

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Priscila Laíza Rubim Leão

**REPRODUTIBILIDADE E REPETIBILIDADE DE DOIS MÉTODOS
DE AVALIAÇÃO DO *BUDDING* TUMORAL EM CARCINOMA
DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA**

Belo Horizonte
2016

Priscila Laíza Rubim Leão

**REPRODUTIBILIDADE E REPETIBILIDADE DE DOIS MÉTODOS
DE AVALIAÇÃO DO *BUDDING* TUMORAL EM CARCINOMA
DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Área de Concentração em Clínicas Odontológicas - Área Temática: Estomatologia.

Linha de Pesquisa: Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Martinho Campolina
Rebello Horta

Belo Horizonte

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

L437r Leão, Priscila Laíza Rubim
Reprodutibilidade e repetibilidade de dois métodos de avaliação do *budding* tumoral em carcinoma de células escamosas de boca / Priscila Laíza Rubim Leão. Belo Horizonte, 2016.
49 f. : il.

Orientador: Martinho Campolina Rabello Horta
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Reprodutibilidade dos testes. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Boca - Câncer. 4. Patologia bucal. 5. Estomatologia. I. Horta, Martinho Campolina Rabello. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

SIB PUC MINAS

CDU: 616.31

Priscila Laiza Rubim Leão

**REPRODUTIBILIDADE E REPETIBILIDADE DE DOIS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO
DO *BUDDING* TUMORAL EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE
BOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínicas Odontológicas – Área Temática: Estomatologia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann – UNIFAL
- 2- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 29 de agosto de 2016

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2016

Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta
Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia - Mestrado

**Esse trabalho é dedicado ao meu avô Antônio Nascentes de Azevedo,
ele foi tirado da sua família,
mas sempre será lembrado por todas as coisas boas e momentos felizes
que nos proporcionou.
Tenho certeza que teria muito orgulho.
Sua memória estará sempre viva em nossos corações
e sua dignidade nunca morrerá.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Martinho Campolina Rebello Horta pelos ensinamentos e todo incentivo que recebi ao longo dessa jornada, sempre em busca do máximo aprimoramento intelectual e profissional. O professor Martinho é um exemplo de profissionalismo e dedicação com a docência, que eu sempre irei me espelhar.

Agradeço aos professores da equipe de Estomatologia do departamento de Odontologia da PUC Minas: Carlos Roberto Martins, Helenice de Andrade Marigo Grandinetti, Rosana Maria Leal, Hermínia Marques Capistrano. Em especial ao professor Paulo Eduardo Alencar de Souza. Vocês foram mestres, me guiaram durante todo esse processo. Os ensinamentos adquiridos com vocês, as experiências e a dedicação no atendimento ao paciente e principalmente o empenho com os alunos, sempre serão lembrados por mim, com muito carinho.

Agradeço a todos os colegas da turma de pós-graduação em Odontologia, que tive o prazer de conviver e aprender juntos. Em especial, ao aluno do doutorado, Helvécio Marangon Junior, sem ele eu não conseguiria alcançar nenhuma das metas propostas, espero que saiba o quanto foi importante nesse processo, e como sou grata e feliz por ter compartilhado tantos momentos cruciais dessa jornada, muito obrigada. Agradeço também ao colega do doutorado, Leandro Junqueira de Oliveira, por me proporcionar momentos de aprendizagem únicos, pelo profissionalismo e competência, sempre paciente para me transmitir seu conhecimento, obrigada.

Agradeço às alunas de iniciação científica: Ângela Caixeta e Victoria Melo. Vocês se tornaram minhas amigas, confidentes. Obrigada por realizarem esse trabalho com tanta dedicação e carinho. Vocês foram além, conseguiram superar todas as dificuldades e barreiras em busca da máxima qualidade. Transformamos em uma equipe. Agradeço especialmente as minhas amigas do Laboratório de Patologia Bucal: Maria Reni Gonçalves Moitinha e Andreia Alves Cardoso. Sem o suporte de vocês nada seria possível. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e por todo carinho com que realizam a função de vocês. Obrigada!

Agradeço também às funcionárias da secretaria do Mestrado em Odontologia da PUC Minas: Maria Angélica Paradizi Rodrigues e Sylvania Martins Ferreira. Vocês

se dedicam ao máximo na organização do curso, e vão sempre além, depositando tanto carinho em tudo que fazem. Obrigada por toda ajuda durante essa jornada.

Em especial:

Agradeço aos meus pais, Salvio Cesar Rubim e Vania Elizabeth Rubim, vocês lutaram uma vida inteira para me proporcionar a oportunidade de estudar. Foram vários anos de muita dedicação integral aos filhos, e reconheço o quão difícil essa jornada se tornou. Vocês são minha inspiração! Amo vocês!

Aos meus irmãos: Camila, Leandro e Gabriel, e ao meu sobrinho Miguel. Em todos os momentos, vocês conseguiram me apoiar e nunca me deixaram desistir! São meus amigos, meus cúmplices, meus amores. Obrigada!

Ao grande amor da minha vida, ao meu marido Felipe Leão, que apesar de todos os altos e baixos, sempre permaneceu ao meu lado. As dificuldades vieram para nos fortalecer, trouxe a certeza de que devemos ficar juntos, cada vez mais unidos e apaixonados. Te amo!

Agradeço as minhas tias Regina, Roberta e Soraya. Ao meu tio Roberto e Jorge. Por todo incentivo e alegria em me aconselhar. Agradeço a todos os meus primos, especialmente ao Debraym, Lucas e minha afilhada Rayane. Vocês tornaram essa caminhada mais leve e alegre, com tantos momentos felizes.

Agradeço a minha família do coração: Darcilene Leão, Marcos Leão, Tamirys Leão, Heitor e Felipe Lannes. E também a família do tio Kleber e tia Rita, obrigada pelo carinho e palavras de incentivo. Obrigada por me permitir ser parte dessa família abençoada.

Agradeço aos meus colegas da turma LXX, vocês são parte dessa conquista, em especial aos meus melhores amigos: Rafael Ribeiro, Rafael Augusto, Frederico Rodrigues, Victor Couto, Ana Luiza Zebral Xavier, Angélica Mourão, Georgia Rocha, Thayana Calazans, Luiza Marques. Agradeço também a estagiaria mais amiga e companheira, Thaina Mendes. Vocês são a alegria da minha vida e tornaram essa jornada mais divertida, amo vocês!

Agradeço a todos os amigos e familiares, que não foram citados, mas serão sempre lembrados em meu coração por todo apoio. Obrigada

RESUMO

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é uma neoplasia maligna de origem epitelial que apresenta diferentes graus de diferenciação histológica e alto potencial invasivo e metastático. *Budding* tumoral é um fenômeno morfológico caracterizado pela presença de células epiteliais neoplásicas isoladas ou formando pequenos ninhos (de até quatro células). A presença desse fenômeno caracteriza perda de adesão celular, permitindo um movimento invasivo ativo. Tumores com alta intensidade de *budding* tumoral estão associados a pior prognóstico em CCEB. O objetivo desse trabalho é analisar a reprodutibilidade e a repetibilidade de dois métodos de avaliação do *budding* tumoral em CCEB: coloração pela hematoxilina e eosina (HE) e imunomarcacão para multi-citoqueratina. A avaliação do *budding* tumoral foi realizada em 103 amostras de CCEB, submetidas a esses dois métodos. Três examinadores independentes avaliaram cada uma das 103 lâminas de cada um dos dois métodos analisados. Os examinadores foram assim determinados: patologista com experiência menor que 5 anos; patologista com experiência entre 5 e 10 anos; patologista com experiência maior 10 anos. A contagem dos *buds* (células neoplásicas isoladas ou agrupadas em pequenos ninhos com menos de cinco células) foi realizada em um único campo, em aumento de 200X. As amostras foram assim classificadas: baixa intensidade de *budding* tumoral (nenhum *bud* ou menos de 5 *buds* tumorais em um campo de 200X); alta intensidade de *budding* tumoral (5 ou mais *buds* tumorais em um campo de 200X). Uma Escala Tipo Likert foi utilizada pelos examinadores para mensurar qualitativamente a dificuldade na avaliação. O grau de concordância interexaminador (reprodutibilidade) foi estimado por meio do Kappa de Fleiss e o grau de concordância intraexaminador (repetibilidade) foi estimado por meio do Kappa de Cohen. O teste de Friedman seguido pelo teste post hoc de Dunn foi utilizado para comparar o nível de dificuldade da avaliação entre os três examinadores. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar o nível de dificuldade da avaliação entre os dois métodos. A reprodutibilidade pelo método da imunomarcacão para multi-citoqueratina mostrou-se substancial, sendo maior que a reprodutibilidade pelo método HE, que se mostrou razoável. A repetibilidade pelo método HE variou de moderada a substancial entre os examinadores, independentemente da experiência do examinador. A repetibilidade pelo método da imunomarcacão para multi-citoqueratina não variou entre os examinadores, mostrando-se quase perfeita. A concordância entre os dois métodos variou de regular a moderada entre os examinadores, sendo menor no examinador menos experiente. Todos os examinadores apresentaram maior dificuldade na avaliação pelo método HE. O examinador mais experiente apresentou menor dificuldade na avaliação quando comparado aos dois avaliadores menos experientes, independentemente do método. Diante do exposto, considerando a baixa concordância entre os dois métodos de avaliação do *budding* tumoral analisados, recomenda-se que a avaliação do *budding* tumoral em CCEB seja realizada pelo método da imunomarcacão para multi-citoqueratina, tendo em vista sua menor dificuldade, maior reprodutibilidade e maior replicabilidade quando comparado ao método HE.

Palavras-chave: Fronte de invasão tumoral. Carcinoma de células escamosas de boca. *Budding* tumoral.

ABSTRACT

The oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malignant epithelial tumor which has different degrees of histological differentiation and highly invasive and metastatic potential. Tumor budding is a morphological phenomenon characterized by the presence of neoplastic epithelial cells isolated or forming small clusters (up to four cells). The presence of this phenomenon is characterized by loss of cell adhesion, allowing an active invasive movement. Tumors with high intensity tumor budding are associated with worse prognosis in OSCC. The aim of this study is to analyze the reproducibility and repeatability of two evaluation methods of tumor budding in OSCC: hematoxylin and eosin (HE) and immunostaining for multi-cytokeratin. The assessment of tumor budding was performed on 103 OSCC samples, independently by the two methods. Three independent examiners evaluated each of the 103 slides of each method. The examiners were categorized as: pathologist with less than 5 years of experience; pathologist with experience between 5 and 10 years; pathologist with most of 10 years of experience. The count of buds (isolated tumor cells or grouped in small nests with less than five cells) was performed on a single field, a x200 power field. Samples were categorized as follows: low intensity tumor budding (no bud or less than 5 tumor buds in one x200 field); high intensity tumor budding (5 or more tumor buds in one x200 field). A Likert scale was used by the examiners to qualitatively measure the difficulty in assessing tumor budding. The degree of inter-examiner agreement (reproducibility) was estimated by Fleiss Kappa and the degree of intra-examiner agreement (repeatability) was estimated by Cohen's kappa. The Friedman test followed by the Dunn post hoc test was used to compare the level of the difficulty of the three examiners. The Wilcoxon test was used to compare the level of the difficulty between the two methods. The reproducibility by immunostaining method for multi-cytokeratin was substantial, being greater than the reproducibility of the HE method, which was fair. Repeatability by HE method ranged from moderate to substantial among examiners, regardless of the examiner's experience. Repeatability by immunostaining method for multi-cytokeratin did not vary among examiners, being almost perfect. The agreement between the two methods ranged from fair to moderate among examiners, being lower in the less experienced examiner. All examiners had greater difficulty in assessing tumor budding by the HE method. The most experienced examiner had less difficulty in assessing tumor budding when compared to the two less experienced evaluators, regardless of method. In conclusion, considering the low correlation between the two methods, it is recommended that the evaluation of tumor budding in OSCC must be performed by immunostaining method for multi-cytokeratin, given its less difficulty, greater reproducibility and greater repeatability when compared to the HE method.

Keywords: Invasive tumor front; oral squamous cell carcinoma; tumor budding

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Carcinoma de células escamosas de boca (CCEB)	17
1.2 Avaliação do <i>budding</i> tumoral e seu papel no prognóstico do CCEB	19
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 ARTIGO	25
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de células escamosas de boca (CCEB)

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia maligna de origem epitelial que apresenta diferentes graus de diferenciação histológica e alto potencial invasivo e metastático (SLOOTWEG; EVESON, 2005). Representa mais de 90% das neoplasias malignas de cabeça e pescoço (SLOOTWEG; EVESON, 2005; NEVILLE et al., 2015). O carcinoma de células escamosas é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral (SLOOTWEG; EVESON, 2005; NEVILLE et al., 2015). O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) acomete principalmente pacientes na sexta década de vida. Entretanto, nos últimos anos, a incidência dessa lesão em jovens adultos tem aumentado consideravelmente (MASJCHRZAK et al., 2014).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que no Brasil, em 2016, são esperados 11.140 casos novos de neoplasias malignas da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres, o que corresponde a um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016).

Embora a etiologia do CCEB permaneça ainda não totalmente esclarecida, dados epidemiológicos colaboram a atuação determinante de fatores de risco que, separadamente ou combinados, podem contribuir no desenvolvimento dessa neoplasia. Os principais fatores de risco, já bem estabelecidos, são o tabaco e o álcool (BARASCH; SAFFORD, 1993; DÖBROSSY, 2005; SLOOTWEG; EVESON, 2005). Esses dois fatores, quando combinados, podem aumentar em até 15 vezes a probabilidade de desenvolvimento de CCEB (BRAY et al., 2002). Fatores culturais, estilo de vida, dieta e o vírus HPV (subtipos 16 e 18) são frequentemente associados ao desenvolvimento dessa lesão (DÖBROSSY, 2005).

Essa neoplasia origina-se de eventos genéticos que alteram principalmente ciclo celular, angiogênese, sobrevivência das células e mobilidade celular. Essas alterações proporcionam um ambiente favorável à proliferação celular autônoma e à invasão da membrana basal, lâmina própria e tecidos adjacentes pelos queratinócitos neoplásicos (SCULLY et al., 2011; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2013).

O CCEB pode se apresentar clinicamente como lesões endofíticas, exofíticas, leucoplásicas, eritroplásicas e/ou eritroleucoplásicas. Acomete principalmente a língua, assoalho bucal, gengiva, palato duro e mucosa jugal (FUNK et al., 2002; NEVILLE et al., 2015).

A principal característica histológica dessa neoplasia é a invasão da lâmina própria e tecidos adjacentes por ninhos, cordões ou lençóis de células epiteliais de revestimento malignas, por vezes exibindo pleomorfismo celular e nuclear, hipercromatismo nuclear e mitoses típicas e atípicas (SLOOTWEG; EVESON, 2005; NEVILLE et al., 2009; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2013).

O prognóstico do CCEB está diretamente relacionado ao estadiamento clínico da doença pelo sistema TNM, no qual são avaliados tamanho do tumor, metástases para linfonodos e metástases à distância (TNM). Esse sistema é amplamente utilizado no planejamento do tratamento e no prognóstico de pacientes com lesões malignas, embora apresente limitações. De maneira geral, a taxa de sobrevida em cinco anos varia entre 40% a 50%, piorando com o avanço do estágio clínico. Nesse contexto, a graduação histológica, que avalia o grau de diferenciação das células neoplásicas, pode ser uma ferramenta importante para auxiliar a determinação do prognóstico do paciente. Tumores bem diferenciados geralmente estão relacionados a melhor prognóstico (SHAN; GIL, 2009; PULTE; BRENNER, 2010; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2013).

Os métodos de graduação histológica mais utilizados em CCEB são: OMS, que classifica os tumores em bem, moderadamente e mal diferenciados (SLOOTWEG; EVESON, 2005; ANNEROTH; BATZAKIS; LUNA, 1987), no qual são avaliados grau de queratinização, polimorfismo nuclear, número de mitoses, padrão de invasão, estágio de invasão e infiltrado inflamatório; Bryne et al. (1992), no qual a graduação ocorre apenas nas áreas mais anaplásicas das regiões mais invasivas do tumor, avaliando os parâmetros grau de queratinização, polimorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório.

O tratamento do CCEB é multidisciplinar e baseia-se principalmente na localização e no estadiamento clínico. O tratamento de escolha é a remoção cirúrgica da lesão e, caso necessário, esvaziamento cervical. Radioterapia e quimioterapia podem ser realizadas de forma adjuvante à cirurgia. Essas condutas, em conjunto, melhoram o prognóstico e reduzem a recorrência (SHAN; GIL, 2009; REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2013).

1.2 Avaliação do *budding* tumoral e seu papel no prognóstico do CCEB

O processo de invasão local das neoplasias malignas é complexo e requer interação entre o tumor e o hospedeiro para criar um ambiente permissivo e possibilitar a invasão da matriz extracelular pelas células neoplásicas. Com a progressão do tumor, pode ocorrer disseminação sanguínea ou linfática e formação de metástases (WEI-REN et al., 2012).

Budding tumoral é um fenômeno morfológico observado no fronte de invasão tumoral, caracterizado pela presença de células epiteliais neoplásicas isoladas ou formando pequenos ninhos (de até quatro células). A presença desse fenômeno caracteriza perda de adesão celular, permitindo um movimento invasivo ativo (UENO et al., 2002; WANG et al., 2011; LUO et al., 2012; ALMANGUSH et al., 2014a).

Ueno et al. (2002) utilizaram a avaliação de *budding* tumoral para estimar o potencial de agressividade do câncer de reto. Foram examinados 638 espécimes de carcinoma de células escamosas. Para cada amostra, o avaliador selecionou a região com maior intensidade de *budding* e examinou a presença de células epiteliais neoplásicas isoladas ou agrupadas em pequenos ninhos de até cinco células, utilizando uma objetiva de 25X. Após dois meses, 100 amostras foram selecionadas aleatoriamente e foi realizada uma nova avaliação. Os autores observaram uma forte correlação entre a presença de *budding* tumoral e características histológicas que representam agressividade, como diferenciação, invasão local e infiltrado inflamatório. Ao mesmo tempo, pacientes classificados com alta intensidade de *budding* tumoral apresentaram pior prognóstico com menor tempo de sobrevida. Os autores concluíram que a avaliação do *budding* tumoral é um sistema de graduação histológica adequado para avaliação da agressividade e sobrevida, ressaltando que esse sistema é de simples execução e alta reprodutibilidade.

Koike et al. (2008) realizaram uma análise multivariada das características clínico-patológicas do carcinoma de células escamosas de esôfago (CCEE), avaliando o *budding* tumoral como um fator de prognóstico. Foram selecionadas 136 amostras de pacientes diagnosticados com CCEE. As amostras foram coradas pela hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas microscopicamente com uma objetiva de 20X. O avaliador selecionou a região mais profunda de invasão e realizou a contagem das células epiteliais neoplásicas isoladas ou agrupadas em pequenos

grupos de até cinco células, classificando as amostras em dois grupos: *budding* tumoral frequente (5 ou mais grupos de até cinco células) e *budding* tumoral raro (menos de 5 grupos de até cinco células). 60,3% dos pacientes apresentaram *budding* tumoral frequente e 39,7% foram classificados como apresentando *budding* tumoral raro. Os autores verificaram uma relação entre *budding* tumoral frequente e menor tempo de sobrevida. Concluíram que a avaliação desse fenômeno pode ajudar a determinar o potencial de malignidade do CCEE e de outros tipos de tumores malignos.

Wang et al. (2009) verificaram a reprodutibilidade da avaliação do *budding* tumoral como marcador de prognóstico. Foram selecionadas 128 casos de pacientes diagnosticados com carcinoma colorretal (T3N0M0). As amostras foram coradas em hematoxilina e eosina e avaliadas por dois patologistas. Foi considerado *budding* tumoral a presença de células neoplásicas isoladas ou arrançadas em ninhos de até quatro células, observadas microscopicamente em um aumento de 40X. As amostras foram classificadas como apresentando alta intensidade ou baixa intensidade de *budding*. Os autores verificaram que os casos com alta intensidade de *budding* tumoral (45%), estavam relacionados com um padrão de invasão mais agressivo. Foi realizado o teste de concordância de kappa, que demonstrou ótima concordância entre os avaliadores. Os autores concluíram que o método de avaliação de *budding* tumoral utilizando a técnica de coloração em HE é de fácil execução e ótima reprodutibilidade, além de estar indicado como marcador de prognóstico para esse tipo de lesão.

Yamaguchi et al. (2010) avaliaram o *budding* tumoral em 665 casos de adenocarcinoma de pulmão, em pacientes tratados com ressecção cirúrgica. Os autores constataram que o *budding* reflete a atividade biológica do tumor e pode ser um indicador de prognóstico útil. Diferentes estudos corroboram que a avaliação do *budding* tumoral é um bom indicador prognóstico para diversos tipos de tumores: carcinoma de células escamosas colo retal (KANAZAWA et al., 2007; PRALL, 2007; ZLOBEC; LUGLI, 2010), carcinoma de células escamosas de laringe (SARIOGLU et al., 2010), carcinoma de células escamosas anal (NILSSON et al., 2005) e carcinoma nasofaríngeo (LUO et al., 2012).

Alguns estudos utilizam a técnica imunoistoquímica para auxiliar a avaliação do *budding* tumoral, por meio da imunomarcagem da citoqueratina. As citoqueratinas são filamentos intermediários que compõem o citoesqueleto das células epiteliais,

representando uma importante proteína que pode ser imunomarcada com objetivo de identificar as células epiteliais neoplásicas na avaliação do *budding* em CCEB (WANG et al., 2011).

Kazama et al. (2006) selecionaram 56 casos de carcinoma colorretal. As amostras foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina e imunomarcadas para citoqueratina (anticorpos CAM 5.2 e AE1/AE3), para detecção das células neoplásicas epiteliais. Os autores concluíram que amostras *budding* tumoral positivas estavam associadas a metástases regionais, podendo essa avaliação ser consideradas útil para avaliação do risco de metástase nesse tipo de câncer.

Wang et al. (2011) avaliaram *budding* tumoral 230 casos de carcinoma de células escamosas de língua. Foi realizada a técnica imunoistoquímica para detecção de pan-citoqueratina. Todas as amostras foram avaliadas por dois observadores independentes, que não conheciam o histórico dos casos. Os autores definiram como *budding* tumoral a presença de células neoplásicas isoladas ou arrançadas em pequenos grupos de até quatro células. Inicialmente o avaliador verificou, em um aumento de 100X, a região da amostra com maior intensidade de *budding*. A seguir, em um aumento de 200X, foi realizada a contagem de células neoplásicas isoladas ou arrançadas em pequenos grupos de até quatro células, denominados como *buds*. Os autores classificaram as amostras em: alta intensidade de *budding* tumoral (amostras com 5 ou mais *buds* em um único campo, em aumento de 200X); baixa intensidade de *budding* tumoral (amostras com menos de 5 *buds* em um único campo, em aumento de 200X). Alta intensidade de *budding* tumoral foi observada em 48,36%, apresentando forte correlação com tamanho do tumor, diferenciação celular e metástase para linfonodos. Os autores concluíram que o *budding* tumoral pode representar um fator de prognóstico importante para essa neoplasia.

Almangush et al. (2014a) avaliaram a profundidade de invasão relacionada ao *budding* tumoral e pior padrão de invasão, como indicadores de prognóstico. Os autores selecionaram 233 casos de carcinoma de células escamosas de língua que foram tratados em cinco hospitais universitários da Finlândia, em um intervalo de 30 anos. A amostra foi classificada por três avaliadores, treinados, que desconheciam os casos dos pacientes estudados. Foi considerado como *budding* tumoral a presença de células individuais ou em ninhos com menos de cinco células, próximas ao fronte de invasão tumoral. As amostras foram primeiramente avaliadas em

aumento de 40X e posteriormente a avaliação foi realizada em um aumento de 200X. Os autores classificaram as amostras em: baixo risco (menos de 5 *buds* em um único campo, em aumento de 200X); alto risco (mais de 5 *buds* em um único campo, em aumento de 200X). Verificaram uma forte associação entre tumores classificados como alto risco e pior prognóstico (mortalidade aumentada). Os autores relataram ainda que a avaliação do *budding* tumoral pode complementar o sistema TNM na determinação do prognóstico.

Em uma revisão sistemática da literatura, Almangush et al. (2014b) analisaram os estudos sobre *budding* tumoral em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Foram incluídas as publicações que avaliaram o *budding* tumoral em carcinoma de células escamosas da cavidade oral, laringe e nasofaringe. A partir de um total de 122 artigos, apenas 5 estudos foram considerados, por cumprirem os critérios estabelecidos pelos autores. Os autores concluíram que, apesar dos resultados serem limitados, pois as amostras são heterogêneas, há uma forte associação entre o *budding* tumoral e prognóstico e progressão das neoplasias malignas. Os autores afirmam ainda que, para melhor avaliação futura do *budding* tumoral, é importante introduzir essa classificação na rotina dos laboratórios de patologia, padronizando os métodos por meio da verificação da reprodutibilidade, permitindo uma comparação de resultados em diferentes centros de pesquisa.

Xie et al. (2015) demonstraram que alta intensidade de *budding* tumoral é um fator independente de prognóstico para carcinoma de células escamosas de língua em estágio inicial, estando associada a menor sobrevida. Sugeriram que a avaliação de *budding* tumoral deve ser utilizada como rotina e ser incorporada como critério de decisão para a realização de esvaziamento cervical. Proposta semelhante foi realizada por Seki et al. (2016), que avaliaram 91 amostras de biópsia incisional de CCEB e observaram que tumores com alta intensidade de *budding* tumoral estavam associados a maior frequência de metástase regional e menor sobrevida.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho é analisar a reprodutibilidade e a repetibilidade de dois métodos de avaliação do *budding* tumoral em CCEB.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho é analisar a reprodutibilidade e a repetibilidade de dois métodos de avaliação do *budding* tumoral em CCEB.

2.2 Objetivos específicos

- a) analisar a reprodutibilidade e a repetibilidade da avaliação do *budding* tumoral em CCEB por meio do método da coloração pela hematoxilina e eosina;
- b) analisar a reprodutibilidade e a repetibilidade da avaliação do *budding* tumoral em CCEB por meio do método da imunomarcacão para multi-citoqueratina;
- c) comparar a reprodutibilidade desses dois métodos de avaliação do *budding* tumoral;
- d) comparar a repetibilidade desses dois métodos de avaliação do *budding* tumoral;
- e) analisar a concordância entre esses dois métodos de avaliação do *budding* tumoral;
- f) analisar e comparar a dificuldade da avaliação do *budding* tumoral entre esses dois métodos.

3 ARTIGO

O artigo intitulado “Reprodutibilidade e repetibilidade de métodos de avaliação do *budding* tumoral em carcinoma de células escamosas de boca” foi submetido ao periódico Journal of Oral Pathology and Medicine” (Qualis A2), tendo sido formatado de acordo com suas normas.

REPRODUCIBILITY, REPEATABILITY AND LEVEL OF DIFFICULTY OF TWO METHODS FOR TUMOR BUDDING EVALUATION IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Running Title: Methods for tumor budding evaluation

Key words: Oral cancer, Oral squamous cell carcinoma, Tumor budding

Priscila Laiza Rubim Leão¹

Helvécio Marangon Junior¹

Victória Vasconcellos Moreira Melo¹

Ângela Braga Caixeta¹

Paulo Eduardo Alencar Souza¹

Maria Cássia Ferreira de Aguiar²

Martinho Campolina Rebello Horta¹

¹ Oral Pathology Section, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais (PUC Minas), Belo Horizonte, MG, Brazil

² Department of Oral Diagnosis and Pathology, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

Corresponding author:

Martinho Campolina Rebello Horta

Departamento de Odontologia

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Avenida Dom José Gaspar 500, Prédio 46, Sala 101

Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil

CEP: 30535-901

Phone number: +55 31 3319-4414

E-mail: martinhhorta@pucminas.br

ABSTRACT

BACKGROUND: This study aimed to analyze the reproducibility, repeatability and level of difficulty of two methods for tumor budding evaluation in oral squamous cell carcinoma (OSCC): staining by hematoxylin and eosin (HE), and immunostaining for multi-cytokeratin.

METHODS: The evaluation of tumor budding was performed by three examiners in 103 samples of OSCC, using the two methods. A Likert-type scale was used to measure the difficulty in the assessment. The inter-examiner agreement (reproducibility) was estimated using Fleiss's Kappa and the intra-examiner agreement (repeatability) was estimated using Cohen's Kappa. The Friedman test was used to compare the three examiners' perceived levels of difficulty of assessment. The Wilcoxon test was used to compare the level of difficulty of the evaluation between the two methods.

RESULTS: Reproducibility by the immunostaining method for multi-cytokeratin was substantial, being higher than the only fair agreement by the HE. Repeatability by the HE ranged from moderate to substantial among examiners, regardless of the examiner's experience. Repeatability by the immunostaining method for multi-cytokeratin did not vary among examiners, showing almost perfect agreement. The agreement between the two methods ranged from fair to moderate among examiners, being lower in the less experienced examiner. All the examiners presented greater difficulty in the evaluation by the HE.

CONCLUSION: In view of the unsatisfactory agreement between the two methods of tumor budding evaluation in OSCC, it is recommended that this evaluation should be performed by the immunostaining method for multi-cytokeratin, considering its higher reproducibility, greater replicability and lower difficulty compared to the HE.

Introduction

Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common malignant neoplasm of the oral cavity (1,2,3). This malignant tumor of epithelial origin presents different degrees of histological differentiation and high invasive and metastatic potential (1,4).

The main histological feature of oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the invasion of the lamina propria and adjacent tissues by nests, cords, or sheets of malignant epithelial cells, sometimes exhibiting nuclear and cellular pleomorphism, nuclear hyperchromatism, and typical and atypical mitoses (1,4).

Tumor budding is a morphological phenomenon observed on the tumor invasive front, characterized by the presence of isolated neoplastic epithelial cells or the formation of small nests (up to four cells). This phenomenon represents two important aggressiveness features of epithelial malignant tumors: loss of cell adhesion and local invasion (5,6,7,8).

Several studies have already demonstrated that tumors presenting high-intensity tumor budding are associated with a worse prognosis in patients with OSCC (5,6,8,9,10,11). However, the methods for tumor budding evaluation vary between studies. It is important to introduce a standardization of this classification, thus allowing a comparison of the results of different authors. Therefore, the objective of this study was to analyze the reproducibility, repeatability and level of difficulty of two methods for tumor budding evaluation in oral squamous cell carcinoma (OSCC): staining by hematoxylin and eosin (HE), and immunostaining for multi-cytokeratin.

Material and methods

Samples

This study was approved by the local ethics committee (CAAE: 01689712.1.0000.5137). A total of 103 OSCC samples were obtained by incisional biopsy for diagnostic purposes, fixed in 10% formaldehyde, and processed for storage in paraffin blocks. Of the 103 samples selected, 80.5% were from male patients and 19.5% were from females. The mean age of the patients was 57 years and the most common anatomic location was the tongue.

Hematoxylin and Eosin (HE) staining

All samples were stained by the hematoxylin and eosin (HE) method following the standard protocol. Sections of 3 μm thickness were obtained from the paraffin blocks. Subsequently, the sections were dewaxed in xylol, hydrated in solutions with decreasing concentrations of ethanol, stained, dehydrated in solutions with increasing concentrations of ethanol, diaphanized in xylol, and mounted in Etellan (Merck, Darmstadt, Germany).

Immunostaining for multi-cytokeratin

Immunohistochemistry technique was employed to detect multi-cytokeratin (clones AE1/AE3), used to identify OSCC cells in tumor budding evaluation. Sections of 3 μm thickness were obtained from the paraffin blocks. The steps of deparaffinization, rehydration, and antigen retrieval were performed using the Trilogy solution (Cell Marque, Rocklin, USA) according to the manufacturer's instructions (2 washes of 30 minutes at 98°C). Endogenous peroxidase and endogenous protein blockade were performed using the Hydrogen Peroxide Block (Spring, Bioscience, California, USA) and Protein Block (Spring, Bioscience, California, USA) solutions according to the manufacturer's guidelines. Subsequently, the sections were washed in TRIS buffer for five minutes. The sections were then incubated in a humid chamber for 60 minutes with the anti-multi-cytokeratin antibody (cocktail of AE1 and AE3 clones, diluted 1:50; Leica Biosystems, Newcastle, UK). Subsequently, three washes in TRIS buffer of five minutes each were performed. Reveal biotin free amplification system was then used according to the manufacturer's instructions (Spring, Bioscience, California, USA). The revelation was carried out using the diaminobenzidine revelation kit (Spring, Bioscience, California, USA). The counter staining was performed with Mayer's hematoxylin for one minute. Subsequently, the sections were dehydrated in solutions with increasing concentrations of ethanol, from one wash in 70% ethanol for two minutes, one in 90% ethanol for five minutes, and three in absolute ethanol for five minutes each. The sections were then diaphanized by three xylol washes at room temperature lasting five minutes each. Finally, the slides were mounted using Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA). A normal oral mucosa sample was used as positive control for multi-cytokeratin (AE1/AE3). Negative control was determined by omission of the primary antibody as well as by

the use of monoclonal antibodies with the same isotype and different specificity of the primary antibody employed in the study.

Tumor budding evaluation

The evaluation of tumor budding was performed in 103 samples and submitted to two independent methods: the hematoxylin and eosin staining (HE) method, and the multi-cytokeratin immunostaining method. Three independent examiners evaluated the 103 slides of each of the two methods. The examiners were thus determined, following the criteria proposed by Kai et al. (12): examiner A (junior, pathologist with experience of less than 5 years); Examiner B (senior, pathologist with experience between 5 and 10 years); Examiner C (expert, pathologist with more than 10 years of experience). Each examiner evaluated the samples in two times: T1 (first evaluation of 103 samples); T2 (reevaluation of 40 samples, 30 days after T1). Matching samples submitted to the two different methods were not assessed in the same evaluation session. The examiners were unaware of the clinical data concerning the samples.

The evaluation of tumor budding followed the criteria proposed by Wang et al. (6). Tumor budding was defined as the presence of isolated single tumor cells or small clusters of less than 5 tumor cells at the invasive front. The same light microscopy with x10 ocular lens (field number: 22) was used by the three examiners to evaluate tumor budding. Samples were initially evaluated using the lowest power objective lens to select the areas with the highest density of tumor budding. Afterward, using x20 objective lens, the number of tumor buds (number of isolated single tumor cells or small clusters of less than 5 tumor cells) was measured in one single selected x200 power field (the selected field was the one showing the highest number of tumor buds). The samples were then classified according to the intensity of tumor budding following the next criteria, as shown in Fig.1: high-intensity tumor budding (5 or more tumor buds in one x200 power field); low-intensity or no tumor budding (less than 5 tumor buds or no tumor bud detectable in one x200 power field).

Analysis of the level of difficulty in the tumor budding evaluation

A Likert-type scale was used by the examiners to qualitatively measure the difficulty in assessing tumor budding in each of the 103 samples independently for each of the two methods of evaluation. The following scores were assigned using the

Likert-type scale for difficulty level: 1 - very difficult; 2 - difficult; 3 - neutral; 4 - easy; 5 - very easy.

Statistical analysis

The degree of inter-examiner agreement (reproducibility) was estimated using the Fleiss' Kappa, which measures concordance between multiple evaluations. This analysis was performed using the 103 samples, considering the results of the three examiners independently for each of the two methods of tumor budding evaluation.

The degree of intra-examiner agreement (repeatability) was estimated using Cohen's Kappa, which measures the concordance between two evaluations. This analysis was performed using 40 samples, considering the results of the tumor budding evaluation in T1 and T2, independently for each of the three examiners and for each of the two methods of evaluation.

The degree of agreement between the two methods of evaluation was estimated using Cohen's Kappa, which measures the agreement between two evaluations. This analysis was performed using the 103 samples, considering the results of the tumor budding evaluation of each of the two methods, independently for each of the three examiners.

The concordance analyses were performed by the StatsToDo statistical tool through the StatsToDo website (StatsToDo Trading Pty Ltd, Brisbane, Queensland, Australia). The results obtained were compared to the relative strength of agreement associated with kappa statistics proposed by Landis and Koch (13): Kappa < 0.00: poor agreement; Kappa from 0.00 to 0.20: slight agreement; Kappa from 0.21 to 0.40: fair agreement; Kappa from 0.41 to 0.60: moderate agreement; Kappa from 0.61 to 0.80: substantial agreement; and Kappa from 0.81 to 1.00: almost perfect agreement.

The Friedman test followed by the Dunn post hoc test was used to compare the level of difficulty of the tumor budding evaluation among the three examiners. This analysis was performed using 103 samples for each of the two methods of evaluation of tumor budding.

The Wilcoxon test was used to compare the level of difficulty of the tumor budding evaluation between the two methods of evaluation. This analysis was performed using 103 samples for each of the three examiners independently.

The level of significance was set at 5% for comparisons of the level of difficulty of the tumor budding evaluation. These analyses were performed by GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

The Fig. 2 illustrates the design of the study and the analyzes performed.

Results

The results of the inter-examiner (reproducibility) and intra-examiner (repeatability) concordance analyses are shown in Table 1. The Kappa value of the inter-examiner agreement was 0.67 (substantial agreement) for the evaluation of tumor budding by the immunostaining method for multi-cytokeratin. Nevertheless, the Kappa value of the inter-examiner agreement was only 0.27 (fair agreement) for the evaluation of tumor budding by the hematoxylin and eosin staining method. The intra-examiner agreement for the tumor budding evaluation by the immunostaining method for multi-cytokeratin was almost perfect for all the examiners: 0.94 for examiner A (Junior); 0.94 for examiner B (Senior); and 0.95 for examiner C (Expert). The intra-examiner agreement for the tumor budding evaluation by the hematoxylin and eosin staining method was 0.76 for examiner A; 0.53 for examiner B; and 0.76 for examiner C (substantial agreement for examiners A and C and moderate agreement for examiner B).

The results of the concordance analyses between the two methods are described in Table 2. Kappa values were 0.26 for examiner A (fair agreement), 0.46 for examiner B (moderate agreement), and 0.59 for examiner C (moderate agreement).

Table 3 shows the results of the comparison of the data obtained by measuring the level of difficulty of the tumor budding evaluation. For the three examiners, the evaluation of tumor budding by the immunostaining method for multi-cytokeratin was considered easier than the hematoxylin and eosin staining method ($p < 0.05$). When the level of difficulty was compared between the three examiners, the same result was observed for the two methods, considering that the difficulty level was higher for examiner A compared to C ($p < 0.05$); higher for B compared to C ($p < 0.05$); and with no differences between A and B ($p > 0.05$).

Discussion

The first method that numerically expressed the histological degree of malignancy of a neoplasm was proposed in 1920 by Broders (14), in a classic study using 537 squamous cell carcinomas of the lip. Since then, several authors have contributed to improve this histological graduation in OSCC, among which the following are worth mentioning: in 1966, Arthur and Fenner (15) proposed the individual evaluation of some morphological parameters such as the degree of keratinization and the number of mitoses; in 1973, Jakobsson et al. (16) suggested, in addition to the evaluation of the tumor cell population, the analysis of the tumor-host relationship with parameters as the mode of invasion; in 1983, Yamamoto et al. (17) proposed a graduation system based only in the mode of invasion; in 1987, Anneroth, Batsakis and Luna (18) suggested the creation of a new system, considered an evolution of the method proposed by Jakobsson et al. (16); afterward, in 1989, Bryne et al. (19) improved the system proposed by Anneroth, Batsakis and Luna (17), suggesting that only the more invasive regions of the tumor should be evaluated, an area called the invasive front. In this historical context of gradual valorization of morphological features which should express the tumor invasion ability, Wang et al. (6) first proposed, in 2011, the tumor budding evaluation in OSCC. From then on, this new graduation system emerged as an advance in simplicity and prognosis prediction accuracy.

The process of local invasion of malignant neoplasms is complex and requires interaction between the tumor and the host to create a permissive environment to allow invasion of the extracellular matrix by neoplastic cells. With tumor progression, blood or lymphatic dissemination and the formation of metastases can occur (7). Therefore, the early stages of local invasion are important for the progression of malignant tumors. In this background, the object of this study is the tumor budding, a morphological marker of local invasion in malignant epithelial tumors, characterized by the presence of isolated neoplastic epithelial cells or by the formation small nests (of up to four cells) (5,6,7,8).

Several studies have already demonstrated that tumors presenting high-intensity tumor budding are associated with a worse prognosis in patients with OSCC (5,6,8,9,10,11). Our research group has also shown that OSCC samples with high-intensity tumor budding show higher density of stromal myofibroblasts, suggesting

the association between an invasive phenotype of neoplastic cells and a permissive environment for tumor invasion (20). The evaluation of this phenomenon can help to determine the malignancy potential of OSCC and other types of epithelial malignant tumors, since such graduation system is of simple execution and high reproducibility (19). Some authors even suggest that the evaluation of tumor budding should be routinely used and incorporated as a decision criterion for performing elective neck dissection in patients with OSCC (10,11). Therefore, the importance of evaluating tumor budding as a prognostic factor for OSCC is already well established in the literature. However, the methods for tumor budding evaluation vary between studies. In this context, it is important to standardize these methods in routine pathology laboratories, allowing a comparison of results from different research centers (21).

The concept proposed by Wang et al. (6), who defined tumor budding as the presence of neoplastic cells isolated or arranged in small groups of up to four cells, is already well established for OSCC in the literature. A classification of intensity, also proposed by these authors, is also well established: high-intensity tumor budding - 5 or more tumor buds in one x200 power field; low-intensity or no tumor budding - less than 5 tumor buds or no tumor bud detectable in one x200 power field. However, two methods have been described in the literature for evaluation of tumor budding: staining by hematoxylin and eosin (HE), and immunostaining for multi-cytokeratin. To the best of our knowledge, no comparison of reproducibility, repeatability and level of difficulty between these two methods for the evaluation of tumor budding in OSCC have been published in the English language literature.

The results of the present study show an important difference in reproducibility (inter-examiner agreement) between the two methods of evaluation of tumor budding. The immunostaining method for multi-cytokeratin exhibited a Kappa value of 0.67 (substantial agreement), while staining by hematoxylin and eosin showed a Kappa value of only 0.27 (fair agreement) (Table 1). In addition, the repeatability (inter-examiner agreement) was nearly perfect for all examiners with the multi-cytokeratin immunostaining method, and only substantial or moderate with the hematoxylin and eosin staining method (Table 1). Moreover, repeatability among examiners is related to each examiner's amount of experience, since the senior pathologist exhibited the best results for both methods (Table 1). These results are probably related to the difficulty of observing isolated neoplastic cells or small nests on HE stained slides, since the cellular limits can easily be confused with the

adjacent stroma, especially in the presence of inflammation. This problem was not observed in the multi-cytokeratin immunostaining method, which easily shows the limits of neoplastic epithelial cells (Fig. 1). This hypothesis is reinforced by the low concordance observed between the two methods, mainly determined by the large number of samples classified as “high-intensity tumor budding” by the immunostaining method and as “low-intensity or no tumor budding” by the HE method (Table 2). It is also worth noting that the concordance between the two methods increased with the rise of the examiner’s amount of experience. Similar results were observed by Kai et al. (12), who demonstrated greater reproducibility in the evaluation of tumor budding in colorectal carcinoma by the immunostaining method for cytokeratin compared to HE. However, Wang et al. (22) observed almost perfect agreement between two examiners ($k = 0.85$) in the evaluation of tumor budding in colorectal carcinoma by the HE method.

To the best of our knowledge, there are no studies in the English language literature that use the Likert-type Scale to assess the degree of difficulty of methods for tumor budding evaluation. Likert scales are widely used to assess attitudes toward a given fact, and are generally composed of 5 categories (23). In this study, the three examiners considered the evaluation of tumor budding by the immunostaining method for multi-cytokeratin easier when compared to the HE staining method (Table 3). The authors believe that this result stems from the ease in identifying the neoplastic cells in samples which the immunostaining for multi-cytokeratin is employed, as previously discussed. When the level of difficulty was compared between the three examiners, the most experienced examiner always found the tumor budding evaluation to be easier, regardless of the method assessed (Table 3). This result is understandable in view of the fact that histological graduation is a method in which ease of execution is related to training and experience.

In conclusion, in view of the unsatisfactory agreement between the two methods of tumor budding evaluation in OSCC, it is recommended that this evaluation should be performed by the immunostaining method for multi-cytokeratin, considering its higher reproducibility, greater replicability and lower difficulty compared to the hematoxylin and eosin staining method.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG CDS-APQ-01806/14 and FAPEMIG CDS-PPM-00653-16). The authors are also grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Dr. MCF Aguiar is research fellow of CNPq; Dr. H Marangon-Junior has a CAPES fellowship; VVM Melo and AB Caixeta have a PROBIC/FAPEMIG fellowship (PROBIC 10499/2016).

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Slootweg PJ, Eveson JW. Tumours of the oral cavity and oropharynx. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. World health organization classification of tumours. Pathology and genetics. Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press, 2005: 164-75.
2. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; **45**: 309-16.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; **127**: 2893-917.
4. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett* 2014; **8**: 7-11.
5. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002; **40**: 127-32.
6. Wang C, Huang H, Huang Z, et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011; **40**: 545-51.

7. Luo WR, Gao F, Li SY, Yao KT. Tumour budding and the expression of cancer stemcell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology* 2012; **61**: 1072-81.
8. Almangush A, Bello IO, Keski-Säntti H, et al. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck* 2014; **36**: 811-8.
9. Koike M, Kodera Y, Itoh Y, et al. Multivariate analysis of the pathologic features of esophageal squamous cell cancer: tumor budding is a significant independent prognostic factor. *Ann Surg Oncol* 2008; **15**: 1977-82.
10. 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. *J Oral Pathol Med* 2015; **44**: 266-72.
11. 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**: E1582-90.
12. Kai K, Aishima S, Aoki S, et al. Cytokeratin, immunohistochemistry improves interobserver variability between unskilled pathologists in the evaluation of tumor budding in T1 colorectal cancer. *Pathol Int* 2016; **66**: 75-82.
13. Landis JR, Koch GG. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 1977; **33**: 363-74.
14. Broders AC. Squamous cell carcinoma of the lip. A study of five hundred and thirty-seven cases. *J Am Med Assoc* 1920; **74**: 656-64.
15. Arthur JF, Fenner ML. The influence of histological grading on prognosis in carcinoma of the tongue (a computer analysis of 299 cases). *Clin Radiol* 1966; **17**: 384-96.
16. Jakobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Mårtensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1973; **12**: 1-8.
17. Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H, Iwai M, Hiratsuka H. Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1983; **51**: 2175-80.

18. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987; **95**: 229-49.
19. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; **18**: 432-7.
20. Marangon Junior H, Rocha VN, Leite CF, de Aguiar MC, Souza PE, Horta MC. Laminin-5 gamma 2 chain expression is associated with intensity of tumor budding and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2014; **43**: 199-204.
21. Almangush A, Salo T, Hagström J, Leivo I. Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma - a systematic review. *Histopathology* 2014; **65**: 587-94.
22. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009; **33**: 134-141.
23. Jamieson S. Likert scales: how to (ab)use them. *Med Educ* 2004; **38**: 1217-8.

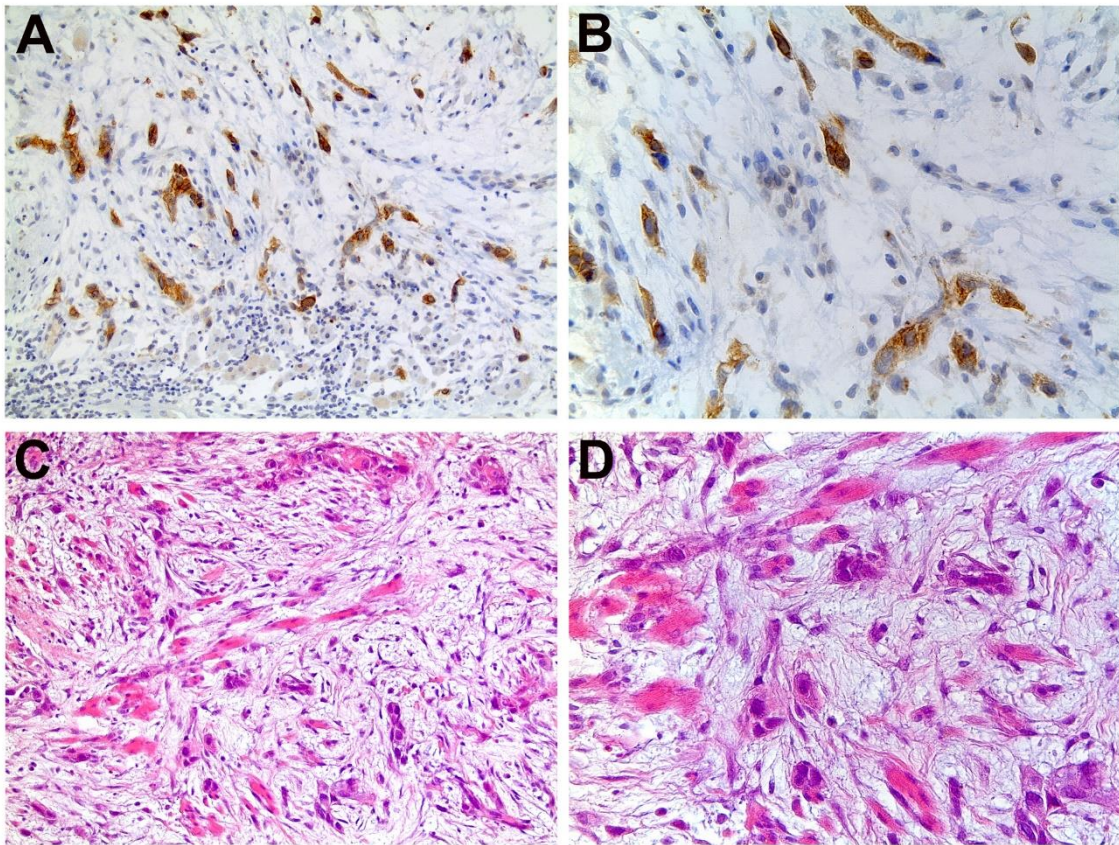


Figure 1 - Samples with high-intensity tumor budding (5 or more tumor buds in one x200 power field). **A:** immunostaining for multi-cytokeratin, x200; **B:** immunostaining for multi-cytokeratin, x400; **C:** staining by hematoxylin and eosin (HE), x200; **D:** staining by hematoxylin and eosin (HE), x400.

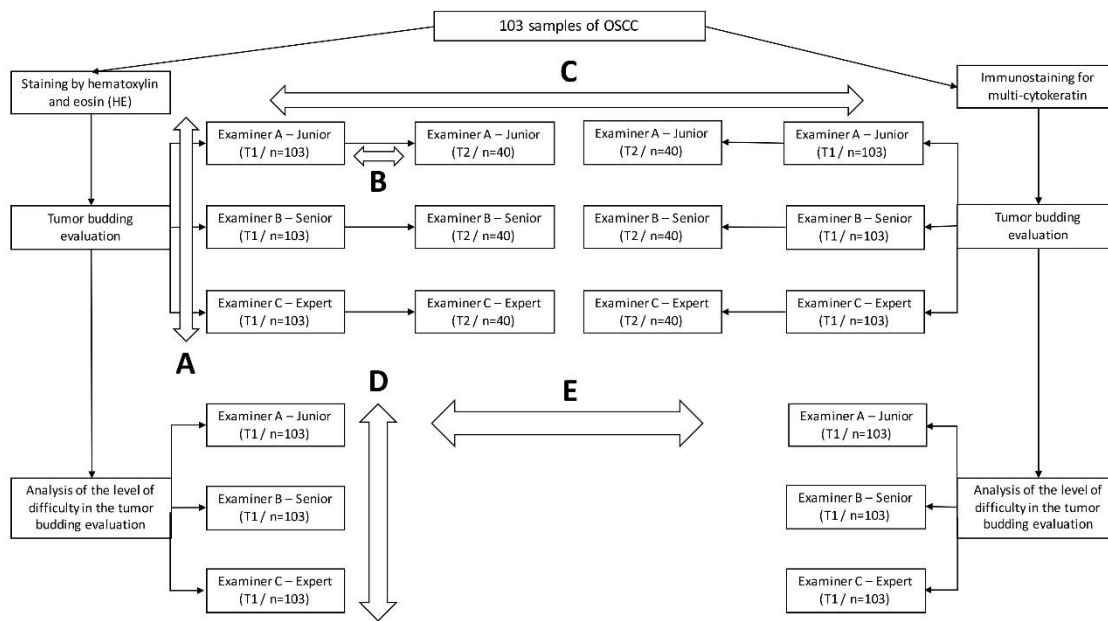


Figure 2 - Study design and analyzes performed. **A:** inter-examiner agreement (reproducibility); **B:** intra-examiner agreement (repeatability); **C:** agreement between the two methods of evaluation; **D:** comparison of the level of difficulty of the tumor budding evaluation among the three examiners; **E:** comparison of the level of difficulty of the tumor budding evaluation between the two methods of evaluation.

Table 1 - Kappa values of inter-examiner (reproducibility) and intra-examiner agreement (repeatability).

Method	Inter-examiner ¹	Intra-examiner ² (Examiner A – Junior) ³	Intra-examiner ² (Examiner B – Senior) ³	Intra-examiner ² (Examiner C – Expert) ³
Multi-cytokeratin (AE1/AE3)	0.67 (95% CI - 0.55 to 0.78)	0.94 (95% CI - 0.85 to 1.04)	0.94 (95% CI - 0.84 to 1.04)	0.95 (95% CI - 0.85 to 1.04)
Hematoxylin and Eosin (HE)	0.27 (95% CI - 0.16 to 0.39)	0.76 (95% CI - 0.54 to 0.98)	0.53 (95% CI - 0.24 to 0.82)	0.76 (95% CI - 0.54 to 0.98)

¹ Fleiss' Kappa: Examiner A *versus* examiner B *versus* examiner C.

² Cohen's Kappa: T1 (first evaluation) *versus* T2 (reevaluation of 40 samples, 30 days after T1).

³ Criteria proposed by Kai et al. (12): junior, pathologist with experience of less than 5 years; senior, pathologist with experience between 5 and 10 years; expert, pathologist with more than 10 years of experience.

Table 2 - Values of concordance analysis between the two methods of tumor budding evaluation.

Examiner	IHQ - / HE -	IHQ + / HE +	IHQ - / HE +	IHQ + / HE -	Kappa ¹
A (Junior) ²	37	28	13	25	0.26 (95% CI - 0.08 to 0.45)
B (Senior) ²	65	16	3	19	0.46 (95% CI - 0.26 to 0.66)
C (Expert) ²	55	28	2	18	0.59 (95% CI - 0.43 to 0.75)

¹ Cohen's Kappa: Multi-cytokeratin (IHC) *versus* HE.

² Criteria proposed by Kai et al. (12): junior, pathologist with experience of less than 5 years; senior, pathologist with experience between 5 and 10 years; expert, pathologist with more than 10 years of experience.

(IHC - / HE -): Number of samples classified as "low-intensity or no tumor budding" by both the immunostaining and the HE methods.

(IHC + / HE +): Number of samples classified as "high-intensity tumor budding" by both the immunostaining and the HE methods.

(IHC - / HE +): Number of samples classified as "low-intensity or no tumor budding" by the immunostaining method and as "high-intensity tumor budding" by the HE method.

(IHC + / HE -): Number of samples classified "high-intensity tumor budding" by the immunostaining method and as "low-intensity or no tumor budding" by the HE method.

Table 3 - Comparison and measures of central tendency, dispersion and position of the data acquired by measuring the level of difficulty of the tumor budding evaluation.

Method	Measures ¹	Examiner A (Junior) ²	Examiner B (Senior) ²	Examiner C (Expert) ²	p value ³
Multi-cytokeratin (AE1/AE3)	Minimum	2	1	2	<0.05 ^{b,c} n.s. ^a
	P25	3	3	4	
	P50	4	4	4	
	P75	4	4	5	
	Maximum	5	5	5	
	Sum	373	375	426	
Hematoxylin and Eosin (HE)	Minimum	1	1	1	<0.05 ^{b,c} n.s. ^a
	P25	2	2	3	
	P50	2	3	4	
	P75	3	4	5	
	Maximum	5	5	5	
	Sum	237	270	386	
p value ⁴		<0.05	<0.05	<0.05	

¹ Values measured by a Likert-type scale for difficulty level: 1 - very difficult, 2 - difficult, 3 - neutral, 4 - easy, 5 - very easy; P25 - 25th percentile (first quartile); P50 - 50th percentile (median); P75 - 75th percentile (third quartile); Sum (arithmetic sum of the values assigned to the 103 evaluated cases).

² Criteria proposed by Kai et al. (12): junior, pathologist with experience of less than 5 years; senior, pathologist with experience between 5 and 10 years; expert, pathologist with more than 10 years of experience.

³ p value obtained by the Friedman's test followed by Dunn's post hoc test.

^a Examiner A *versus* Examiner B; ^b Examiner A *versus* Examiner C; ^c Examiner B *versus* Examiner C; n.s - not significant (p>0.05).

⁴ p value obtained by the Wilcoxon's test: Multi-cytokeratin *versus* HE.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que:

- a) a reprodutibilidade da avaliação do budding tumoral em CCEB pelo método da imunomarcção para multi-citoqueratina mostrou-se substancial, sendo maior que a reprodutibilidade pelo método da coloração pela hematoxilina e eosina, que se mostrou razoável;
- b) a repetibilidade da avaliação do budding tumoral em CCEB pelo método da coloração pela hematoxilina e eosina variou de moderada a substancial entre os examinadores, independentemente da experiência do examinador;
- c) a repetibilidade da avaliação do budding tumoral em CCEB pelo método da imunomarcção para multi-citoqueratina não variou entre os examinadores, mostrando-se quase perfeita;
- d) a concordância entre os dois métodos de avaliação do budding tumoral em CCEB variou de regular a moderada entre os examinadores, sendo menor no examinador menos experiente;
- e) todos os examinadores apresentaram maior dificuldade da avaliação do budding tumoral pelo método da coloração pela hematoxilina e eosina, quando comparado ao método da imunomarcção para multi-citoqueratina;
- f) o examinador mais experiente apresentou menor dificuldade na avaliação do budding tumoral quando comparado aos dois avaliadores menos experientes, independentemente do método de avaliação.

Diante do exposto, considerando a baixa concordância entre os dois métodos de avaliação do budding tumoral analisados, recomenda-se que a avaliação do budding tumoral em CCEB seja realizada pelo método da imunomarcção para multi-citoqueratina, tendo em vista sua menor dificuldade, maior reprodutibilidade e maior replicabilidade quando comparado ao método da coloração pela hematoxilina e eosina.

REFERÊNCIAS

- ALMANGUSH, A. et al. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. **Head and Neck**, New York, v.36, n.6, p. 811-818, June 2014a.
- ALMANGUSH, A. et al. Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma - a systematic review. **Histopathology**, Oxford, June 2014b [Epub ahead of print].
- ANNEROTH, G., BATSAKIS, J., LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.95, n.3, p.229-249, June 1987.
- BARASCH, A.; SAFFORD, M.M. Management of oral pain in patients with malignant diseases. **Compendium**, Newtown, v.14, n.11, p. 1378-1382, Nov. 1993.
- BRAY, F. et al. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. **European Journal of Cancer**, Oxford, v.38, n.1, p. 99-166, Jan. 2002.
- BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **The Journal of Pathology**, v.166, n.4, p. 375-381, Apr. 1992.
- DÖBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Reviews**, Boston, v.24, n.1, p. 9-17, Jan. 2005.
- FUNK, G.F. et al. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a National Cancer Data Base report. **Head Neck**, New York, v.24, n.2, p. 165-180, Feb. 2002.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/**Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: Inca, 2016. Disponível em: < www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa20162111.pdf > Acesso em: 19 de ago. de 2016.
- KANAZAWA, H. et al. Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer. **Colorectal Disease**, Oxford, v.10, n.1, p. 41-47, Jan. 2007.
- KAZAMA, S. et al. Tumour budding at the deepest invasive margin correlates with lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer detected by anticytokeratin antibody CAM5.2. **British Journal of Cancer**, v.94, n.2, p. 293-298, Jan. 2006.
- KOIKE, M. et al. Multivariate analysis of the pathologic features of esophageal squamous cell cancer: tumor budding is a significant independent prognostic factor. **Annals of Surgical Oncology**, New York, v.15, n.7, p. 1977-1982, July 2008.
- LUO, W.R. et al. Tumour budding and the expression of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma. **Histopathology**, Oxford, v.61, n.6, p. 1072-1081, Dec. 2012.

MAJCHRZAK, E. et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. **Radiology and Oncology**, v.48, n.1, p. 1-10, Jan. 2014.

NEVILLE, B.W.; et al. **Patologia oral & maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

NEVILLE, B.W. et al. **Oral and maxillofacial pathology**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2015. 928p.

NILSSON, P.J. et al. Tumour budding detected by laminin-5 α 2-chain immunohistochemistry is of prognostic value in epidermoid anal cancer. **Annals of Oncology**, Dordrecht, v.16, n.6, p. 893-898, June 2005.

PRALL, F. Tumour budding in colorectal carcinoma. **Histopathology**, Oxford, v.50, n.1, p. 151-162, Jan. 2007.

PULTE, D.; BRENNER, H. Change in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. **Oncologist**, Dayton, v.15, n.9, p. 994-1001, 2010.

REGEZI, J.; SCIUBBA, J.; JORDAN, R. Neoplasmas. In: **Patologia oral: correlações clínico patológicas**. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2013.

SARIOGLU, S. et al. Tumor budding as a prognostic marker in laryngeal carcinoma. **Pathology, Research and Practice**, Stuttgart, v.206, n.2, p. 88-92, Feb. 2010.

SCULLY, C.; et al. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, Valencia, v.16, n.3, p. 306-311, May 2011.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncology**, Oxford, v.45, n.4-5, p. 301-308, Apr./May 2009.

SEKI, M. et al. 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**, New York, v.38, Suppl. 1, p. E1582-1590, Apr. 2016.

SHAH, J.P.; Gil, Z. Current concepts in management of oral cancer-surgery. **Oral Oncology**, Oxford, v.45, n.4-5, p. 394-401, July 2009.

SLOOTWEG PJ, EVESON JW. Tumours of the oral cavity and oropharynx. In: BARNES, L. et al. **World health organization classification of tumours**. Pathology and Genetics. Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press, 2005. Cap. 4, p. 164-175.

UENO, H. et al. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. **Histopathology**, Oxford, v.40, n.2, p. 127-132, Feb. 2002.

XIE, N. 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**, v.44, n.4, p. 266-272, Apr. 2015.

WANG, L.M. et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. **The American Journal of Surgical Pathology**, New York, v.33, n.1, p. 134-141, Jan. 2009.

WANG, C. et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Oxford, v.40, n.7, p. 545-551, Aug. 2011.

YAMAGUCHI, Y. et al. Histopathologic features of the tumor budding in adenocarcinoma of the lung. Tumor budding as an index to predict the potential aggressiveness. **Journal of Thoracic Oncology**, Hagerstown, v.5, p. 1361-1368, Sept. 2010.

ZLOBEC, I.; LUGLI, A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. **Oncotarget**, v.1, n.7, p. 651-661, Nov. 2010.