0.61 (0.45)	5.97 (5.41)
	III/IV	15 (26)	0.81 (0.78)	4.22 (4.71)
Death	No	17 (26)	0.76 (0.57)	5.43 (4.37)
	Yes	8.5 (26)	0.30 (-)	2.57 (-)
Recurrence	No	16 (20)	0.77 (0.61)	5.39 (3.81)
	Yes	8 (23)	0.52 (0.61)	4.22 (6.92)

HG, histopathological grade; N, lymph nodes; N-, negative lymph nodes; N+, positive lymph nodes; T, tumor size; TB, tumor budding; TSR, tumor-stroma ratio; TT, tumor thickness. Bold lettering was used to highlight P<0,05.

Table 3S: Median (interquartile range) of **A)** TSR and TT according to different TB categories; **B)** TB count according to different TSR and TT categories.

A		TSR	TT
TB	Low	0.97 (2.46)	3,85 (1,97)*
	Intermediate	0.62 (1.48)	4,18 (3,14)
	High	0.8 (0.73)	5,42 (7,29)*
TB	Low	0.97 (2.46)	3,85 (1,97)*
	High	0.77 (0.79)	5 (4,26)*
B		TB count	
TSR	<50%	9 (18)	
	≥50%	12 (29)	
TT	<4mm	3.5 (9)*	
	≥4 mm	18 (19)*	

TB, tumor budding; TSR, tumor-stroma ratio; TT, tumor thickness. Bold lettering was used to highlight P<0,05.

Table 4S: Correlation between histopathological variables in A) resections and B) biopsies.

A) RESECTION		TB	TT	TSR
	<i>r</i>	1.000	.252	-.119
TB	<i>P</i>		.172	.525
	N	31	31	31
	<hr/>			
	<i>r</i>		1.000	.087
TT	<i>P</i>			.642
	N		31	31
	<hr/>			
	<i>r</i>			1.000
TSR	<i>P</i>			
	N			31
	<hr/>			
B) BIOPSIES		TB	TT	TSR
	<i>r</i>	1.000	.388*	-.147
TB	<i>P</i>		.034	.437
	N	30	30	30
	<hr/>			
	<i>r</i>		1.000	-.277
TT	<i>P</i>			.138
	N		30	30
	<hr/>			
	<i>r</i>			1.000
TSR	<i>P</i>			
	N			30
	<hr/>			

r, Spearman's correlation coefficient; N, sample size; TB, tumor budding; TSR, tumor-stroma ratio; TT, tumor thickness. Bold lettering was used to highlight $P < 0,05$.

Table 5S: Number (%) of histopathological variables according to clinical parameters in A) Resections and B) Biopsies.

A) RESECTIONS		T		N		HG			Clinical stage	
		T1/T2	T3/T4	N-	N+	Well	Moderate	Poor	I/II	III/IV
TT	<4mm	3 (75)	1 (25)	4 (100)	0 (0)	3 (50)	3 (50)	0 (0)	3 (75)	1 (25)
	≥4mm	15 (68.2)	7 (31.8)	12 (66.7)	6 (33.3)	3 (13.6)	16 (72.7)	3 (13.6)	10 (55.6)	8 (44.4)
TSR	<50%	18 (72)	7 (28)	17 (77.3)	5 (22.7)	7 (28)	14 (56)	4 (16)	13 (59.1)	9 (40.9)
	≥50%	2 (50)	2 (50)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	1 (50)	1 (50)
TB	Low	3 (75)	1 (25)	4 (100.0)	0 (0.0)	2 (50.0)	2 (50.0)	0 (0.0)	3 (75.0)	1 (25.0)
	High	17 (68)	8 (32)	14 (70.0)	6 (30.0)	5 (18.5)	18 (66.7)	4 (14.8)	11 (55.0)	9 (45.0)
TB	Low	3 (75)	1 (25)	4 (100.0)	0 (0.0)	2 (50.0)	2 (50.0)	0 (0.0)	3 (75.0)	1 (25.0)
	Intermediate	4 (100)	0 (0)	3 (75.0)	1 (25.0)	3 (60.0)	2 (40.0)	0 (0.0)	3 (75.0)	1 (25.0)
	High	13 (61.9)	8 (38.1)	11 (68.8)	5 (31.3)	2 (9.1)	16 (72.7)	4 (18.2)	8 (50.0)	8 (50.0)
TSR-TB score	Intermediate	5 (62.45)	3 (37.5)	5 (83.3)	1 (16.7)	2 (20)	8 (80)	0 (0)	4 (66.7)	2 (33.3)
	High	15 (71.4)	6 (28.6)	13 (72.2)	5 (27.8)	5 (23.8)	12 (57.1)	4 (19)	10 (55.6)	8 (44.4)
BD score	Low	2(100)	0(0)	2(100)	0(0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2(0)	0(0)
	Intermediate	2(50)	2(50)	4(100)	0(0)	1 (16.7)	5 (83.3)	0 (0)	2(50)	2(50)
	High	16(69.6)	7(30.4)	12(66.7)	6(33.3)	4 (17.4)	15 (65.2)	4 (17.4)	10(55.6)	8(44.4)
B) BIOPSIES		T1/T2	T3/T4	N-	N+	Well	Moderate	Poor	I/II	III/IV
TT	<4mm	2 (20)	8 (80)	1 (10)	9 (90)	3 (27.3)	6 (54.5)	2 (18.2)	0 (0)	1 (100)
	≥4mm	4 (25)	12 (75)	6 (46.2)	7 (53.8)	5 (26.3)	12 (63.2)	2 (10.5)	1 (6.7)	14 (93.3)

Continuation

C) BIOPSIES		T1/T2	T3/T4	N-	N+	Well	Moderate	Poor	I/II	III/IV
TSR	<50%	3 (20)	12 (80)	3 (21.4)	11 (78.6)	4 (22.2)	10 (55.6)	4 (22.2)	0 (0)	15 (100)
	≥50%	3 (33)	6 (66)	3 (42.9)	4 (57.1)	3 (30.0)	7 (70.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	7 (87.5)
TB	Low	2 (15.4)	11 (84.6)	2 (16.7)	10 (83.3)	6 (37.5)	8 (50.0)	2 (12.5)	0 (0.0)	13 (100)
	High	4 (30.8)	9 (69.2)	5 (45.5)	6 (54.5)	2 (14.3)	10 (71.4)	2 (14.3)	1 (8.3)	11 (91.7)
TB	Low	2 (15.4)	11 (84.6)	2 (16.7)	10 (83.3)	6 (37.5)	8 (50.0)	2 (12.5)	0 (0.0)	13 (100)
	Intermediate	1 (25)	3 (75)	2 (66.7)	1 (33.3)	1 (25.0)	3 (75.0)	0 (0.0)	1 (33.3)	2 (66.7)
	High	3 (33.3)	6 (66.7)	3 (37.5)	5 (62.5)	1 (10.0)	7 (70.0)	2 (20.0)	0 (0.0)	9 (100)
TSR-TB score	Low	1 (12)	7 (87)	1 (14.3)	6 (85.7)	4 (40.0)	4 (40.0)	2 (20.0)	0 (0)	8 (100)
	Intermediate	3 (30)	7 (70)	2 (20)	8 (80)	1 (8.3)	9 (75.0)	2 (16.7)	0 (0.0)	10 (100)
	High	2 (33)	4 (66)	3 (75)	1 (25)	2 (33.3)	4 (66.7)	0 (0.0)	1 (20.0)	4 (80)
BD score	Low	1 (14)	6 (85)	1 (14.3)	6 (85.7)	3 (37.5)	4 (50.0)	1 (12.5)		7 (100)
	Intermediate	2 (22)	7 (77)	1 (12.5)	7 (87.5)	3 (27.3)	6 (54.5)	2 (18.2)	0 (0.0)	9 (100)
	High	3 (30)	7 (70)	5 (62.5)	3 (37.5)	2 (18.2)	8 (72.7)	1 (9.1)	1 (11.1)	8 (88.9)

BD, tumor budding and tumor thickness score; HG, histopathological grade; N, lymph node; N-, lymph node negative; N+, lymph node positive; T, tumor size; TB, tumor budding; TSR, tumor-stroma ratio; TT, tumor thickness.

Table 6S: Agreement between resections and matched biopsies, case by case.

Case	TB number		TB Three-tier		TB Two-tier	
	R	B	R	B	R	B
1	10	40	2	2	1	1
2	20	14	2	2	1	1
3	11	34	2	2	1	1
4	1	5	0	1	0	1
5	40	8	2	1	1	1
6	9	5	1	1	1	1
7	81	9	2	1	1	1
8	72	20	2	2	1	1
9	27	14	2	2	1	1
10	37	4	2	0	1	0
11	37	30	2	2	1	1
12	8	0	1	0	1	0
13	40	13	2	2	1	1
14	2	1	0	0	0	0
ICC 0.062		Kappa 0.375		Kappa 0.276		

Case	TSR		TSR-TB score			
	R	B	R	B		
1	0.89	0.54	1	1	2	2
2	0.292	0.11	1	1	2	2
3	0.43	0.54	1	1	2	2
4	0.27	0.92	1	1	1	2
5	0.42	1.7	1	0	2	1
6	0.21	2.13	1	0	2	1
7	0.99	5.25	1	0	2	1
8	0.48	0.2	1	1	2	2
9	0.28	0.28	1	1	2	2
10	1.07	0.41	0	1	1	1
11	0.61	2.57	1	0	2	0
12	0.14	0.16	1	1	2	2
13	0.93	2.33	1	0	1	0
ICC 0.261		Kappa -0.147		Kappa 0.103		

Case	TT		BD score			
	R	B	R	B		
1	4.53	4.34	1	1	2	2
2	19.36	4.9	1	1	2	2
3	14.22	3.8	1	0	2	1
4	2.46	2.7	0	0	0	1
5	5.9	1.89	1	0	2	1

Continuation

Case	TT				BD score	
	R	B	R	B	R	B
6	7.262	3.63	1	0	2	1
7	15.31	2.59	1	0	2	1
8	16.71	5	1	1	2	2
9	7.63	2.4	1	0	2	1
10	13.39	2.4	1	0	2	0
11	5.43	0.781	1	0	2	0
12	6.83	2.3	1	0	2	1
13	7.82	3.95	1	0	1	0
ICC 0.185			Kappa 0.049		Kappa -0.032	

B, biopsy; BD, tumor budding + tumor thickness score; ICC, intraclass correlation coefficient; R, resection; TB, tumor budding; TSR, tumor-stroma ratio; TT, tumor thickness.

Table 7S: P value results for Kaplan Meyer survival curves.

Characteristic		OS	DFS
		P value	P value
Age	<60 vs >60	0.886	0.025
Sex	Male vs Female	0.112	0.843
Smoking	No vs Yes	0.482	0.415
Alcohol	No vs Yes	0.861	0.624
Site	Tongue vs FOM vs Other	0.287	0.788
Tumor size	T1+T2 vs T3+T4	0.049	0.415
Lymph node metastasis	N positive vs N negative	0.617	0.295
Clinical Stage	I+II vs III/IV	0.18	0.589
Histopathological grade	Well vs Moderate vs Poor	0.608	0.603
Tumor budding (resection)	Low vs High	0.67	0.72
Tumor budding (biopsy)	Low vs High	0.147	0.668
Tumor thickness (resection)	<4mm vs >4mm	0.503	277
Tumor thickness (biopsy)	<4mm vs >4mm	0.147	0.76
Tumor-stroma ratio (resection)	>1 vs <1	0.569	0.617
Tumor-stroma ratio (biopsy)	>1 vs <1	0.361	0.954
BD score (resection)	0 vs 1 vs 2	0.122	0.235
BD score (biopsy)	0 vs 1 vs 2	0.302	0.067
TSR-TB score (resection)	0 vs 1 vs 2	0.169	0.487
TSR-TB score (biopsy)	0 vs 1 vs 2	0.154	0.167

OS, overall survival; DFS, disease free survival; FOM floor of the mouth; BD, tumor thickness+tumor budding score; TSR; tumor-stroma ratio; TB, tumor budding. Bold lettering was used to highlight P<0,05.

7.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, observou-se que os parâmetros histopatológicos avaliados foram subestimados quando analisados em biópsias incisionais em comparação com os mesmos parâmetros analisado em ressecções cirúrgicas pareadas. Em especial para o brotamento tumoral, percebeu-se que as biópsias foram efetivas para prever alto grau de BT, o que poderia auxiliar no planejamento terapêutico. Entretanto, a observação de baixo grau de BT em biópsias apresentou baixo valor preditivo para diagnosticar baixo BT em ressecções cirúrgicas, logo, nessas situações cautela deve ser tomada.

A principal dificuldade em se analisar características histopatológicas em biópsias incisionais foi a qualidade da amostra tecidual. Muitas amostras eram pequenas demais, superficiais e fragmentadas. O problema foi exacerbado pelo desenho retrospectivo do estudo, uma vez que não foi possível padronizar a qualidade do material de análise, e a amostra tornou-se dependente do material disponível em arquivo. Possivelmente, um estudo prospectivo contendo um protocolo para a realização das biópsias incisionais e critérios de qualidade para a inclusão da amostra encontraria taxas de concordâncias melhores para os parâmetros analisados.

Entretanto, mesmo diante das limitações, o presente estudo encontrou resultados interessantes sobre o uso de biópsias incisionais para a avaliação de características histopatológicas do CEB. Em comparação com estudos anteriores, o presente trabalho contribui com o conhecimento atual por ter disponibilizado os dados de forma contínua e categórica, e de maneira completa e transparente.

8 METODOLOGIA EXPANDIDA

8.1 DESENHO DE ESTUDO

Estudo observacional do tipo coorte retrospectivo-prospectivo.

8.2 ASPECTOS ÉTICOS

Foram seguidos os preceitos da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Visando preservar a identidade dos pacientes, os dados coletados das fichas e inseridos no banco de dados foram identificados apenas com o número do prontuário hospitalar e requisição de exame do SAP. Por se tratar de um estudo observacional, não se realizou nenhum tipo de intervenção, além daquelas segundo as normas e rotinas adotadas pelo HU/UFSC/EBSERH. Sendo assim, o presente estudo não apresentou implicações outras que a manutenção da confidencialidade das informações.

O comitê de ética em pesquisa com seres humanos do HU/UFSC/EBSERH aprovou o presente estudo (**Anexo I**).

Considerando que:

- a) Este é um estudo descritivo retrospectivo que visa estabelecer a casuística dos casos de câncer de boca e orofaringe já diagnosticados.
- b) Não haverá recrutamento e participação direta de seres humanos na pesquisa. A coleta de dados será feita a partir dos prontuários e blocos de parafina provenientes de procedimentos cirúrgicos já realizados para fins de tratamento.
- c) Devido ao diagnóstico tardio, os casos de câncer de boca tendem a apresentar alta morbidade e mortalidade. Dessa maneira, existe a possibilidade de alguns pacientes já terem ido a óbito, ou ainda, apresentarem sequelas graves devido ao tratamento mutilante. Obter o consentimento destes indivíduos ou de seus familiares poderia constituir um aborrecimento e acarretar impactos psicológicos. Assim, considerando que a perda de sigilo dos dados será o maior risco

desta pesquisa e todos os cuidados que serão tomados para evitá-la, o risco de danos psicológicos no momento da obtenção do consentimento representaria maiores prejuízos ao paciente.

- d) Os dados dessa pesquisa contribuirão com a construção do conhecimento científico, visando o desenvolvimento de novos marcadores de prognóstico e novas terapias para aplicação futura.

Diante do exposto, foi solicitado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HU/UFSC/EBSERH a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

8.3 TAMANHO AMOSTRAL

Por se tratar de uma doença rara, selecionou-se uma amostra de conveniência obtida a partir de um censo de todos os pacientes diagnosticados com CE de boca (CEB) e orofaringe (CEO) no SAP- HU/UFSC/EBSERH no período entre 2013-2018. Todos os casos com informações clínicas e material disponível para análise foram incluídos na amostra final.

Coletou-se a amostra em duas etapas. Como previsto no projeto original, o levantamento amostral deveria abranger o período entre 2017-2018. No entanto, identificaram-se apenas 30 casos com base nos critérios de inclusão estabelecidos. Diante disso, solicitou-se uma emenda ao projeto original, a partir da qual incluiu-se o período de 2013-2016 no levantamento (**Anexo II**).

8.4 POPULAÇÃO

Realizou-se um levantamento junto ao serviço de anatomia patológica (SAP) do HU/UFSC/EBSERH, referente ao período entre 2013-2018. Identificaram-se 171 laudos histopatológicos com diagnóstico primário de CEB e CEO. Destes, foi possível recuperar o prontuário de 94 pacientes (**Tabela 1**).

TABELA 1: Características gerais da população (n=94)

Idade	Média (DP)	58,19 ± 10,87	
		Número	%
Sexo	Feminino	20	21,28
	Masculino	74	78,72
Cigarro	Ex	9	9,57
	Não	11	11,70
	Sim	67	71,28
	Não informado	7	7,45
Álcool	Ex	22	23,40
	Não	20	21,28
	Sim	38	40,43
	Não informado	14	14,89
Localização	Assoalho de boca	17	18,09
	Língua	37	39,36
	Orofaringe	17	18,09
	Outro	23	24,46
Estágio clínico	1	18	19,14
	2	6	6,38
	3	12	12,77
	4	41	43,62
	Não informado	17	18,09
Grau histológico	1	21	22,34
	2	57	60,64
	3	8	8,51
	Não informado	8	8,51
Óbitos		4	4,26
Recorrências		23	24,47
Perdidos no acompanhamento		67	71,27
Tempo médio de acompanhamento (dias)	Média (DP)	703,79 (643,11)	
	Máximo	2461	
	Mínimo	25	

DP, desvio padrão. **Fonte:** Elaborada pelo autor com os dados da pesquisa, 2022.

Os critérios para inclusão na amostra foram:

- a) Diagnóstico primário de CE de boca e orofaringe (CID: Cavidade oral: C02-06: mucosa oral, gengiva, alvéolos superiores, gengiva, alvéolos inferiores, língua, assoalho de boca; Orofaringe: C01, C05.1, 2, C09.0, 1, 9, C10.0, 2, 3: parede anterior [área glosso-epiglótica], parede lateral; parede posterior, parede superior).

- b) Disponibilidade de informações sobre o acompanhamento pós-tratamento.
- c) Disponibilidade de blocos de parafina com amostra tecidual suficiente para análise imuno-histoquímica.

Os critérios para exclusão da amostra foram:

- a) Diagnóstico de tumor recorrente.
- b) Histórico recente de tratamento radio/quimioterápico prévio.
- c) Informação no prontuário referente a doenças, condições ou medicamentos que causem imunossupressão ou que possam alterar o resultado do hemograma, como por exemplo, doenças inflamatórias e infecciosas, uso de corticosteroides, tratamento radio/quimioterápico prévio.

Ao final, inclui-se 46 casos de CEB/CEO na amostra (**Tabela 2**).

Tabela 2: Características clínicas dos casos incluídos

		N	%
Idade	Média (DP)	58,58 (10,13)	
	39-59	28	60,9
	>60	18	39,1
Sexo	Masculino	34	73,9
	Feminino	12	26,1
Cigarro	Não	6	13,0
	Sim	40	87,0
Álcool	Não	10	21,7
	Sim	34	73,9
Localização	Língua	22	47,8
	Assoalho	12	26,1
	Outro	5	10,9
	Orofaringe	7	15,2
T	T1	15	32,60
	T2	11	23,9
	T3	11	23,9
	T4	7	15,2
N	N0	24	52,2
	N1	1	2,2
	N2	10	21,7
	N3	2	4,3
M	M0	44	95,7
	M1	2	4,3
Grau de diferenciação histológica	Bem	14	30,43
	Moderadamente	26	56,5
	Pobre	6	13,0
Estágio clínico	1	12	26,08
	2	6	13,0
	3	4	8,7
	4	16	34,8
Óbito		4	8,69
Recorrência		32	69,56
Brotamento tumoral	Baixo	8	17,4
	Moderado	8	17,4
	Alto	27	58,7
Tempo de acompanhamento (dias)	Média (DV)	885,78	(766,07)
	Máximo-Mínimo	2855	39

DV, desvio padrão; N, linfonodos afetados; M, metástase à distância; T, tamanho tumoral. **Fonte:** elaborado pelo autor com dados da pesquisa, 2022.

8.5 VARIÁVEIS

Variáveis clínicas

O avaliador principal coletou as informações clínicas retrospectivamente e as registrou em um banco de dados conforme a informação fornecida no prontuário dos pacientes. Coletou-se os seguintes dados:

- a) Idade: calculada em anos completos de vida, desde a data do nascimento até a data do diagnóstico;
- b) Sexo: Masculino (M) /Feminino (F);
- c) Classificação do tumor primário: Tamanho (T); Linfonodos (N); M (metástase a distância); G (grau de diferenciação histológica); Estágio clínico (I, II, III, IV);
- d) Tratamento: Cirurgia ressectiva/ Quimioterapia/ Radioterapia;
- e) Hábitos: uso ou histórico de uso de cigarro (sim/não/não informado) e álcool (sim/não/não informado);
- f) Localização do tumor;
- g) Sobrevida livre de doença: tempo decorrido (meses) entre a data do início do tratamento e a data de recorrência local;
- h) Sobrevida geral: tempo decorrido (meses) entre a data do diagnóstico até a morte por causas gerais.

Variáveis de estudo

Analisou-se as características histopatológicas a partir dos blocos de parafina contendo amostras teciduais dos tumores, as quais foram obtidas com finalidade de tratamento ou diagnóstico.

- a) Contagem absoluta de neutrófilos (segmentados) e linfócitos: selecionou-se o hemograma com data anterior e mais próxima ao início do tratamento;
- b) Contagem intratumoral de neutrófilos (CD66b) e linfócito T citotóxicos (CD8);
- c) Razão neutrófilo/linfócito intratumoral e sanguínea;
- d) Proporção parênquima/estroma;

- e) Número de brotamentos tumorais;
- f) Padrão de invasão da frente tumoral;
- g) Profundidade de invasão;
- h) Espessura tumoral;
- i) Invasão perineural;
- j) Invasão linfovascular.

8.6 ACOMPANHAMENTO

Realizou-se o acompanhamento dos pacientes mediante o monitoramento dos prontuários. Coletou-se as informações dos prontuários em três fases: primeira coleta em novembro de 2019 (casos 2017-2018), segunda coleta em junho de 2020 (casos de 2013-2016), e atualização de todos os dados e coleta final dos desfechos dos pacientes em dezembro de 2021.

8.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para cada caso, selecionou-se um bloco de parafina representativo do tumor. Em casos de ressecção cirúrgica contendo múltiplos blocos, selecionou-se o bloco com a porção mais profunda do tumor. Para amostras de biópsias incisionais, selecionou-se o caso com a melhor qualidade e quantidade de amostra tumoral disponível para análise. Para cada bloco, realizou-se 4 cortes microscópicos de 3 μm de espessura, um destinado a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e três destinados a imuno-histoquímica. Todos os cortes foram montados em lâminas preparada com solução de APTS (3-aminopropyltriethoxysilene) (Sigma-Aldrich, Saint. Louis, MO, EUA).

Para a reação imuno-histoquímica, as lâminas foram desparafinadas em xilol e hidratadas por passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (100%, 90%, 85%). Realizou-se o bloqueio da atividade da enzima peroxidase após a imersão das lâminas em solução de H₂O₂/metanol a 6%. Prosseguiu-se com a recuperação antigênica em banho-maria a 96°C, com tampão citrato 0.01M (pH 6.0), durante 40 minutos. Em seguida, imergiu-se as lâminas em solução de leite desnatado em pó diluído em solução salina tamponada 0.05M, pH 7.4 (PBS), durante 40 minutos, para o bloqueio das

reações inespecíficas. Realizou-se entre cada processo lavagens com PBS. Ao final do primeiro dia, incubou-se as lâminas com os anticorpos primários para citoqueratina, neutrófilos (CD66b) e linfócitos T citotóxicos (CD8) em câmara úmida a 4°C durante a noite (**Quadro 3**).

Quadro 3: Relação dos anticorpos usados nas reações imuno-histoquímicas

Anticorpo - Marca	Clone - Concentração	Controle positivo
Citoqueratina - Dako Corporation, Estados Unidos	Clone AE1/AE3 - 1:50	Mucosa oral
CD66b - BD Biosciences	Clone G10F5 - 1:500	Granuloma piogênico
CD8 - Dako Corporation, Estados Unidos	Clone C8/144B - pronto para uso	Linfonodos saudáveis

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

No segundo dia de reação, realizou-se a incubação com o anticorpo secundário durante 1 hora (EnVision, Dako Corporation, Carpinteria, California, EUA). Após lavagem com PBS, realizou-se a revelação da reação com solução cromógena contendo diaminobenzidina (DAB) (Dako Corporation, Carpinteria, California, EUA), durante três minutos. Prosseguiu-se para a contra-coloração com hematoxilina de Harris durante dois minutos. Finalmente, as lâminas passaram por uma desidratação em cadeias de concentração crescentes de etanol (85% e 100%), diafanização em xilol e montagem com o adesivo Permunt®.

8.8 ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICA

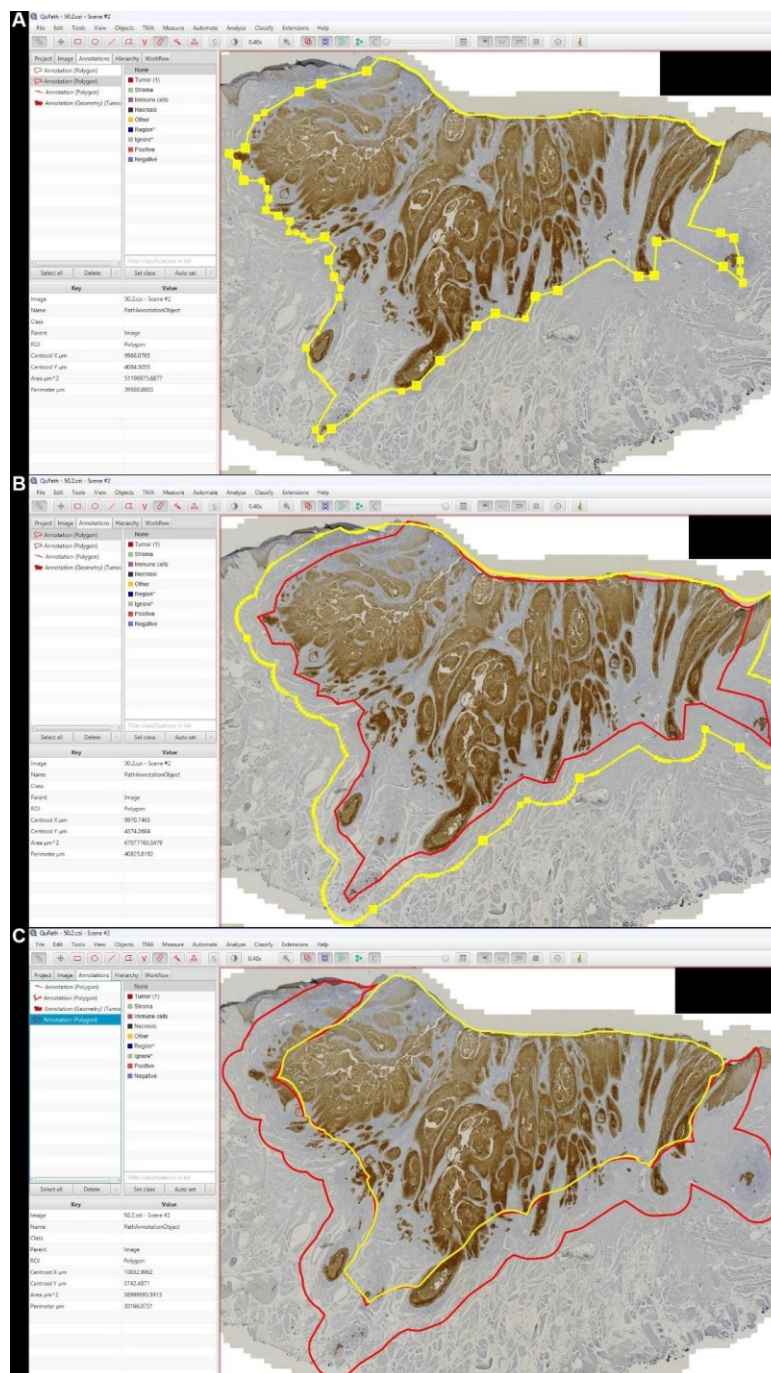
8.8.1 Procedimentos gerais

Após a reação imuno-histoquímica e coloração com H&E, digitalizou-se as lâminas com o digitalizador de lâminas Axio Scan® Zeiss® utilizando a objetiva de 40X (0,11 µm/pixel). As imagens geradas foram importadas para o programa gratuito e de código aberto Qupath® versão 0.2.3 (<https://qupath.github.io/>).

Para cada caso, criou-se um projeto contendo as imagens referentes às lâminas de citoqueratina, CD66b, CD8 e H&E. A sequência geral de trabalho para cada caso é descrita a seguir:

- a) Normalização das colorações presentes nas imagens por meio da ferramenta “*estimate stain vectors*”, a qual permite que o programa faça a correta separação entre hematoxilina, DAB e cor de fundo ¹²²;
- b) Delimitação manual dos limites tumorais com a ferramenta “polygon” utilizando a imagem de citoqueratina (**Figura 4A**);
- c) Expansão das bordas do tumor em 500µm (**Figura 4B**);
- d) Divisão das regiões tumorais em frente de invasão (faixa de 1mm de espessura centralizada na borda do tumor) e centro do tumor (região acima da frente de invasão) (**Figura 4C**) ¹²³;
- e) Análise de proporção tumor/estroma nas imagens de citoqueratina;
- f) Análise do número de brotamentos tumorais nas imagens de citoqueratina;
- g) Exportação dos limites tumorais para as imagens de CD8 e CD66b;
- h) Definição dos campos de análise e contagem manual de células positivas para os marcadores CD8 e CD66b;
- i) Contagem automática de células positivas para os marcadores CD8 e CD66b;
- j) Análise dos parâmetros histopatológicos nas imagens de H&E e citoqueratina;

Figura 5: Fluxo de trabalho para determinar as regiões tumorais de análise



A) Delimitação dos limites tumorais com o auxílio da ferramenta “polygon”; B) Expansão dos limites tumorais em 500µm com a ferramenta “expand annotation” (Objects → Annotation → expand annotation); C) Definição das duas regiões tumorais de análise: frente de invasão (faixa de 1mm de espessura, centralizada nas bordas do tumor) e centro do tumor.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

8.8.2 Análise da proporção entre parênquima e estroma tumoral

Calculou-se a razão entre parênquima e estroma tumoral a partir de imagens de citoqueratina e da ferramenta “create threshold”, a qual é capaz de separar colorações e criar limiares de detecção a partir dos quais calcula-se o tamanho de áreas positivas e negativas. O fluxo de trabalho é descrito a seguir.

Classify → Pixel classification → Create threshold

Ao selecionar a ferramenta abre-se uma caixa de diálogos com os parâmetros a seguir (**Figura 5**):

Resolution: Determina a resolução da imagem a ser analisada, sendo que quanto maior a resolução mais lento será o processo.

Channel: seleciona o canal de cor a ser analisado.

Prefilter: Seleciona o filtro de suavização da imagem, sendo o Gaussiano geralmente melhor.

Smoothing sigma: seleciona o valor para suavização do resultado. Quanto maior o valor mais suave será o limite entre os objetos criados para a separação de áreas.

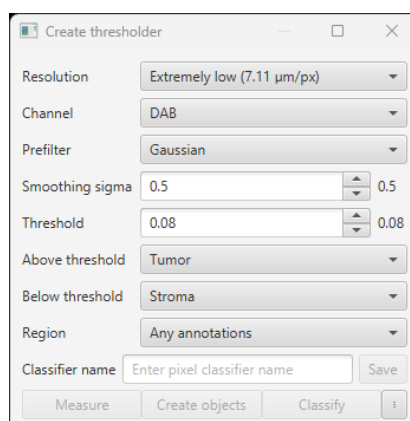
Threshold: determina o valor limite para classificar positivo e negativo.

Above threshold: pixels com coloração acima do limiar serão classificados como positivo.

Below threshold: pixels abaixo do limiar serão classificados como negativos.

Region: Controla em quais regiões da imagem a classificação de pixels irá ocorrer.

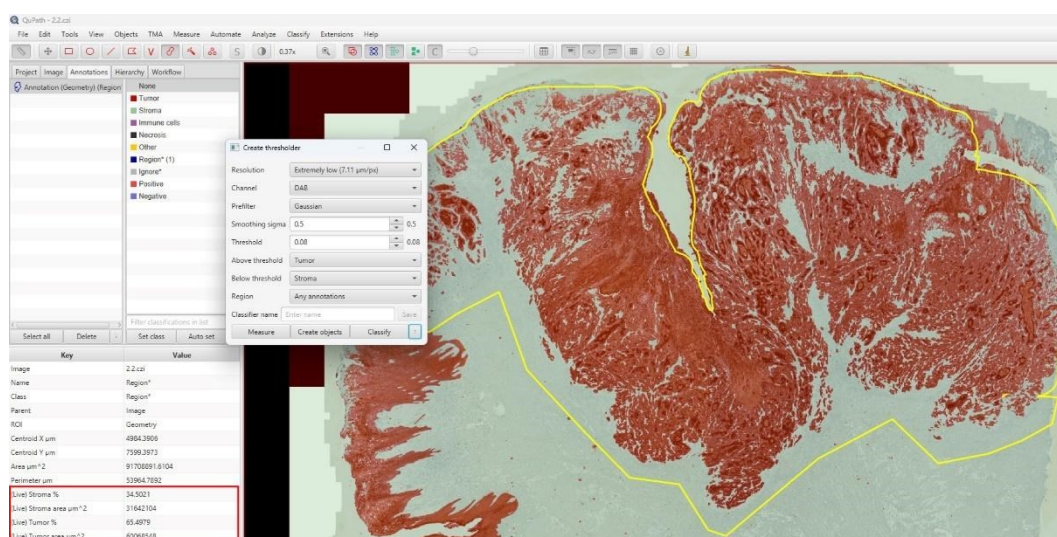
Figura 6: Caixa de diálogos da ferramenta “create threshold”



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Calculou-se a razão parênquima/estroma dividindo-se a porcentagem da área do parênquima tumoral pela porcentagem da área do estroma (**Figura 6**). Resultados acima de 1 indicam maior proporção de parênquima e resultados abaixo de 1 indicam maior proporção de estroma.

Figura 7: Resultado da separação de colorações feita pela ferramenta “create threshold”.



Em vermelho está a área correspondente ao parênquima tumoral e em verde a área correspondente ao estroma. No canto inferior esquerdo é possível ver o cálculo automático da área de cada componente, a qual está normalizada para a região desenhada em amarelo, que contém o centro do tumor e a frente de invasão.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

8.8.3 Análise de brotamento tumoral

Analisou-se o número de brotamentos tumorais a partir das imagens de citoqueratina e da ferramenta “points”. Primeiramente, delimitou-se um quadrado com área de 0.785mm^2 ¹²⁴, que corresponde aproximadamente à objetiva de 20X, utilizando-se a ferramenta “specify annotation”. O fluxo de trabalho está descrito abaixo:

Objects → annotation → specify annotation

A ferramenta abre uma caixa de diálogos com os seguintes parâmetros (**Figura 7 e 8**):

Type: define o formato do objeto que será criado.

Classification: permite a classificação do objeto segundo a necessidade, mas que pode ser deixado em branco sem prejuízos.

X origen e Y origin: permitem determinar as coordenadas da região na qual deseja-se que o objeto seja criado. Se deixado em branco, o objeto será criado no centro da imagem.

Width: define a largura do objeto.

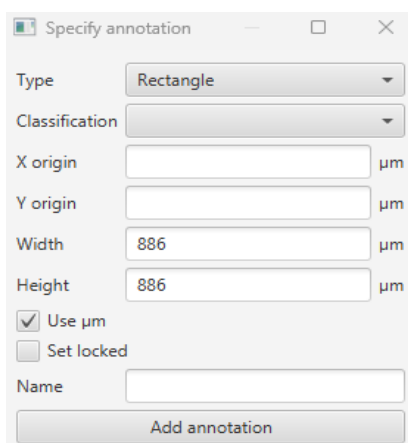
Height: define a altura do objeto.

Use μm : as medidas definidas nas etapas anteriores serão calculadas em micrometros.

Set locked: o objeto sera criado em uma posição “trancada” e não poderá ser movido.

Name: permite criar um nome para o novo objeto.

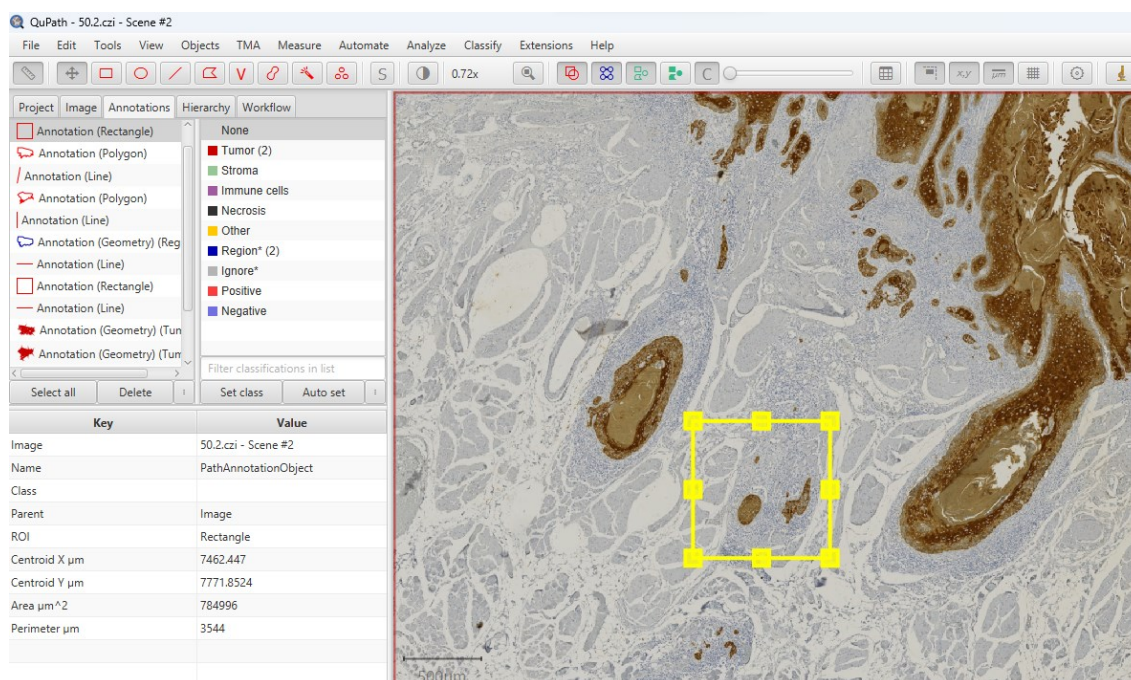
Figura 8: Caixa de diálogos da ferramenta “specify annotation”.



Os valores da altura e largura correspondem a raiz quadrada (em μm) de $0,785 \text{ mm}^2$.

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Figura 9: Objeto resultante dos parâmetros determinados acima na caixa de diálogos



No canto inferior esquerdo é possível ver a área do objeto, sendo aproximadamente $785.000 \mu\text{m}^2$ (correspondente à $0,785 \text{ mm}^2$).

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

Definiu-se como brotamento tumoral a presença de células isoladas ou grupos de até 4 células tumorais. Utilizou-se os seguintes critérios:

- a) Conter no máximo 4 núcleos.
- b) Os núcleos devem ser visíveis e evidenciados pela coloração azulada da hematoxilina (ter pelo menos uma sombra azul – na dúvida não considerar como núcleo).
- c) Para serem consideradas independentes, entre duas ilhotas não deve haver linha ou sombra de marcação com DAB, mesmo que mínima.
- d) A marcação marrom deve ser uniforme e por todo o citoplasma para que uma célula seja considerada positiva, principalmente em casos de células isoladas. Acúmulos focais de DAB no citoplasma não devem ser considerados.

Tomou-se como referência para a contagem de brotamentos a frente de invasão em casos de ressecção cirúrgica, sendo que o avaliador principal realizou uma varredura de toda a frente tumoral para identificar o campo com maior número de brotamentos. Em biópsias, realizou-se a varredura por toda a amostra de tumor disponível para identificar o campo com maior número de brotamentos.

Realizou-se a calibração do avaliador principal (A.F.P.M) juntamente com um avaliador experiente (E.R.C.R). Após uma reunião inicial para definir os parâmetros de brotamento tumoral, selecionou-se 15 casos de maneira aleatória (sorteio) e as regiões de análise foram demarcadas. Os dois avaliadores contaram os brotamentos de maneira independente e o índice de correlação intraclassa (ICC) foi 0,966. Após um intervalo de 21 dias, o avaliador principal realizou uma segunda contagem dos mesmos casos e o ICC foi 0,932.

8.8.4 Procedimentos para a contagem manual dos marcadores CD66b e CD8

Para ambos os marcadores, CD8 e CD66, considerou-se como positiva a marcação do citoplasma celular. No caso de neutrófilos, contabilizou-se células com intensa e uniforme marcação do citoplasma e células com morfologia nuclear

segmentada. Para CD8, contabilizou-se células com marcação forte e bem definida do citoplasma. Para ambos os marcadores, excluiu-se da contagem as células localizadas no interior dos vasos sanguíneos e, em especial para o marcador CD66b, evitou-se áreas de úlcera e de necrose nas quais há intensa infiltração de neutrófilos.

Testou-se a concordância intra-observador por meio do cálculo do ICC. Para tanto, selecionou-se 20% da amostra e o avaliador principal realizou a contagem em dois momentos com um intervalo de 15 dias. O ICC para CD66b foi 0,98 e o ICC para CD8 foi 0,979.

Para a escolha dos campos de análise, selecionou-se de maneira aleatória cinco campos de 1mm² na frente de invasão e cinco campos de 1mm² no centro do tumor. Realizou-se a contagem de células positivas para CD66b e CD8 no total do campo de 1mm², e separadamente no estroma e no parênquima tumoral.

Em casos de ressecção cirúrgica, analisou-se a frente de invasão e o centro de tumor. Sendo que, tumores com espessura insuficiente para análise das duas regiões, analisou-se apenas a frente de invasão.

Para casos de biópsia incisional, analisou-se o centro do tumor devido à ausência de bordas tumorais. Em casos com menos de 5mm² de área tumoral, analisou-se a amostra toda disponível.

Dessa maneira, em 31 casos foi possível analisar a frente de invasão e em 41 casos foi possível analisar o centro do tumor (**Quadro 4**).

Quadro 4: Campos de análise, conforme o tipo de amostra.

Campos	Ressecção	Microinvasivo	Incisional	TOTAL
Fronte - campo total	26	5	-	31
Fronte - parênquima	26	5	-	31
Fronte - estroma	26	5	-	31
Centro do tumor - campo total	26	-	15	41
Centro do tumor - parênquima	26	-	15	41
Centro do tumor -estroma	26	-	15	41

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Calculou-se o número de células positivas para CD66b/mm² e CD8/mm². Sendo que, corrigiu-se as contagens do parênquima e estroma tumoral conforme a área representativa desses compartimentos dentro do campo de 1mm².

As médias dos campos foram calculada a partir de todos os campos analisados em cada região (frente de invasão e centro do tumor) e compartimento (total, estroma e parênquima) tumoral (**Tabela 3**):

- a) Média total: número total de células positivas dividido pelo total de campos de 1mm² analisados;
- b) Média do estroma: total de células positivas dividido pela área correspondente ao estroma.
- c) Média do parênquima: total de células positivas dividido pela área correspondente ao parênquima.

Tabela 3: Exemplo de como as médias eram calculadas para cada região e compartimento tumoral.

Região (compartimento)	Células positivas/campo					Soma	Área (mm ²)	Células/mm ²
	C1	C2	C3	C4	C5			
Fronte (total)	A	B	C	D	E	A+...E	X	soma/X
Fronte (estroma)	F	G	H	I	J	F+...J	Y	soma/Y
Fronte (parênquima)	K	L	M	N	O	K+...O	Z	soma/Z
Fronte (total)	787	732	456	587	383	2945	5	589
Fronte (estroma)	348	565	348	313	311	1885	3,10	608,85
Fronte (parênquima)	439	167	108	274	72	1060	1,90	556,92

X: área total dos campos de análise; Y: área total do estroma nos campos de análise Z: área total do parênquima nos campos de análise

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

8.8.5 Contagem automática de CD66b e CD8

Utilizou-se para a contagem automática os mesmos campos de análise da contagem manual, no entanto, realizou-se a contagem automática apenas para o campo total de 1mm².

Empregou-se para a contagem automática a ferramenta “*fast cell count*”, a qual foi desenvolvida para imagens contendo colorações de DAB e hematoxilina com o intuito de identificar picos de colorações a partir dos quais classifica-se as células como positivas ou negativas. Os limiares de DAB e hematoxilina foram definidos manualmente com base em metodologias previamente publicadas¹²² e após testes visuais para determinar o valor que resultava na melhor detecção de células positivas. Os parâmetros de contagem e a função de cada um são descritos a seguir.

Fluxo de trabalho da ferramenta: Analyze → Cell detection → Fast cell count (brightfield)

A ferramenta selecionada abre uma caixa de diálogos com os seguintes parâmetros (**Figura 9**):

Cell detection channel: permite a escolha dos canais de cores para quais será preciso criar limiares de detecção.

Gaussian sigma: filtro que suaviza picos falsos de cor.

Background radius: filtro de tamanho para identificar estruturas em segundo plano, o qual deve ter valor maior do que o tamanho médio do núcleo.

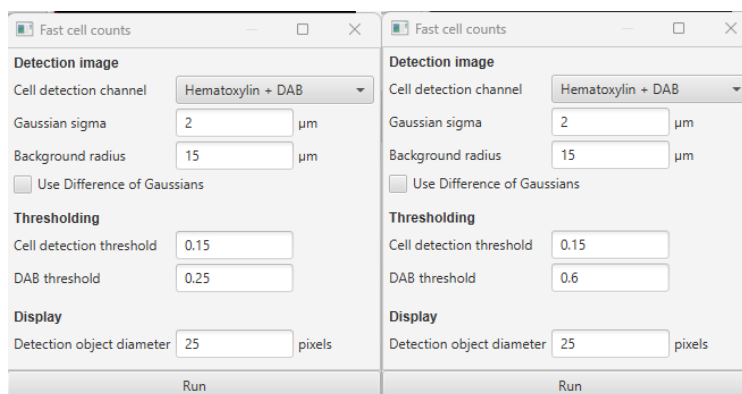
Use difference of Gaussians: filtro que aumenta o número de células detectadas, podendo exagerar no número de células positivas detectadas.

Cell detection thresholding: limiar para identificar picos de hematoxilina (células negativas).

DAB threshold: limiar para identificar picos de DAB (células positivas).

Detection object diameter: tamanho do objeto que será criado ao redor de cada pico de hematoxilina ou DAB, mas que não influencia a quantidade de células detectadas.

Figura 10: Caixa de diálogos aberta ao selecionar-se a ferramenta “fast cell count”.



À esquerda estão os parâmetros para a contagem de CD8 e a direita os parâmetros de contagem para CD66b.

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

8.8.6 Cálculo da razão neutrófilo/linfócito (RNL)

Para calcular a RNL intratumoral, dividiu-se o número de neutrófilos/mm² pelo número de linfócitos/mm². Em ressecções cirúrgicas, calculou-se a RNL intratumoral para a frente de invasão, o centro do tumor e o tumor todo. Em biópsias, calculou-se a RNL do centro do tumor.

Para calcular a RNL sanguínea, dividiu-se o número absoluto de segmentados pelo número absoluto de linfócitos.

8.8.7 Procedimentos para avaliar os critérios histopatológicos

Utilizou-se as imagens de H&E e citoqueratina para a avaliação dos seguintes parâmetros histopatológicos: padrão de invasão da frente tumoral, profundidade de invasão, espessura tumoral, invasão perineural e invasão linfovascular. Os parâmetros histopatológicos foram definidos com base na literatura e dois avaliadores (A.F.P.M e N.L.N) realizaram a classificação de maneira independente após uma reunião para calibrar os critérios. Realizou-se uma segunda reunião para a conferência dos resultados, e as discordâncias foram resolvidas com o auxílio de um terceiro avaliador (E.R.C.R). Os critérios para a classificação de cada parâmetro são descritos a seguir.

- a) Padrão da frente de invasão ¹²⁵: analisado na frente de invasão e correspondente ao pior padrão observado. Classificado em (a) coeso: lençóis tumorais extensos ou ilhas grandes com mais de 15 células; (b) não-coeso: espectro de aparências que incluem cordões estreitos, pequenos grupos de células com menos de 15 células ou células individuais; (c) disperso: células individuais invadindo à uma distância >1mm da massa principal do tumor.
- b) Profundidade de invasão ¹²⁵: identificação da membrana basal do epitélio normal adjacente, a partir da qual uma linha imaginária vertical perpendicular foi traçada até o ponto de maior profundidade do tumor.
- c) Espessura tumoral ²⁸: identificação do ponto mais alto da superfície tumoral, a partir da qual uma linha imaginária vertical perpendicular foi traçada até o ponto de maior profundidade do tumor.
- d) Invasão perineural ¹²⁶: Observação de células tumorais infiltrando através de qualquer uma das três camadas do feixe nervoso (endoneuro, perineuro ou epineuro); ou em proximidade de células tumorais envolvendo no mínimo 1/3 da circunferência do nervo.
- e) Invasão linfovascular ¹²⁷: presença inequívoca de células tumorais no interior do endotélio ou focalmente aderidas à parede vascular.

8.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

8.9.1 Variáveis quantitativas

Avaliou-se a distribuição gaussiana das variáveis de estudo por meio do teste de Shapiro-Wilk. Todas as variáveis em questão não apresentaram distribuição normal, portanto, a amostra é descrita pelas medidas: mediana, distância interquartil, 25° quartil e 75° quartil. Para comparar os valores das variáveis de estudo entre os diferentes grupos de variáveis clínicas, utilizou-se os testes Mann-Whitney (2 grupos) e Kruskal-Wallis (3 grupos; post-hoc Dunn-Bonferroni). Para testar a correlação entre as variáveis de estudo, utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman.

8.9.2 Variáveis qualitativas

Avaliou-se a associação entre as variáveis de estudo qualitativas e as variáveis clínicas por meio dos testes de Qui-Quadrado e Teste exato de Fisher. Observadas associações estatisticamente significantes, utilizou-se a regressão logística para testar a força dessas associações, na qual a variável clínica foi definida como o desfecho e a variável de estudo como exposição. Definiu-se como categoria de referência para o cálculo da razão de chances a variável de exposição com menor chance de ocorrência do desfecho.

8.9.3 Análise de sobrevida

Para comparar o tempo de sobrevida entre grupos, utilizou-se a curva de sobrevida de Kaplan-Meyer e o teste log-rank. As variáveis de estudo quantitativas foram categorizadas a fim de comparações entre grupos utilizando-se a mediana, o 25° e o 75° quartil como pontos de corte. Devido ao tamanho limitado da amostra e do número de eventos de desfecho, a análise de sobrevida restringiu-se à curva de sobrevida.

Em todas as análises, para diferenças entre grupos estatisticamente significantes considerou-se um valor de $\alpha < 0.05$.

REFERÊNCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 71(3):209-49. doi: 10.3322/caac.21660.
2. Capote-Moreno A, Brabyn P, Muñoz-Guerra MF, Sastre-Pérez J, Escorial-Hernandez V, Rodríguez-Campo FJ, et al. Oral squamous cell carcinoma: epidemiological study and risk factor assessment based on a 39-year series. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 49(12):1525-34. doi: 10.1016/j.ijom.2020.03.009.
3. Weckx A, Grochau KJ, Grandoch A, Backhaus T, Zöller JE, Kreppel M. Survival outcomes after surgical treatment of oral squamous cell carcinoma. *Oral diseases* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 26(7):1432-9. doi: 10.1111/odi.13422.
4. Amin M, Edge S, Greene F, Byrd D, Brookland R, Washington M, et al. *AJCC Cancer Staging Manual* (8th edition). Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017.
5. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 67(2):122-37. doi: 10.3322/caac.21389.
6. Dolens EDS, Dourado MR, Almangush A, Salo TA, Gurgel Rocha CA, da Silva SD, et al. The Impact of Histopathological Features on the Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Comprehensive Review and Meta-Analysis. *Frontiers in oncology* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 11:784924. doi: 10.3389/fonc.2021.784924.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* [Internet]. 2000 [cited 2023 07 fev]; 100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. 2011 [cited 2023 07 fev]; 144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
9. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]; 12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.cd-21-1059.
10. Zhou C, Wu Y, Jiang L, Li Z, Diao P, Wang D, et al. Density and location of CD3(+) and CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes correlate with prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 47(4):359-67. doi: 10.1111/jop.12698.
11. Shen M, Hu P, Donskov F, Wang G, Liu Q, Du J. Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-

analysis. PloS one [Internet]. 2014 [cited 2023 07 fev]; 9(6):e98259. doi: 10.1371/journal.pone.0098259.

12. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* [Internet]. 2013 [cited 2023 07 fev]; 39(1):1-10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.

13. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology* [Internet]. 2013 [cited 2023 07 fev]; 13(3):159-75. doi: 10.1038/nri3399.

14. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell* [Internet]. 2009 [cited 2023 07 fev]; 16(3):183-94. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017.

15. Ilie M, Hofman V, Ortholan C, Bonnetaud C, Coelle C, Mouroux J, et al. Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable nonsmall cell lung cancer. *Cancer* [Internet]. 2012 [cited 2023 07 fev]; 118(6):1726-37. doi: 10.1002/cncr.26456.

16. Templeton AJ, McNamara MG, Seruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocana A, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2014 [cited 2023 07 fev]; 106(6):dju124. doi: 10.1093/jnci/dju124.

17. Paramanathan A, Saxena A, Morris DL. A systematic review and meta-analysis on the impact of pre-operative neutrophil lymphocyte ratio on long term outcomes after curative intent resection of solid tumours. *Surgical oncology* [Internet]. 2014 [cited 2023 07 fev]; 23(1):31-9. doi: 10.1016/j.suronc.2013.12.001.

18. Yu Y, Wang H, Yan A, Wang H, Li X, Liu J, et al. Pretreatment neutrophil to lymphocyte ratio in determining the prognosis of head and neck cancer: a meta-analysis. *BMC cancer* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 18(1):383. doi: 10.1186/s12885-018-4230-z.

19. Cho JK, Kim MW, Choi IS, Moon UY, Kim MJ, Sohn I, et al. Optimal cutoff of pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio in head and neck cancer patients: a meta-analysis and validation study. *BMC cancer* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 18(1):969. doi: 10.1186/s12885-018-4876-6.

20. Atty A, Ribeiro C. Relatório sobre o cenário assistencial e epidemiológico do câncer de lábio e cavidade oral no Brasil. Ministério da Saúde, 2020.

21. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology* [Internet]. 2009 [cited 2023 07 fev]; 45(4-5):309-16. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.06.002.

22. Nagao T, Warnakulasuriya S. Screening for oral cancer: Future prospects, research and policy development for Asia. *Oral Oncol* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 105:104632. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104632.
23. Mello FW, Melo G, Pasetto JJ, Silva CAB, Warnakulasuriya S, Rivero ERC. The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations* [Internet]. 2019 [cited 2023 07 fev]; 23(7):2849-59. doi: 10.1007/s00784-019-02958-1.
24. Bosetti C, Carioli G, Santucci C, Bertuccio P, Gallus S, Garavello W, et al. Global trends in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 147(4):1040-9. doi: 10.1002/ijc.32871.
25. Ferreira AK, Carvalho SH, Granville-Garcia AF, Sarmiento DJ, Agripino GG, Abreu MH, et al. Survival and prognostic factors in patients with oral squamous cell carcinoma. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 26(3):e387-e92. doi: 10.4317/medoral.24242.
26. Chiu K, Hosni A, Huang SH, Tong L, Xu W, Lu L, et al. The Potential Impact and Usability of the Eighth Edition TNM Staging Classification in Oral Cavity Cancer. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 33(10):e442-e9. doi: 10.1016/j.clon.2021.05.007.
27. Ghantous Y, Nashef A, Sidransky D, Abdelraziq M, Alkeesh K, Araidy S, et al. Clinical and Prognostic Significance of the Eighth Edition Oral Cancer Staging System. *Cancers* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]; 14(19). doi: 10.3390/cancers14194632.
28. Dirven R, Ebrahimi A, Moeckelmann N, Palme CE, Gupta R, Clark J. Tumor thickness versus depth of invasion - Analysis of the 8th edition American Joint Committee on Cancer Staging for oral cancer. *Oral oncology* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 74:30-3. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.09.007.
29. Zanoni DK, Montero PH, Migliacci JC, Shah JP, Wong RJ, Ganly I, et al. Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015). *Oral Oncol* [Internet]. 2019 [cited 2023 07 fev]; 90:115-21. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.02.001.
30. Pillai J, Chincholkar T, Dixit R, Pandey M. A systematic review of proteomic biomarkers in oral squamous cell cancer. *World journal of surgical oncology* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 19(1):315. doi: 10.1186/s12957-021-02423-y.
31. Ferrari E, Pezzi ME, Cassi D, Pertinhez TA, Spisni A, Meleti M. Salivary Cytokines as Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. *International journal of molecular sciences* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 22(13). doi: 10.3390/ijms22136795.

32. Rivera C, Oliveira AK, Costa RAP, De Rossi T, Paes Leme AF. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral oncology* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 72:38-47. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.07.003.
33. Sasahira T, Kirita T. Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 19(8). doi: 10.3390/ijms19082413.
34. Bernstein JM, Bernstein CR, West CM, Homer JJ. Molecular and cellular processes underlying the hallmarks of head and neck cancer. *European archives of oto-rhino-laryngology* [Internet]. 2013 [cited 2023 07 fev]; 270(10):2585-93. doi: 10.1007/s00405-012-2323-x.
35. Eckert AW, Wickenhauser C, Salins PC, Kappler M, Bukur J, Seliger B. Clinical relevance of the tumor microenvironment and immune escape of oral squamous cell carcinoma. *Journal of translational medicine* [Internet]. 2016 [cited 2023 07 fev]; 14:85. doi: 10.1186/s12967-016-0828-6.
36. Chen TC, Wu CT, Wang CP, Hsu WL, Yang TL, Lou PJ, et al. Associations among pretreatment tumor necrosis and the expression of HIF-1 α and PD-L1 in advanced oral squamous cell carcinoma and the prognostic impact thereof. *Oral oncology* [Internet]. 2015 [cited 2023 07 fev]; 51(11):1004-10. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.08.011.
37. Wickenhauser C, Bethmann D, Kappler M, Eckert AW, Steven A, Bukur J, et al. Tumor Microenvironment, HLA Class I and APM Expression in HPV-Negative Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 13(4). doi: 10.3390/cancers13040620.
38. Han Z, Dong Y, Lu J, Yang F, Zheng Y, Yang H. Role of hypoxia in inhibiting dendritic cells by VEGF signaling in tumor microenvironments: mechanism and application. *American journal of cancer research* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 11(8):3777-93.
39. Kikuchi K, Kusama K, Sano M, Nakanishi Y, Ishige T, Ohni S, et al. Vascular endothelial growth factor and dendritic cells in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Anticancer research* [Internet]. 2006 [cited 2023 07 fev]; 26(3a):1833-48.
40. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* [Internet]. 2019 [cited 2023 07 fev]; 20(2):69-84. doi: 10.1038/s41580-018-0080-4.
41. Ling Z, Cheng B, Tao X. Epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: Challenges and opportunities. *Int J Cancer* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 148(7):1548-61. doi: 10.1002/ijc.33352.
42. Togni L, Caponio VCA, Zerman N, Troiano G, Zhurakivska K, Lo Muzio L, et al. The Emerging Impact of Tumor Budding in Oral Squamous Cell Carcinoma:

Main Issues and Clinical Relevance of a New Prognostic Marker. *Cancers* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]; 14(15). doi: 10.3390/cancers14153571.

43. Hong KO, Oh KY, Shin WJ, Yoon HJ, Lee JI, Hong SD. Tumor budding is associated with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma and histologically represents an epithelial-mesenchymal transition process. *Human pathology* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 80:123-9. doi: 10.1016/j.humpath.2018.06.012.

44. Wang C, Huang H, Huang Z, Wang A, Chen X, Huang L, et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2011 [cited 2023 07 fev]; 40(7):545-51. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01041.x.

45. Attramadal CG, Kumar S, Boysen ME, Dhakal HP, Nesland JM, Bryne M. Tumor Budding, EMT and Cancer Stem Cells in T1-2/N0 Oral Squamous Cell Carcinomas. *Anticancer research* [Internet]. 2015 [cited 2023 07 fev]; 35(11):6111-20.

46. Jensen DH, Dabelsteen E, Specht L, Fiehn AM, Therkildsen MH, Jønson L, et al. Molecular profiling of tumour budding implicates TGF β -mediated epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* [Internet]. 2015 [cited 2023 07 fev]; 236(4):505-16. doi: 10.1002/path.4550.

47. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* [Internet]. 2019 [cited 2023 07 fev]; 51(1):27-41. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.025.

48. Miguel AFP, Embaló B, Alves Dias HB, Rivero ERC. Immunohistochemical Expression of MMP-9, TIMP-1, and Vimentin and its Correlation With Inflammatory Reaction and Clinical Parameters in Oral Epithelial Dysplasia. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 29(5):382-9. doi: 10.1097/pai.0000000000000910.

49. Tampa M, Mitran MI, Mitran CI, Sarbu MI, Matei C, Nicolae I, et al. Mediators of Inflammation - A Potential Source of Biomarkers in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of immunology research* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 2018:1061780. doi: 10.1155/2018/1061780.

50. Ding M, Song Y, Jing J, Tian M, Ding L, Li Q, et al. The Ratio of Preoperative Serum Biomarkers Predicts Prognosis in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in oncology* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 11:719513. doi: 10.3389/fonc.2021.719513.

51. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Current biology : CB* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 30(16):R921-r5. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081.

52. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic

review. *Molecular cancer* [Internet]. 2019 [cited 2023 07 fev]; 18(1):63. doi: 10.1186/s12943-019-0983-5.

53. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell communication and signaling : CCS* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 18(1):59. doi: 10.1186/s12964-020-0530-4.

54. Wang G, Zhang M, Cheng M, Wang X, Li K, Chen J, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma: Functions and regulatory mechanisms. *Cancer letters* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 507:55-69. doi: 10.1016/j.canlet.2021.03.009.

55. Liu C, Wang M, Zhang H, Li C, Zhang T, Liu H, et al. Tumor microenvironment and immunotherapy of oral cancer. *European journal of medical research* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]; 27(1):198. doi: 10.1186/s40001-022-00835-4.

56. Dourado MR, Guerra ENS, Salo T, Lambert DW, Coletta RD. Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 47(5):443-53. doi: 10.1111/jop.12623.

57. Huang Z, Xie N, Liu H, Wan Y, Zhu Y, Zhang M, et al. The prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2019 [cited 2023 07 fev]; 48(9):788-98. doi: 10.1111/jop.12927.

58. Lei X, Lei Y, Li JK, Du WX, Li RG, Yang J, et al. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer letters* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 470:126-33. doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.009.

59. Hadler-Olsen E, Wirsing AM. Tissue-infiltrating immune cells as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* [Internet]. 2019 [cited 2023 07 fev]; 120(7):714-27. doi: 10.1038/s41416-019-0409-6.

60. Del Prete A, Sozio F, Barbazza I, Salvi V, Tiberio L, Laffranchi M, et al. Functional Role of Dendritic Cell Subsets in Cancer Progression and Clinical Implications. *International journal of molecular sciences* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 21(11). doi: 10.3390/ijms21113930.

61. Neuwirth T, Knapp K, Stary G. (Not) Home alone: Antigen presenting cell - T Cell communication in barrier tissues. *Frontiers in immunology* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]; 13:984356. doi: 10.3389/fimmu.2022.984356.

62. Zhong LM, Liu ZG, Zhou X, Song SH, Weng GY, Wen Y, et al. Expansion of PMN-myeloid derived suppressor cells and their clinical relevance in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2019 [cited 2023 07 fev]; 95:157-63. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.06.004.

63. Atsumu K, Haruka S, Kanako K, Hitoshi M, Kensuke Y, Tsuyoshi S, et al. Myeloid-derived suppressor cells and plasmacytoid dendritic cells are associated with oncogenesis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]; 52(1):9-19. doi: 10.1111/jop.13386.
64. Basu A, Ramamoorthi G, Albert G, Gallen C, Beyer A, Snyder C, et al. Differentiation and Regulation of T(H) Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 12:669474. doi: 10.3389/fimmu.2021.669474.
65. O'Higgins C, Ward FJ, Abu Eid R. Deciphering the Role of Regulatory CD4 T Cells in Oral and Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review. *Frontiers in oncology* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 8:442. doi: 10.3389/fonc.2018.00442.
66. Wouters MCA, Nelson BH. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 24(24):6125-35. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-18-1481.
67. Suárez-Sánchez FJ, Lequerica-Fernández P, Rodrigo JP, Hermida-Prado F, Suárez-Canto J, Rodríguez-Santamarta T, et al. Tumor-Infiltrating CD20(+) B Lymphocytes: Significance and Prognostic Implications in Oral Cancer Microenvironment. *Cancers* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 13(3). doi: 10.3390/cancers13030395.
68. Huang Z, Lu Y, Wang W, Xie N, Yi C, Xiong G, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating immune cells in clinical early-stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]. doi: 10.1111/jop.13357.
69. Mesker WE, Junggeburst JM, Szuhai K, de Heer P, Morreau H, Tanke HJ, et al. The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage. *Cellular oncology* [Internet]. 2007 [cited 2023 07 fev]; 29(5):387-98. doi: 10.1155/2007/175276.
70. Wu J, Liang C, Chen M, Su W. Association between tumor-stroma ratio and prognosis in solid tumor patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [cited 2023 07 fev]; 7(42):68954-65. doi: 10.18632/oncotarget.12135.
71. Almangush A, Heikkinen I, Bakhti N, Mäkinen LK, Kauppila JH, Pukkila M, et al. Prognostic impact of tumour-stroma ratio in early-stage oral tongue cancers. *Histopathology* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 72(7):1128-35. doi: 10.1111/his.13481.
72. Mascitti M, Zhurakivska K, Togni L, Caponio VCA, Almangush A, Balercia P, et al. Addition of the tumour-stroma ratio to the 8th edition American Joint Committee on Cancer staging system improves survival prediction for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Histopathology* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 77(5):810-22. doi: 10.1111/his.14202.

73. Dourado MR, Miwa KYM, Hamada GB, Paranaíba LMR, Sawazaki-Calone Í, Domingueti CB, et al. Prognostication for oral squamous cell carcinoma patients based on the tumour-stroma ratio and tumour budding. *Histopathology* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 76(6):906-18. doi: 10.1111/his.14070.
74. Niranjana KC, Sarathy NA. Prognostic impact of tumor-stroma ratio in oral squamous cell carcinoma - A pilot study. *Annals of diagnostic pathology* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 35:56-61. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2018.05.005.
75. Qiu J, Jiang E, Shang Z. Prognostic value of tumor-stroma ratio in oral carcinoma: Role of cancer-associated fibroblasts. *Oral diseases* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]. doi: 10.1111/odi.14203.
76. Silva GVD, da Silva Dolens E, Paranaíba LMR, Ayroza ALC, Gurgel Rocha CA, Almangush A, et al. Exploring the combination of tumor-stroma ratio, tumor-infiltrating lymphocytes, and tumor budding with WHO histopathological grading on early-stage oral squamous cell carcinoma prognosis. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]. doi: 10.1111/jop.13359.
77. Huang S, Cai H, Song F, Zhu Y, Hou C, Hou J. Tumor-stroma ratio is a crucial histological predictor of occult cervical lymph node metastasis and survival in early-stage (cT1/2N0) oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]; 51(4):450-8. doi: 10.1016/j.ijom.2021.06.011.
78. Sung YE, Kim MS, Lee YS. Proposal of a scoring system for predicting pathological risk based on a semiautomated analysis of whole slide images in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 43(5):1581-91. doi: 10.1002/hed.26621.
79. Cruvinel WdM, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, de Souza AWS, da Silva NP, et al. Sistema imunitário - Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia* [Internet]. 2010 [cited 2023 07 fev]; 50(4):434-61. doi: 10.1590/S0482-50042010000400008
80. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 18(2):134-47. doi: 10.1038/nri.2017.105.
81. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell reports* [Internet]. 2015 [cited 2023 07 fev]; 10(4):562-73. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.039.
82. Shaul ME, Fridlender ZG. Cancer-related circulating and tumor-associated neutrophils - subtypes, sources and function. *FEBS J* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 285(23):4316-42. doi: 10.1111/febs.14524.

83. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2016 [cited 2023 07 fev]; 16(7):431-46. doi: 10.1038/nrc.2016.52.
84. Chen LC, Wang LJ, Tsang NM, Ojcius DM, Chen CC, Ouyang CN, et al. Tumour inflammasome-derived IL-1 β recruits neutrophils and improves local recurrence-free survival in EBV-induced nasopharyngeal carcinoma. *EMBO molecular medicine* [Internet]. 2012 [cited 2023 07 fev]; 4(12):1276-93. doi: 10.1002/emmm.201201569.
85. Rao H-L, Chen J-W, Li M, Xiao Y-B, Fu J, Zeng Y-X, et al. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PloS one* [Internet]. 2012 [cited 2023 07 fev]; 7(1):e30806-e. doi: 10.1371/journal.pone.0030806.
86. Hedrick CC, Malanchi I. Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]; 22(3):173-87. doi: 10.1038/s41577-021-00571-6.
87. Hu X, Xiang F, Feng Y, Gao F, Ge S, Wang C, et al. Neutrophils Promote Tumor Progression in Oral Squamous Cell Carcinoma by Regulating EMT and JAK2/STAT3 Signaling Through Chemerin. *Frontiers in oncology* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]; 12:812044. doi: 10.3389/fonc.2022.812044.
88. Yu T, Tang Q, Chen X, Fan W, Zhou Z, Huang W, et al. TGF- β 1 and IL-17A mediate the protumor phenotype of neutrophils to regulate the epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 50(4):353-61. doi: 10.1111/jop.13122.
89. Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol* [Internet]. 2008 [cited 2023 07 fev]; 83(4):288-95. doi: 10.1002/ajh.21078.
90. Garley M, Jabłońska E, Milyk W, Grubczak K, Surażyński A, Ratajczak-Wrona W, et al. Cancers Cells in Traps? The Pathways of NETs Formation in Response to OSCC in Humans-A Pilot Study. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 27(1):1073274820960473. doi: 10.1177/1073274820960473.
91. De Meo ML, Spicer JD. The role of neutrophil extracellular traps in cancer progression and metastasis. *Semin Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 57:101595. doi: 10.1016/j.smim.2022.101595.
92. Hadjigol S, Shah BA, O'Brien-Simpson NM. The 'Danse Macabre'-Neutrophils the Interactive Partner Affecting Oral Cancer Outcomes. *Frontiers in immunology* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]; 13:894021. doi: 10.3389/fimmu.2022.894021.
93. Powell DR, Huttenlocher A. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology* [Internet]. 2016 [cited 2023 07 fev]; 37(1):41-52. doi: 10.1016/j.it.2015.11.008.

94. Caldeira PC, Vieira ELM, Sousa AA, Teixeira AL, Aguiar MCF. Immunophenotype of neutrophils in oral squamous cell carcinoma patients. *Journal of oral pathology & medicine* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 46(9):703-9. doi: 10.1111/jop.12575.
95. Aral CA, Ölçer SN, Aral K, Kapila Y. Oxidative stress, neutrophil elastase and IGFBP7 levels in patients with oropharyngeal cancer and chronic periodontitis. *Oral diseases* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 26(7):1393-401. doi: 10.1111/odi.13370.
96. Goertzen C, Mahdi H, Laliberte C, Meirson T, Eymael D, Gil-Henn H, et al. Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasion. *Oncotarget* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 9(49):29047-63. doi: 10.18632/oncotarget.25540.
97. Laliberté C, Ng N, Eymael D, Higgins K, Ali A, Kiss A, et al. Characterization of Oral Squamous Cell Carcinoma Associated Inflammation: A Pilot Study. *Frontiers in oral health* [Internet]. 2021 [cited 2023 07 fev]; 2:740469. doi: 10.3389/froh.2021.740469.
98. Valero C, Zanoni DK, Pillai A, Ganly I, Morris LGT, Shah JP, et al. Host Factors Independently Associated With Prognosis in Patients With Oral Cavity Cancer. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 146(8):699-707. doi: 10.1001/jamaoto.2020.1019.
99. Diao P, Wu Y, Ge H, Li J, Zhang W, Huang R, et al. Preoperative circulating platelet, neutrophil, and lymphocyte counts predict survival in oral cancer. *Oral diseases* [Internet]. 2019 [cited 2023 07 fev]; 25(4):1057-66. doi: 10.1111/odi.13049.
100. Li C, Zhao L, Wang Q, Ma S, Sun J, Ma C, et al. Neutrophils infiltration and its correlation with human papillomavirus status in the oral squamous cell carcinoma. *Cancer management and research* [Internet]. 2019 [cited 2023 07 fev]; 11:5171-85. doi: 10.2147/cmar.s202465.
101. Zhou C, Diao P, Wu Y, Wei Z, Jiang L, Zhang W, et al. Development and validation of a seven-immune-feature-based prognostic score for oral squamous cell carcinoma after curative resection. *Int J Cancer* [Internet]. 2020 [cited 2023 07 fev]; 146(4):1152-63. doi: 10.1002/ijc.32571.
102. Silva RNF, Dallarmi LB, Araujo AKC, Alencar RCG, Mendonça EF, Silva TA, et al. Immunohistochemical analysis of neutrophils, interleukin-17, matrix metalloproteinase-9, and neofomed vessels in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 47(9):856-63. doi: 10.1111/jop.12762.
103. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 541(7637):321-30. doi: 10.1038/nature21349.

104. Mesquita JD, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Cruvinel WdM, Andrade LEC, et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia* [Internet]. 2010 [cited 2023 07 fev]; 50:552-80. doi: 10.1590/S0482-50042010000500008.
105. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* [Internet]. 2002 [cited 2023 07 fev]; 20:323-70. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730.
106. Martinez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* [Internet]. 2015 [cited 2023 07 fev]; 21(22):5047-56. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-15-0685.
107. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature reviews Immunology* [Internet]. 2015 [cited 2023 07 fev]; 15(8):486-99. doi: 10.1038/nri3862.
108. Fang J, Li X, Ma D, Liu X, Chen Y, Wang Y, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. *BMC cancer* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 17(375). doi: 10.1186/s12885-017-3317-2.
109. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, McHugh J, Rozek L, Virani S, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* [Internet]. 2016 [cited 2023 07 fev]; 38(7):1074-84. doi: 10.1002/hed.24406.
110. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *British journal of cancer* [Internet]. 2014 [cited 2023 07 fev]; 110(6):1595-605. doi: 10.1038/bjc.2014.46.
111. Stasikowska-Kanicka O, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Immunohistochemical Analysis of Foxp3(+), CD4(+), CD8(+) Cell Infiltrates and PD-L1 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathology oncology research: POR* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 24(3):497-505. doi: 10.1007/s12253-017-0270-y.
112. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 8:561. doi: 10.3389/fphar.2017.00561.
113. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology* [Internet]. 2005 [cited 2023 07 fev]; 6(4):338-44. doi: 10.1038/ni1180.
114. Chen WY, Wu CT, Wang CW, Lan KH, Liang HK, Huang BS, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with operable

tongue cancer. *Radiation oncology* (London, England) [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 13(1):157. doi: 10.1186/s13014-018-1099-6.

115. Forget P, Khalifa C, Defour J-P, Latinne D, Van Pel M-C, De Kock M. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Res Notes* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 10(1):12. doi: 10.1186/s13104-016-2335-5.

116. Muhaxheri G, Vucicevic Boras V, Fucic A, Plavec D, Sekerija M, Filipovic M, et al. Multivariate analysis of preoperative and postoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio as an indicator of head and neck squamous cell carcinoma outcome. *International journal of oral and maxillofacial surgery* [Internet]. 2018 [cited 2023 07 fev]; 47(8):965-70. doi: 10.1016/j.ijom.2018.02.011.

117. Chen F, Lin L, Yan L, Qiu Y, Cai L, He B. Preoperative Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts the Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Large-Sample Prospective Study. *Journal of oral and maxillofacial surgery* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 75(6):1275-82. doi: 10.1016/j.joms.2016.11.022.

118. Nakashima H, Matsuoka Y, Yoshida R, Nagata M, Hirose A, Kawahara K, et al. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio predicts the chemoradiotherapy outcome and survival in patients with oral squamous cell carcinoma: a retrospective study. *BMC cancer* [Internet]. 2016 [cited 2023 07 fev]; 16(41). doi: 10.1186/s12885-016-2079-6.

119. Acharya S, Rai P, Hallikeri K, Anehosur V, Kale J. Preoperative platelet lymphocyte ratio is superior to neutrophil lymphocyte ratio to be used as predictive marker for lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Journal of investigative and clinical dentistry* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 8(3):e12219. doi: 10.1111/jicd.12219.

120. Rachidi S, Wallace K, Wrangle JM, Day TA, Alberg AJ, Li Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and overall survival in all sites of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* [Internet]. 2016 [cited 2023 07 fev]; 38 Suppl 1:E1068-74. doi: 10.1002/hed.24159.

121. Farhan-Alanie OM, McMahon J, McMillan DC. Systemic inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection of oral squamous cell carcinoma. *The British journal of oral & maxillofacial surgery* [Internet]. 2015 [cited 2023 07 fev]; 53(2):126-31. doi: 10.1016/j.bjoms.2014.10.007.

122. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific reports* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 7(1):16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.

123. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host

Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Advances in anatomic pathology* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 24(5):235-51. doi: 10.1097/pap.000000000000162.

124. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern pathology* [Internet]. 2017 [cited 2023 07 fev]; 30(9):1299-311. doi: 10.1038/modpathol.2017.46.

125. Müller S, Boy SC, Day TA, Magliocca KR, Richardson MS, Sloan P, et al. Data Set for the Reporting of Oral Cavity Carcinomas: Explanations and Recommendations of the Guidelines From the International Collaboration of Cancer Reporting. *Archives of pathology & laboratory medicine* [Internet]. 2019 [cited 2023 07 fev]; 143(4):439-46. doi: 10.5858/arpa.2018-0411-SA.

126. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer* [Internet]. 2009 [cited 2023 07 fev]; 115(15):3379-91. doi: 10.1002/cncr.24396.

127. Mascitti M, Togni L, Caponio VCA, Zhurakivska K, Bizzoca ME, Contaldo M, et al. Lymphovascular invasion as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma: a comprehensive review. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2022 [cited 2023 07 fev]; 51(1):1-9. doi: 10.1016/j.ijom.2021.03.007.

ANEXOS

Anexo I – Parecer consubstanciado do Comitê de ética do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Valor prognóstico da razão neutrófilo/linfócito intra-tumoral em pacientes com carcinoma epidermoide da boca e orofaringe

Pesquisador: Elena Riet Correa Rivero

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17674419.9.0000.0121

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.490.975

Apresentação do Projeto:

Trata-se do parecer de um estudo observacional do tipo coorte prospectiva-retrospectiva. Serão selecionados retrospectivamente pacientes diagnosticados com CE de boca e orofaringe admitidos para tratamento no serviço ambulatorial de cabeça e pescoço do Centro de pesquisas oncológicas (CEPON) e do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH). O referido projeto de Tese de Doutorado está vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina do doutoranda Andressa Fernanda Paza Miguel sendo orientado pela profa. Dra Elena Riet Correa Rivero. Os pesquisadores solicitam dispensa de TCLE com as seguintes argumentações: "por ser um estudo descritivo retrospectivo que visa estabelecer a casuística dos casos de câncer de boca e orofaringe já diagnosticados. 2. Não haverá recrutamento e participação direta de seres humanos na pesquisa. A coleta de dados será feita a partir dos pronturários e blocos de parafina provenientes de procedimentos cirurgicos já realizados para fins de tratamento. 3. Devido ao diagnóstico tardio, os casos de câncer de boca e orofaringe tendem a apresentar alta morbidade e mortalidade. Dessa maneira, existe a possibilidade de alguns pacientes já terem ido a óbito, ou ainda, apresentarem sequelas graves devido ao tratamento mutilante. Obter o consentimento destes indivíduos ou de seus familiares, poderia constituir um aborrecimento e acarretar impactos psicológicos. Assim, considerando que a perda de sigilo dos dados será o maior risco desta pesquisa e todos os cuidados que serão tomados para evita-lo, o risco de danos psicológicos no momento da obtenção do consentimento

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.490.975

representaria maiores prejuízos ao paciente.4. Os casos tratados pelo CEPON não provêm apenas da cidade de Florianópolis. Diversos casos são oriundos de outras regiões do Estado, por tratar-se de um Centro de Referência no tratamento oncológico.5. Os dados dessa pesquisa contribuirão com a construção do conhecimento científico, visando o desenvolvimento de novos marcadores de prognóstico e novas terapias para aplicação futura. Diante do exposto será solicitada ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do CEPON e HU/UFSC/EBSERH a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a razão neutrófilo/linfócito (NLR) no sangue e nos tumores de pacientes com carcinoma epidermoide (CE) de boca e orofaringe e sua influência na sobrevida dos mesmos.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a contagem absoluta de neutrófilos no sangue e seu marcador imuno-histoquímico no ambiente intra-tumoral de pacientes com CE;
- Avaliar a contagem absoluta de linfócitos no sangue e seu marcador imuno-histoquímico no ambiente intra-tumoral de pacientes com CE;
- Calcular a NLR no sangue e no ambiente intra-tumoral de pacientes com CE e avaliar seu impacto na sobrevida global, livre de doença e doença específica;
- Comparar o valor prognóstico do NLR sanguíneo e tecidual na sobrevida de pacientes com CE;
- Avaliar a correlação entre a contagem de neutrófilos, linfócitos e do NLR com as características clínicas de pacientes com CE.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Durante a pesquisa será utilizado apenas o material resultante da cirurgia para retirada da lesão previamente realizada e informações presentes na ficha clínica, os quais se encontram armazenados nos arquivos do CEPON e HU, sem causar novamente os desconfortos da cirurgia e da coleta sanguínea já realizadas. Os pesquisadores serão os únicos que terão acesso aos dados, entretanto há um risco de perda de sigilo dessas informações, mesmo que involuntário e não intencional, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, mas mostrarão apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome ou qualquer informação relacionada à privacidade.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.490.975

Benefícios:

Os dados dessa pesquisa contribuirão com a construção do conhecimento científico, visando o desenvolvimento de novos marcadores de prognóstico e novas terapias para aplicação futura.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e apresenta importantes contribuições ao diagnóstico e tratamento oncológico. Há a presença de documentos necessários à submissão e nos documentos emitidos pelo CEPON e o Hospital Universitário são mencionados cuidados no acesso ao material a ser utilizado na pesquisa, referendando os aspectos relacionados ao sigilo quanto às informações dos pacientes a serem realizados pelos funcionários que farão a disponibilização de dados, materiais e informações para o pesquisador - garantindo-se o anonimato das informações específicas do paciente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicita-se dispensa de TCLE pelos motivos expostos no item apresentação deste parecer.

Recomendações:

não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclusão: aprovado.

Embora o período pretendido para acesso aos pacientes referendado pelos pesquisadores como de 2017 a 2018 constitua-se em possibilidade para solicitação de um TCLE, este Comitê considerou a exposição de motivos dos pesquisadores e as garantias de anonimização dos dados informados pelas instituições nas quais o estudo será realizado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1379544.pdf	12/07/2019 11:06:32		Aceito
Folha de Rosto	Follhaderosto.pdf	12/07/2019 11:03:15	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.docx	12/07/2019 11:01:49	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito
Declaração de	Declaracao_material_biologico_HU.	28/06/2019	Andressa Fernanda	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.490.975

Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	pdf	18:18:56	Paza Miguel	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_da_Instituicao_Hu.docx	28/06/2019 18:18:38	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_da_Intituicao_CEPON.pdf	28/06/2019 18:16:17	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 07 de Agosto de 2019

Assinado por:
Maria Luiza Bazzo
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Anexo II – Parecer consubstanciado do Comitê de ética do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH) em resposta a emenda proposta ao projeto.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Valor prognóstico da razão neutrófilo/linfócito intra-tumoral em pacientes com carcinoma epidermoide da boca e orofaringe

Pesquisador: Elena Riet Correa Rivero

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17674419.9.0000.0121

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.972.442

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda relacionado a um estudo observacional do tipo coorte prospectiva-retrospectiva no qual serão selecionados retrospectivamente pacientes diagnosticados com CE de boca e orofaringe admitidos para tratamento no serviço ambulatorial de cabeça e pescoço do Centro de pesquisas oncológicas (CEPON) e do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH). O referido projeto vincula-se a Tese de Doutorado está vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina do doutoranda Andressa Fernanda Paza Miguel sendo orientado pela profa. Dra Elena Riet Correa Rivero. Os pesquisadores solicitam dispensa de TCLE na primeira versão do projeto mantendo na presente emenda os mesmos argumentos e sem alteração dos objetivos e nem da metodologia da coleta de dados. O motivo da emenda solicita a ampliação da amostra apenas no centro coordenador com os seguintes argumentos: "A emenda proposta a seguir visa o aumento do tamanho amostral. A presente pesquisa iniciou com a proposta de realizar um censo com o intuito de identificar todos os casos de Carcinoma Epidermoide de Boca do HU/UFSC/EBSERH diagnosticados entre os anos 2017-2018, por não haver levantamento prévio semelhante que pudesse fornecer uma previsão dos número de casos a serem incluídos na pesquisa. Após o levantamento de casos no período proposto, foi possível identificar e incluir na amostra final 30 casos. Estando este número abaixo do previsto para a amostra final (100 casos), a presente emenda tem por objetivo aumentar o tamanho amostral por estender o período de seleção

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.972.442

retrospectiva dos pacientes, iniciando no ano de 2009. Assim, com base no levantamento já realizado, espera-se incluir pelo menos 100 casos na amostra final." Portanto, o período de coleta de informações será de 2009-2018.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a razão neutrófilo/linfócito (NLR) no sangue e nos tumores de pacientes com carcinoma epidermoide (CE) de boca e orofaringe e sua influência na sobrevida dos mesmos.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a contagem absoluta de neutrófilos no sangue e seu marcador imuno-histoquímico no ambiente intra-tumoral de pacientes com CE;
- Avaliar a contagem absoluta de linfócitos no sangue e seu marcador imuno-histoquímico no ambiente intra-tumoral de pacientes com CE;
- Calcular a NLR no sangue e no ambiente intra-tumoral de pacientes com CE e avaliar seu impacto na sobrevida global, livre de doença e doença específica;
- Comparar o valor prognóstico do NLR sanguíneo e tecidual na sobrevida de pacientes com CE;
- Avaliar a correlação entre a contagem de neutrófilos, linfócitos e do NLR com as características clínicas de pacientes com CE.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Durante a pesquisa será utilizado apenas o material resultante da cirurgia para retirada da lesão previamente realizada e informações presentes na ficha clínica, os quais se encontram armazenados nos arquivos do CEPON e HU, sem causar novamente os desconfortos da cirurgia e da coleta sanguínea já realizadas. Os pesquisadores serão os únicos que terão acesso aos dados, entretanto há um risco de perda de sigilo dessas informações, mesmo que involuntário e não intencional, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, mas mostrarão apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome ou qualquer informação relacionada à privacidade.

Benefícios:

Os dados dessa pesquisa contribuirão com a construção do conhecimento científico, visando o desenvolvimento de novos marcadores de prognóstico e novas terapias para aplicação futura.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.972.442

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Permanecem os mesmos comentários apresentados na primeira apreciação do projeto. Na presente emenda os pesquisadores anexaram a anuência do HU/UFSC sobre a ampliação da amostra para a coleta de dados. Demais informações do Projeto apresentam-se as mesmas. o Cronograma contempla a extensão da amostra.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Permanece a mesma informação sobre a solicitação de dispensa de TCLE da primeira versão apresentada.

Recomendações:

não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclusão: aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1527237_E1.pdf	25/03/2020 16:26:49		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Corrigido_EMENDA.docx	25/03/2020 16:22:16	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Ciencia_da_Instituicao_Emenda.pdf	18/03/2020 12:24:13	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito
Folha de Rosto	Follhaderosto.pdf	12/07/2019 11:03:15	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.docx	12/07/2019 11:01:49	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_material_biologico_HU.pdf	28/06/2019 18:18:56	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_da_Instituicao_Hu.docx	28/06/2019 18:18:38	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br