



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

EOSINOFILIA TECIDUAL NA NEOPLASIA INTRA-EPITGHELIAL ORAL (NIO) COMO UM PROVÁVEL INDICADOR DE INVASÃO.

Trabalho submetido por
Carla Patrícia Martinelli-Kläy
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2017



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**EOSINOFILIA TECIDUAL NA NEOPLASIA INTRA-EPITGHELIAL ORAL
(NIO) COMO UM PROVÁVEL INDICADOR DE INVASÃO.**

Trabalho submetido por
Carla Patrícia Martinelli-Kläy
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Paulo Mauricio

e coorientado por
Prof. Doutor Francisco Salvado,

Setembro de 2017

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de Mestrado Integrado em Medicina Dentária À MINHA ADORÁVEL
FAMÍLIA:

Andreas – MEU GRANDE AMOR E COMPANHEIRO DE VIDA

Pai – GRANDE MESTRE,

Mãe – MEU ANJO

Irmãos Sílvio, Valéria e Celso- OS MELHORES AMIGOS.

Sobrinhos Gabriel, Victor e Laura – LUZES ENCANTADAS

Cunhadas Maria Cristina e Teresa Cristina - HARMONIA

“Dê a quem você ama: asas para voar, raízes para voltar e motivos para ficar”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Maurício pela competência, disponibilidade, carinho e suporte profissional.

Ao coorientador Prof. Dr. Franciso Salvado pelo profissionalismo, acolhimento carinhoso e apoio incondicional.

“Durante a nossa vida: Conhecemos pessoas que vêm e que ficam, Outras que vêm e passam. Existem aquelas que, vêm, ficam e depois de algum tempo se vão. Mas existem aquelas que vêm e se vão com uma enorme vontade de ficar...”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Tommaso Lombardi, responsável pela Unidade de Patologia Oral e Maxilofacial, Hospitais Universitários de Genebra (HUG), Universidade de Genebra, Suíça, pela amizade, profissionalismo e carinho.

Ao Prof Antonio Barone, responsável pela Unidade de Cirurgia Oral e Implantologia, Hospitais Universitários de Genebra (HUG), Universidade de Genebra, Suíça, pela solidariedade e carinho.

Ao Dr. Philippe Mojon pela sua disponibilidade e importante colaboração.

Ao Prof Edson Soares, chefe do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Brasil, pela amizade, suporte e incentivo à pesquisa.

Ana Maria da Rocha, Eliane Dubois, Claire Herrmann, Angela Fonseca pela contribuição no desenvolvimento prático do trabalho.

A todos os que direta ou indireta participaram da execução e conclusão deste trabalho,

*“O CRÉDITO PERTENCE ÀQUELE
QUE LUTOU COM DENODO;
QUE NÃO DESISTIU NUNCA;
QUE SENTE GRANDE ENTUSIASMO E GRANDE EMPENHO;
QUE SE DEVOTA A UMA BOA CAUSA;
E QUE, NO MELHOR DOS CASOS, OBTÉM, AO FIM,
O TRIUNFO DA GRANDE REALIZAÇÃO;
E QUE, NO PIOR, QUANDO FRACASSA,
AO MENOS FRACASSA OUSANDO GALHARDAMENTE.
ASSIM, O SEU LUGAR NUNCA SERÁ
ENTRE AQUELAS ALMAS TÍMIDAS
QUE NÃO CONHECEM NEM A VITÓRIA NEM A DERROTA”*

THEODORE ROOSEVELT

RESUMO

OBJETIVO: investigar a presença dos eosinófilos na neoplasia intraepitelial oral (NIO) e no carcinoma de células escamosas da cavidade bucal (CCEO) e a sua relação com a invasão.

MATERIAL E MÉTODOS: Noventa e nove biópsias foram selecionadas e subdivididas em 6 grupos: NIO-1 (16 casos), NIO-2 (18 casos), NIO-3 (17 casos), CCEO microinvasivo (10 casos), CCEO invasivo não metastático (22 casos) e CCEO invasivo metastático (16 casos). As lâminas, contendo os cortes das diferentes lesões, foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E), e os eosinófilos foram, então, quantificados. A primeira área selecionada foi consistida por um campo contendo o maior número de eosinófilos (eos/hpf) seguido por mais nove hpfs consecutivos (eos/10hpf), cobrindo uma área de 0.576mm²/10 hpf.

RESULTADO: A distribuição dos eosinófilos foi associada à severidade do diagnóstico ($p < 0.01$), porém, diferença significativa foi observada somente entre os grupos NIO-3 ou CCEO microinvasivo e CCEO não metastático e metastático ($p < 0.01$). O limiar para a invasão foi de 7eos/10hpf com sensibilidade de 62,5% e especificidade de 96,1%. Nenhum eosinófilo foi observado no grupo NIO-1, enquanto que em NIO-2, apenas 2 (11.11%) dos 18 casos foram positivos. Em NIO-3, 5 (29.41%) dos 17 casos mostraram eosinofilia tecidual; 4 dos quais tiveram ≥ 3 eos/hpf ou ≥ 7 eos/10hpf. Três casos foram suspeitos de invasão; dois deles tiveram história prévia de CCEO e apresentaram 7 eos/hpf ou 16 eos/10hpf e 8 eos/hpf ou 26 eos/10hpf. Quatro (40%) dos 10 casos de CCEO microinvasivo foram positivos para eosinófilo e apresentaram ≥ 3 eos/hpf and ≥ 7 eos/10hpf. Apesar de não ter sido significantemente diferente, o grupo de CCEO invasivo não metastático teve maior número de casos (68.2%) com ≥ 22 eos/10hpf contrastando com 50% observados no CCEO invasivo metastático.

CONCLUSÕES: Nossos resultados sugerem que os eosinófilos podem ser considerados um indicador de invasão nos casos de NIO, o que auxiliaria o diagnóstico principalmente nos casos difíceis e de biópsias pequenas.

Palavras chave: eosinofilia tecidual, neoplasia intra-epitelial oral (NIO), displasia epitelial oral, carcinoma de células escamosas da cavidade bucal (CCEO)

ABSTRACT

OBJECTIVE: to investigate the presence of eosinophils in oral intraepithelial neoplasia (OIN) and OSCC lesions and its relation to invasion.

MATERIAL AND METHODS: Ninety-nine oral biopsies were selected and subdivided into: OIN-1(16 cases), OIN-2 (18 cases), OIN-3 (17 cases), microinvasive OSCC (10 cases), non-metastatic OSCC (22 cases) and metastatic OSCC (16 cases). The tissue eosinophilia was evaluated histologically in slices stained with hematoxylin and eosin.

RESULTS: Eosinophil distribution was associated with diagnosis severity ($p \leq 0.01$). A significant difference was found between OIN-3 or microinvasive OSCC and non-metastatic or metastatic OSCC. Stromal invasion threshold was 7 eos/10 hpf (96.1% specificity and 62.5% sensitivity). Eosinophils were absent in OIN-1; in OIN-2, 2 cases were positive. In OIN-3, 5 cases showed tissue eosinophilia, 4 of which had ≥ 3 eos/hpf or ≥ 7 eos/10 hpf. Three cases were suspected of invasion; 2 had a previous history of OSCC with elevated eosinophil infiltrate. In microinvasive OSCC, the four positive cases presented ≥ 3 eos/hpf and ≥ 7 eos/10 hpf. Although not significantly different, non-metastatic invasive OSCC had a higher number of cases (68.2%) with ≥ 22 eos/10hpf contrasting with 50% in metastatic OSCC.

CONCLUSIONS: Our results suggest that eosinophils can be considered an indicator of invasion in OIN, helping in cases of difficult diagnosis.

Keywords: tissue eosinophilia, oral intraepithelial neoplasia (OIN), oral epithelial dysplasia, oral squamous cell carcinoma (OSCC).

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3. RESULTADOS	Erro! Marcador não definido.
4. DISCUSSÃO	233
5. CONCLUSÕES	277
6. BIBLIOGRAFIA	29
7. SUBMISION	32

O artigo foi submetido à apreciação do jornal "Oral Diseases" em 22 de agosto de 2017 e aceito para a publicação em 25 de outubro de 2017:

It is a great pleasure to accept your manuscript entitled "Tissue eosinophilia in oral intraepithelial neoplasia (OIN) as a probable indicator of invasion" for publication in the journal Oral Diseases.

Please note, however, that although the manuscript is accepted, the files will now be returned to you in order for you to check and approve them as the final version. Articles also cannot be published until the publisher has received the appropriate signed licence agreement. Therefore, within the next few days the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system asking them to log in and presenting them with the appropriate licence for completion.

Please note that corresponding authors should always be informed by Oral Diseases when their paper has been published. Co-authors are not, however, automatically notified when their paper has been published; if they want to find out the status of their paper and obtain offprints for themselves they need to register with Author Services (<http://authorservices.wiley.com>).

On behalf of both Senior Editors of Oral Diseases, I thank you again for your fine contribution, and look forward to your continued contributions to the journal and its increasing global reputation.

Yours sincerely,
Bruce
Professor Bruce Baum

Senior Editor, Oral Diseases

INDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	18
Figura 2	18
Figura 3	19
Tabela 1	15
Tabela 2	20
Tabela 3	21

LISTA DE ABREVIATURAS

NIO – neoplasia intra-epitelial oral

CCE - Carcinoma de células escamosas

NK - natural killer

CD - células dendríticas

EPO - peroxidase eosinofílica

MBP - proteína básica principal

ECP - proteína catiônica eosinofílica

EDN - neurotoxina derivada de eosinófilos

TGF- α - fator de crescimento transformado alfa

TGF- β - fator de crescimento transformado beta

GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos

IL – interleucina

IFN- γ – Interferon- gama

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TATE - eoinofilia tecidual associada a tumores

HPF - high-power field

AUC - área sob a curva

Curva ROC - Receiver Operating Characteristic

DU 145 e PC-3 - células tumorais prostáticas

CCS (SCC-9) - linhagem de células tumorais epiteliais

1. INTRODUÇÃO

Carcinoma de células escamosas conta com mais de 90% dos cânceres da cavidade bucal e é considerado a maior causa de morbidade e mortalidade em todo mundo (Warnakulasuriya 2009). Na mucosa bucal, o epitelial alterado pode inicialmente apresentar-se como uma neoplasia intra-epitelial oral (NIO) ou displasia epitelial e então, progredir para um bem estabelecido carcinoma de células escamosas com um mínimo de invasão (CCEO microinvasivo) ou com uma invasão mais profunda (CCEO invasivo). Essas lesões estão frequentemente associadas ao infiltrado inflamatório tal como, células B, células T, natural killer (NK), células T NK, células dendríticas (CD), macrófagos e também eosinófilos (Sakkal *et al*, 2016; Martinelli-Kläy *et al*, 2009; Lombardi *et al*, 2008).

Eosinófilos são leucócitos principalmente relacionados com infecções parasitárias (ex. infecções causadas por helmintos) e doenças alérgicas. De acordo com a literatura, essas células são capazes de estimular ou inibir a imunidade anti-tumor, sugerindo um importante papel na imunologia. Sob diversos estímulos, os eosinófilos podem liberar várias proteínas tais como, peroxidase eosinofílica (EPO), proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), fatores de crescimento (TGF- α , TGF- β , GM-CSF), citocitocinas (IL-8, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13), leucotrienes, prostaglandina E2. Essas proteínas podem causar a morte celular e a indução da inflamação, tão bem como, contribuir para a progressão ou regulação do tumor (Sakkal *et al*, 2016; Martinelli-Kläy *et al*, 2009; Lombardi *et al*, 2008).

A eosinofilia tecidual associada a tumores (TATE) tem sido bem estudada em diversas regiões (Szalayova *et al*, 2016; Spiegel *et al*, 2002; Spiegel, 2002) incluindo a região da cabeça e pescoço (Bankur *et al*, 2016; Tadbir *et al*, 2009; Said *et al*, 2005; Alrawi *et al*, 2005). Contudo, a sua exata função não está ainda estabelecida. Nos CCEO, vários estudos mostram que os eosinófilos podem estar associados com um favorável prognóstico (Debta *et al*, 2016; Dorta *et al*, 2002), mas existem outros estudos mostrando a sua relação com um desfavorável prognóstico (Yellapurkar *et al*, 2016; Alrawi *et al*, 2005), ou mesmo não apresentando qualquer relação com a evolução dos pacientes (Tadbir *et al*, 2009). Além disso, poucos estudos examinam os eosinófilos em NIO e o seu papel na invasão (Kargahi *et al*, 2015; Madhura *et al*, 2015; Jain *et al*, 2014).

O diagnóstico de NIO e de CCEO é baseado exclusivamente no exame histopatológico e, algumas vezes, o reconhecimento da invasão superficial e mesmo profunda pode ser difícil de ser detetada. Portanto, o conhecimento de um fator auxiliar associado à invasão contribuiria para o diagnóstico preciso. O objetivo desse estudo é investigar a presença dos eosinófilos em NIO e CCEO e a sua relação com a invasão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Um estudo retrospectivo de 99 amostras, incluindo biópsias incisional e excisional, consistiu de 51 casos com NIO e 48 com CCEO. Em NIO, 25 pacientes (49%) foram homens e 26 (51%) foram mulheres. A idade variou entre 34 e 87 anos (média de 62.03 anos). A região mais frequentemente afetada foi a língua (43.1%), seguida do assoalho da boca (21.6%) e do lábio (15.7%). Em CCEO, 32 (66.7%) dos 48 pacientes foram homens e 16 (33.3%) foram mulheres. A idade variou de 39 a 84 anos (média de 62.62 anos). A maior incidência foi na língua (47.9%) seguida da gengiva (22.9%) e do assoalho da boca (16.7%). A história de tabaco e álcool foram coletadas porém, vários casos não tiveram informações precisas. Detalhes desse estudo são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1- Resumo dos aspectos clínicos dos pacientes com NIO e CCEO.

Características Clínicas	NIO (n=51) n° de pacientes (%)	CCEO (n=48) n° de pacientes (%)
Sexo		
masculino	25 (49%)	32 (66.7%)
feminine	26 (51%)	16 (33.3%)
Idade (média, mediana, variação interquartil)	62.03; 64 (52-69)	62.62; 61; (56-69)
Tabaco		
negativo	3 (5.9%)	4 (8.3%)
positivo	19 (37.2%)	32 (66.7%)
sem informação	29 (56.9%)	12 (25%)
Álcool		
negativo	4 (7.8%)	5 (10.4%)
positivo	8 (15.7%)	27 (56.2%)
sem informação	39 (76.5%)	16 (33.4%)
Localização		
língua	22 (43.1%)	23 (47.9%)
assoalho da boca	11 (21.6%)	8 (16.7%)
gengiva	3 (5.9%)	11 (22.9%)
lábio	8 (15.7%)	2 (4.2%)
outros (mucosa jugal, palato)	7 (13.7%)	4 (8.3%)

O diagnóstico foi confirmado histologicamente e os casos de NIO foram classificados segundo o sistema proposto por Küffer and Lombardi (2002): NIO-1 (displasia leve), NOI-2 (displasia moderada) e NIO-3 (displasia severa/carcinoma in situ). Independente do grau de diferenciação do tumor, CCEO foi agrupado em não metastático e metastático. A metástase regional foi confirmada histologicamente através da presença de células neoplásicas nos nódulos linfáticos. Os casos foram selecionados a partir dos arquivos do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O comitê de Ética da Universidade de São Paulo-USP, Brasil aprovou o protocolo (n° 4012/2007). Os casos

selecionados foram subdivididos em 6 grupos: NIO-1(16 casos), NIO-2 (18 casos), NIO-3 (17 casos; 3 deles tiveram suspeita de invasão), CCEO microinvasivo (10 casos), CCEO invasivo não metastático (22 casos) e CCEO invasivo metastático (16 casos). Os casos com ≤ 2 mm de invasão foram considerados carcinomas microinvasivos e agrupados separadamente para que a eosinofilia tecidual fosse precisamente analisada. Em todos os casos de NIO-3 e CCEO microinvasivo, cortes seriados foram realizados para excluir a presença de algum carcinoma invasivo.

Quantificação dos eosinófilos

Cortes de 4 μ m de espessura foram corados com hematoxilina e eosina e os eosinófilos analisados histologicamente por dois especialistas em patologia bucal (CPM, TL). Apenas células com grânulos citoplasmáticos eosinofílicos foram consideradas eosinófilos. Extensas áreas de necrose, eosinófilos localizados no interior de vasos sanguíneos e hemáceas sobrepostas à células inflamatórias foram excluídas da análise. Para a quantificação dos eosinófilos, foram selecionados 10 campos microscópicos por amostra, usando um microscópio contendo um retículo quadriculado na ocular, numa ampliação de x400, cobrindo uma área total de 0.576mm²/10hpf (hpf-high-power field). A primeira área selecionada (total da área 0.0576 mm²/hpf) foi a que continha o maior número de eosinófilos (eos/hpf) seguida por mais nove hpfs consecutivos (eos/10hpf). Os grupos de CCEO invasivos (não metastático e metastático) apresentaram vários casos positivos para eosinófilos e a sua distribuição no tecido foi preferencialmente difusa. O número de eosinófilos variou entre zero e 226 eos/10hpf e teve uma média de 47.7 eos/10hpf para o CCEO não metastático e 42.1 eos/10hpf para o CCEO metastático. Por essa razão, a tabela foi categorizada como: negativa; 1-4 eos/10hpf; 5-10 eos/10hpf; 11-21 eos/10hpf; 22-45 eos/10hpf, 46-89 eos/10hpf e ≥ 90 eos/10hpf.

Análise Estatística

A distribuição dos eosinófilos (eos/10hpf) nos diferentes grupos (NIO-1, NIO-2, NIO-3, CCEO microinvasivo, CCEO não metastático, CCEO metastático) foi analisada através do Boxplot. O resultado dos eosinófilos dentro de cada grupo não seguiu uma distribuição normal. A contagem dos eosinófilos foi então analisada através do teste Kruskal-Wallis e as diferenças foram identificadas usando o teste Mann-Whitney. O valor preditivo dos eosinófilos/10hpf para a invasão foi demonstrado pela curva de característica de operação do receptor (Curva **ROC**-Receiver Operating Characteristic). A análise estatística foi

realizada usando o R software v. 3.3.2. (R foundation, Vienna, Áustria). Os resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. RESULTADOS

A distribuição dos eosinófilos por 10hpf foi significativamente associada à severidade do diagnóstico ($p < 0.01$; Figura 1). Em NIO, a eosinofilia tecidual foi limitada ao tecido conjuntivo em 100% dos casos, enquanto que no CCEO microinvasivo (2 dos 4 casos positivos para eosinófilos) e CCEO invasivo (17 dos 34 positivos para eosinófilos) a presença dos eosinófilos intraepitelial foi também observada em 50% dos casos (Figura 2).

Nenhum eosinófilo foi observado em NIO-1 enquanto que, no grupo NIO-2, apenas 2 (11.11%) casos positivos foram encontrados: 1 caso apresentou 1 eos/10hpf e o outro 3 eos/10hpf. No grupo NIO-3, 5 (29.41%) dos 17 casos mostraram eosinofilia tecidual; 3 deles foram suspeitos de invasão e dois dos 3 casos tiveram história prévia de CCEO invasivo (Tabela 2). Nos 3 casos suspeitos de invasão, a contagem dos eosinófilos foi de 26 eos/10hpf (caso 3), 16 eos/10hpf (caso 4) e 7 eos/10hpf (caso 5). Os outros 2 casos apresentaram 1 eos/10hpf (caso 1) e 7 eos/10hpf (caso 2). Não houve diferença estatística entre os grupos NIO-2 e NIO-3. No grupo CCEO microinvasivo, apesar do número de casos ter sido maior (40%) do que o grupo NIO-3 (29.41%), não houve diferença estatística entre eles. Quatro dos 10 casos de CCEO microinvasivo foram positivos e apresentaram ≥ 7 eos/10hpf (Tabela 2). O limiar para a invasão foi de 7 eos/10hpf com sensibilidade de 62,5% e especificidade de 96,1%. A curva ROC mostrou uma boa predição com uma área sob a curva (AUC) de 0.87 (Figure 3).

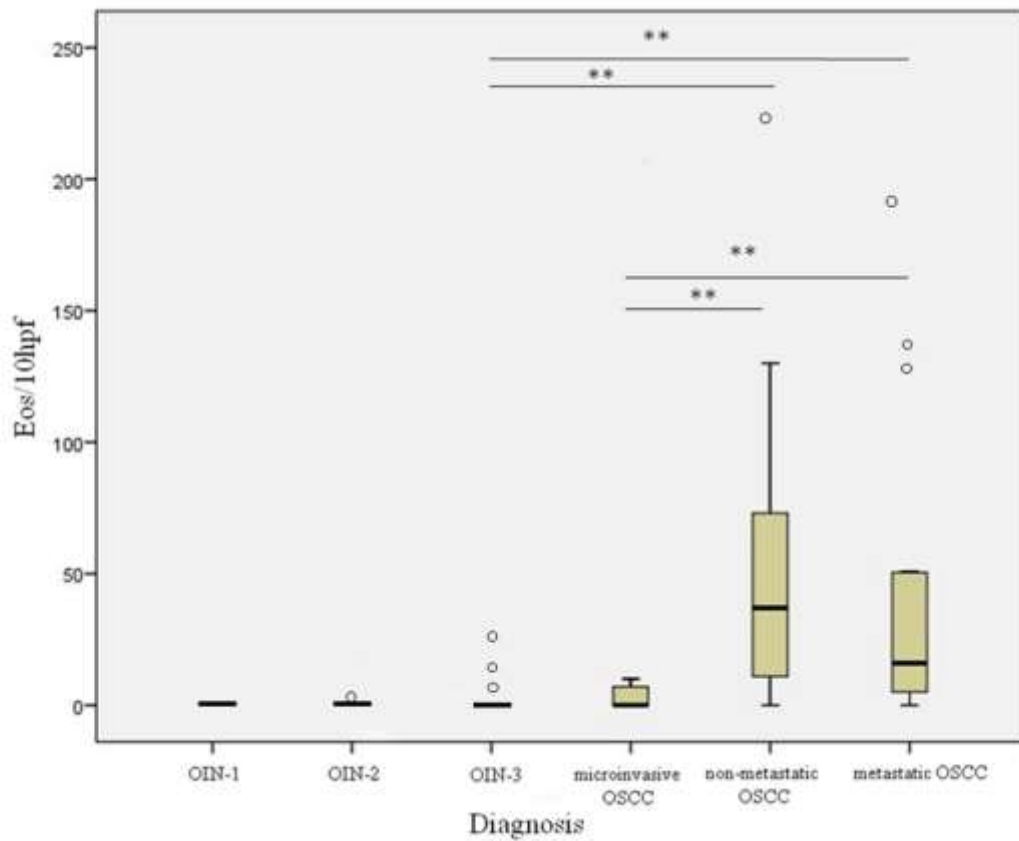


Figura 1- Boxplot mostrando a distribuição dos eosinófilos/10hpf nos diferentes grupos. Diferença estatística ($p < 0.01^{**}$) é observada entre os grupos NIO-3 e CCEO não metastático; NIO-3 e CCEO metastático; CCEO microinvasivo e CCEO não metastático; CCEO microinvasivo e CCEO metastático.

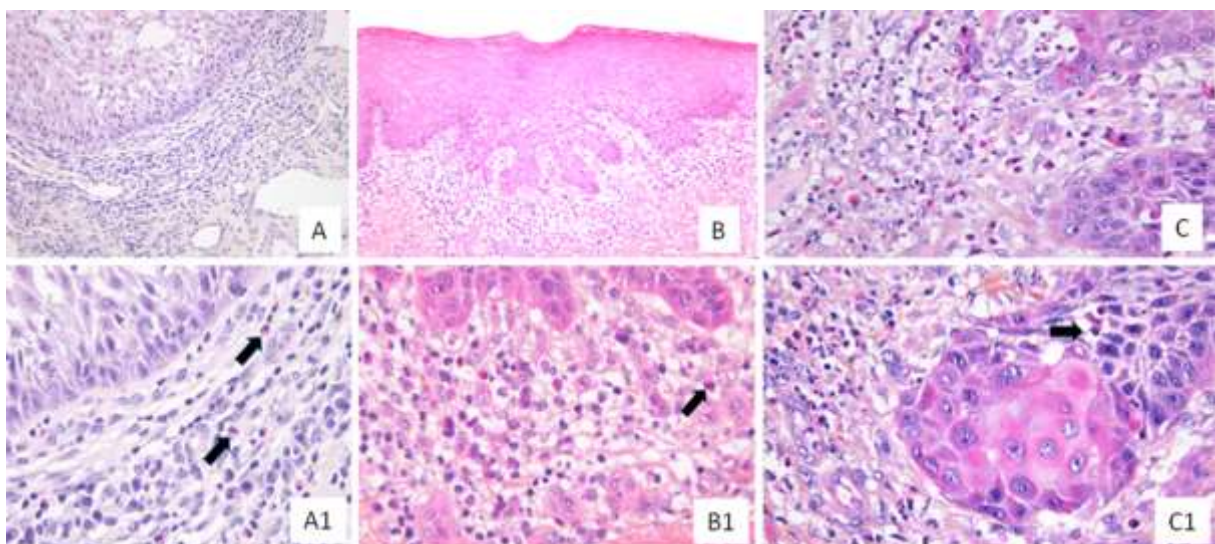


Figura 2- Aspecto histológico mostrando eosinofilia tecidual (setas) em NIO-3 (A1, A2), CCEO microinvasivo (B, B1) e CCEO invasivo (C, C1). Em NIO-3 (A, A1), a eosinofilia tecidual está limitada ao tecido conjuntivo enquanto que no CCEO (C, C1), a presença do eosinófilo intra-epithelial também é observada. A1; B1, C, C1 (HE, $\times 40$); A, B (HE, $\times 10$).

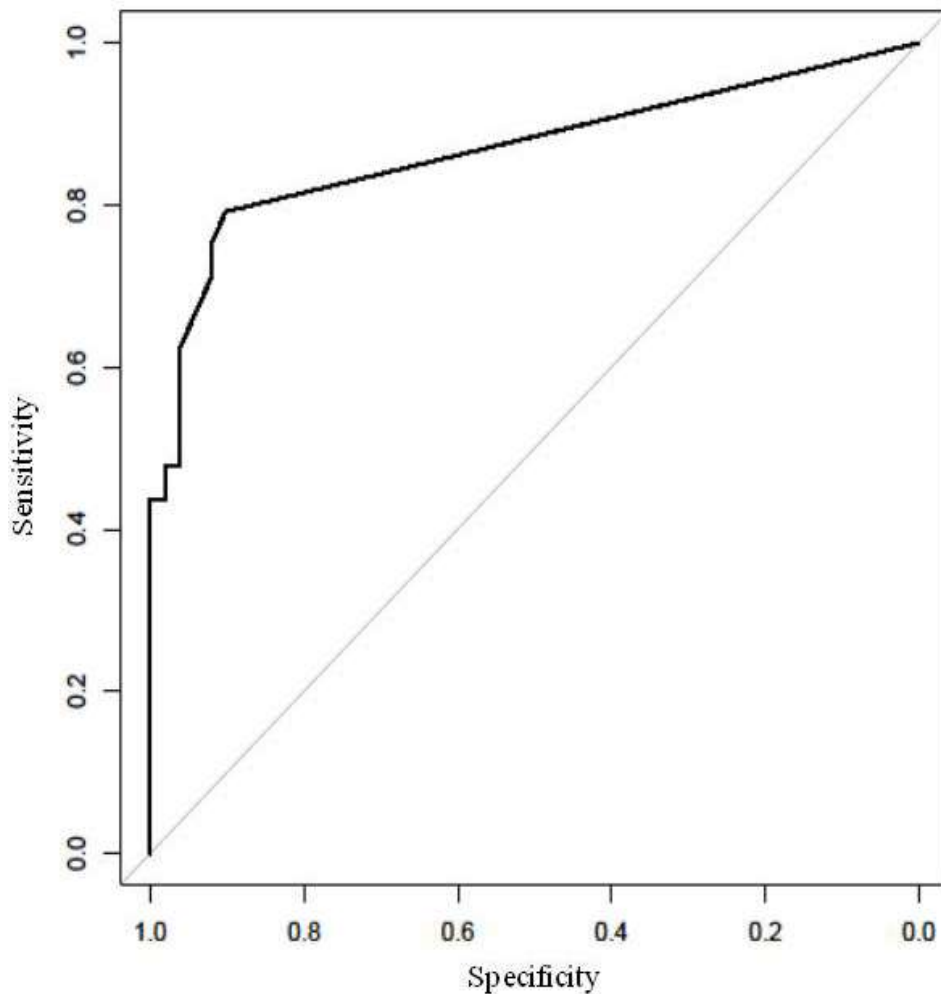


Figura 3- A curva ROC mostrando boa predição com área sob a curva (AUC) de 0.87%. O limiar para invasão é de 7eos/10hpf com sensibilidade de 62,5% e especificidade de 96,1%.

Como a microinvasão pode estar restrita a uma área, o campo contendo o maior número de eosinófilos (eos/hpf) foi também analisado nos grupos NIO e CCEO microinvasivo (Tabela 2). No grupo NIO-2, os 2 casos positivos para eosinófilo tiveram apenas 1 eos/hpf enquanto que, 4 dos 5 casos positivos em NIO-3 mostraram ≥ 3 eos/hpf. Os 3 casos suspeitos de invasão apresentaram 8 eos/hpf (caso 3), 7 eos/hpf, (caso 4) e 3 eos/hpf (caso 5). Os outros 2 casos tiveram 1 eos/hpf (caso 1) e 4 eos/hpf (caso 2). Em CCEO microinvasivo, os 4 casos positivos para eosinofilos apresentaram ≥ 3 eos/hpf. Não houve diferença estatística entre os grupos NIO-2, NIO-3 e CCEO microinvasivo.

Tabela 2- Análise dos eosinófilos (eos/10hpf e eos/hpf) em NIO e CCEO microinvasivo

	casos positivos	porcentagem (%)	eos/10hpf	média (eos/10hpf)	eos/hpf	Media	invasão das céls. Tumorais
NIO-1 (n=16)	0	0	0	0	0	0	0
NIO-2 (n=18)	caso 1 caso 2	11.11%	1 3	0.22	1 1	0.11	0
NIO-3 (n=17)	caso 1 caso 2 caso 3 caso 4 caso 5	29.41%	1 7 26 16 7	3.29	1 4 8 7 3	1.29	Não não suspeito† suspeito † suspeito
CCEO microinvasivo (n=10)	caso 1 caso 2 caso 3 caso 4	40%	10 7 7 8	3	4 3 3 3	1.3	sim sim sim sim

10 campos selecionados por amostra, usando um microscópio contendo um retículo quadriculado, ampliação x400, cobrindo uma área total de 0.576mm²/10 hpf ou 0.0576 mm²/hpf. A primeira área selecionada consiste num campo com o maior número de eosinófilos (eos/hpf) seguido por mais nove hpfs consecutivos (eos/10hpf).

† História prévia de CCEO

Com relação ao CCEO invasivo, a distribuição dos eosinófilos no tecido foi preferencialmente difusa e o número dessas células foi significativamente maior quando comparado aos grupos CCEO microinvasivo e NIO-3 ($p < 0.01$; Figura 1). No grupo CCEO não metastático, apenas 3 casos (13.6%) foram negativos e 15 (68.3%) dos 22 casos apresentaram ≥ 22 eos/10hpf. Esses dados contrastaram com o grupo CCEO metastático, que tiveram apenas 8 (50%) dos 16 casos com ≥ 22 eos/10hpf; 1 caso (6.2%) foi negativo. Apesar do maior número de eosinófilos ter sido encontrado no grupo CCEO não metastático em relação ao CCEO metastático, nenhuma diferença estatística foi observada (Tabela 3; Figura 1). A inflamação variou de leve a intensa e todos os casos de NIO-3 e CCEO microinvasivo positivos para eosinófilos tiveram moderada e intensa inflamação. Já os casos de CCEO não metastático e metastático que continham ≥ 22 eos/10hpf apresentaram entre moderada a intensa inflamação em 100% e 80% dos casos, respectivamente (não mostrado).

Tabela 3- Análise dos eosinófilos (eos/10hpf) em CCEO não metastático e metastático

	0	1-4	5-10	11-21	22-45	46-89	≥90
CCEO não metastático (n=22)	3 (13.6%)	1 (4.5%)	1 (4.5%)	2 (9.1%)	7 (31.9%)	5 (22.7%)	3 (13.7%)
CCEO metastático (n=16)	1 (6.2%)	3 (18.8%)	4 (25%)	0	3 (18.8%)	2 (12.5%)	3 (18.7%)

10 campos selecionados por amostra, usando um microscópio contendo um retículo quadriculado, ampliação x400, cobrindo uma área total de 0.576mm²/10 hpf. A primeira área selecionada consiste num campo com o maior número de eosinófilos (eos/hpf) seguido por mais nove hpfs consecutivos (eos/10hpf).

4. DISCUSSÃO

Há poucos artigos na literatura que examinam a presença dos eosinófilos em NIO e a sua relação com a invasão. Além disso, esse é o primeiro estudo que avalia os eosinófilos nos grupos NIO-3, CCEO microinvasivo e invasivo separadamente.

Segundo Madhura *et al* (2015), a média da contagem dos eosinófilos foi significativamente maior na displasia epitelial severa do que na displasia leve e moderada. Quando comparada à mucosa normal, essa eosinofilia foi maior na mucosa displásica. (Kargahi *et al*, 2015; Madhura *et al*, 2015). Jain *et al* (2014), contudo, não encontrou diferença significativa entre os diferentes graus de displasia epitelial da mucosa bucal. Nosso estudo mostrou que o aumento da contagem dos eosinófilos foi diretamente proporcional à severidade do diagnóstico ($p < 0.01$), mas nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos NIO-2, NIO-3 (Figura 1). Uma certa discrepância com relação à contagem dos eosinófilos é observada na literatura. Jain *et al* (2014), relatou uma média de contagem de eosinófilos em displasia leve, moderada e severa de 2.117, 2.850 e 2.325 eos/10hpf respectivamente, enquanto que Kargahi *et al* (2015) encontrou 1.14, 2.85 e 8.2 eos/10hpf e Madhura *et al* (2015) mostrou uma média de contagem de eosinófilos de 1.05, 2.71 e 6.4 eos/10hpf. Em nosso estudo, nenhum eosinófilo foi observado na NIO-1 e em NIO-2, apenas 2 casos positivos (média de 0.22, Tabela 2) foram observados; 1 caso apresentou 1 eos/10hpf e o outro 3 eos/10hpf. Em NIO-3, a média de contagem de eosinófilos foi 3.29 eos/10hpf. A diferença dos resultados encontrados poderia ser em decorrência da seleção dos casos ou das diferentes metodologias empregadas para a contagem dos eosinófilos.

A ótimo valor predictivo associado à invasão, no nosso estudo, foi 7 eos/10hpf (96.1% de especificidade e 62.5% de sensibilidade). Kargahi *et al* (2005), contudo, mostrou que >15 eos/10hpf (sensibilidade=61.9% e especificidade=5.3%) foi indicativo de limite entre displasia epitelial e carcinoma de célula escamosas. Estudos realizados em laringe (Said *et al*, 2005; Alrawi *et al*, 2005) mostraram que o limiar de >10 eos/hpf or >20 eos/10hpf foram significativamente associados à invasão. Apesar da diferença, a maioria dos nossos casos de carcinomas invasivo apresentou mais do que 22 eos/10hpf (Table 3). Segundo Spiegel (2002), a presença de >3 eos/hpf ou ≥ 5 eos/10hpf foram ambos significativamente associados à invasão em neoplasia intraepitelial vulvar. Em neoplasias intraepitelial cervical (Spiegel *et al*, 2002), >3 eos/hpf, particularmente ≥ 5 eos/hpf e/ou

≥ 10 eos/10hpf foram considerados forte evidência para invasão, apesar que >3 eos/hpf ainda teve um valor para a invasão. Similar a esses últimos estudos, 4 dos 5 casos positivos no nosso grupo NIO-3 apresentaram ≥ 3 eos/hpf ou ≥ 7 eos/10hpf; 3 dos quais foram suspeitos de invasão. Dois desses 3 casos tiveram aumentada contagem de eosinófilos (7 eos/hpf ou 16 eos/10 hpf e 8 eos/hpf ou 26 eos/10 hpf; Table 2) e foram associados com história prévia de CCEO. Esses dados podem reforçar a relação dos eosinófilos e a invasão do estroma. Said *et al* (2005) mostrou um caso de displasia severa que continha elevada eosinofilia tecidual e na verdade incubria um carcinoma invasivo.

Apesar do CCE microinvasivo ter um comportamento invasivo, a contagem dos eosinófilos, em nosso estudo, foi similar ao grupo NIO-3 (≥ 3 eos/hpf ou ≥ 7 eos/10 hpf, Table 1). Dentre os casos estudados por Spiegel *et al* (2002), dois foram de CCEO microinvasivo cervical e apresentaram 1-4 eos/hpf ou 1-9 eos/10hpf e ≥ 5 eos/hpf ou ≥ 10 eos/10hpf o que corrobora com os nossos resultados. A presença dos eosinófilos em NIO-3, portanto, pode ser um indicativo de invasão tumoral e nesses casos, uma análise mais detalhada da amostra com a cortes seriados poderia ser realizada.

Outro resultado expressivo observado em nosso estudo foi a presença dos eosinófilos não apenas no tecido conjuntivo como observado em NIO-3, mas no tecido epitelial em CCEO microinvasivo e invasivo. Esse dado pode, em alguns casos, ser um fator auxiliar na distinção entre NIO-3 e CCEO microinvasivo. A literatura mostra os eosinófilos localizados nas ilhotas de células epiteliais tumorais malignas em CCEO invasivo (Spiegel, 2002; Dorta *et al*, 2002).

Com relação ao carcinoma invasivo, o nosso estudo mostrou aumento significativo da eosinofilia tecidual entre os grupos NIO-3 ou CCEO microinvasivo e CCEO invasivo o que está de acordo com os resultados da literatura que correlaciona os eosinófilos à invasão tumoral (Bankur *et al*, 2016; Debta *et al*, 2016; Tostes *et al*, 2009; Falconieri *et al*, 2008). Um dado interessante foi que, apesar de não significativo, o grupo CCEO não metastático teve maior número de eosinófilos do que o grupo CCEO metastático. Similar resultado foi encontrado no trabalho de Jain *et al* (2014), que mostrou uma contagem significativamente maior de eosinófilos em CCEO não metastáticos quando comparado ao CCEO metastático sugerindo importante papel para essas células na defesa do organismo e no favorável prognóstico do paciente.

Nos carcinomas de cabeça e pescoço, a resposta Th1 está associada ao melhor prognóstico quando comparada à resposta Th2 (Dasgupta *et al*, 2006). De acordo com Argarwal *et al* (2003), o estágio inicial do CCE da cavidade bucal expressou principalmente genes INF- γ and IL-2 (resposta Th1), considerando que no estágio mais avançado, o tumor apresentou maior expressão de IL-4 and IL-10 (resposta Th2). Contudo, a resposta Th2 pode, também, eliminar o cancer na dependência dos eosinófilos e dos macrófagos. Os eosinófilos podem secretar um grande número de citocinas incluindo àquelas associadas às células Th1 (IFN γ , TNF- α , IL-8) e às células Th2 tais como, IL-4, IL-5 (Sakkal *et al*, 2016; Martinelli-Klây *et al*, 2009; Lombardi *et al*, 2008; Nishimura *et al*, 1999). O crescimento do fibrossarcoma induzido por “methylcholanthrene” foi atenuado nos camundongos transgênicos IL-5 (Simson *et al*, 2007). Eosinófilos ativados inibiram, “in vitro”, o crescimento das células tumorais prostáticas - DU 145 e PC-3 (Furbert-Harris *et al*, 2003) e, na linhagem de células tumorais epiteliais CCS (SCC-9), a inibição do crescimento esteve relacionada com a peroxidase eosinofílica (EPO) (Davoine *et al*, 2013).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a presença dos eosinófilos em NIO pode ser considerada um indicador de invasão, o que contribui para o diagnóstico, especialmente nos casos difíceis ou pequenas biópsias. Estudos futuros enfatizando o eosinófilo e o seu estado de ativação são necessários no intuito de elucidar o papel dessa célula no mecanismo da invasão das células tumorais.

Agradecimentos

Os autores agradecem as técnicas Ana Maria da Rocha, Eliane Dubois, Claire Herrmann e também Maria Angela Fonseca and Dr. Philippe Majon pela valiosa contribuição.

Conflito de Interesse

Autores declaram não haver conflito de interesse.

. BIBLIOGRAFIA

Agarwal A., Rani M., Saha G. K., Valarmathi T. M., Bahadur S., Mohanti B. K., & Das S. N. (2003). Disregulated expression of the Th2 cytokine gene in patients with intraoral squamous cell carcinoma. *Immunol Invest*, **32**:17-30.

Alrawi S. J., Tan D., Stoler D. L., Dayton M., Anderson G. R., Mojica P., ... Loree T. (2005). Tissue eosinophilic infiltration: a useful marker for assessing stromal invasion, survival and locoregional recurrence in head and neck squamous. neoplasia. *Cancer J*, **11**:217-225.

Bankur R., Rodrigues C., Anjaly D., Gopinathan P. A., & Bankur P. K. (2016). Quantitative analysis of tumor-associated tissue eosinophilia in different histological grades of oral squamous cell carcinoma. *Indian J Dent Res*, **27**:463-467.

Dasgupta S., Bhattacharya-Chatterjee M., O'Malley B. W. Jr, & Chatterjee S. K. (2006). Recombinant vaccinia virus expressing interleukin-2 invokes anti-tumor cellular immunity in an orthotopic murine model of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Ther*, **13**:183-193.

Davoine F., Sim A., Tang C., Fisher S., Ethier C., Puttagunta L., ... Moqbel R. (2013). Eosinophils in human oral squamous carcinoma; role of prostaglandin D2. *J Inflamm*, **10**:4.

Debta P., Debta F. M., Chaudhary M., & Bussari S. (2016). Evaluation of myeloid cells (tumor-associated tissue eosinophils and mast cells) infiltration in different grades of oral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Paediatr Oncol*, **37**:158-167.

Dorta R. G., Landman G., Kowalski L. P., Lauris J. R., Latorre M. R., & Oliveira D. T. (2002). Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology*, **41**:152-157.

Falconieri G., Luna M. A., Pizzolitto S., DeMaglio G., Angione V., & Rocco M. (2008). Eosinophil-rich squamous carcinoma of the oral cavity: a study of 13 cases and delineation of a possible new microscopic entity. *Ann Diagn Pathol*, **12**:322-327.

Furbert-Harris P., Parish-Gause D., Laniyan I., Hunter K. A., Okomo-Awich J., Vaughn T. R. ... Oredipe OA (2003). Inhibition of prostate cancer cell growth by activated eosinophils. *Prostate*, **57**:165-175.

Jain M., Kasetty S., Sudheendra U. S., Tijare M., Khan S., & Desai A. (2014). Assessment of tissue eosinophilia as a prognosticator in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma-an image analysis study. *Patholog Res Int*, **2014**:507512.

Kargahi N., Razavi S. M., Deyhimi P., & Homayouni S. (2015). Homayouni S. Comparative evaluation of eosinophils in normal mucosa, dysplastic mucosa and oral squamous cell carcinoma with hematoxylin-eosin, Congo red, and EMR1 immunohistochemical staining techniques. *Electron Physician*, **7**:1019-1026.

Küffer R. & Lombardi T. (2002). Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). *Oral Oncol*, **38**:125-130.

Lombardi T., Martinelli-Kläy C. P., Woolgar J. A. & Mendis B. R. (2008). The significance of eosinophils in oral and head & neck cancer (squamous cell carcinoma). *Res Adv in Dental Res*, 17-27.

Madhura M. G., Gajalakshmi S., Kumar B. V., Suma S., Sarita Y. & Shweta R. D. (2015). Suma S, Sarita Y, Shweta RD. Role of tissue eosinophils in oral Leukoplakia: A pilot study. *J Oral Maxillofac Pathol*, **19**:286-290.

Martinelli-Kläy C. P., Mendis B. R. & Lombardi T. (2009). Eosinophils and oral squamous cell carcinoma: a short review. *J Oncol*, 310132.

Nishimura T., Iwakabe K., Sekimoto M., Ohmi Y., Yahata T., Nakui M., ... Ohta A. (1999). Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med*, **190**:617-627.

Said M., Wiseman S., Yang J., Alrawi S., Douglas W., Cheney R., ... Tan D. (2005). Tissue eosinophilia: a morphologic marker for assessing stromal invasion in laryngeal squamous neoplasms. *BMC Clin Pathol*, **5**:1-8.

Sakkal S., Miller S., Apostolopoulos V. & Nurgali K. (2016). Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable? *Curr Med Chem*, **23**:650-666.

Simson L., Ellyard J. I., Dent L. A., Matthaei K. I., Rothenberg M. E., Foster P. S., ... Parish CR (2007). Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J Immunol*, **178**:4222-4229.

Spiegel G. W., Ashraf M. & Brooks J. J. (2002). Eosinophils as a marker for invasion in cervical squamous neoplastic lesions. *Int J Gynecol Pathol*, **21**:117-124.

Spiegel G. W. (2002). Eosinophils as a marker for invasion in vulvar squamous neoplastic lesions. *Int J Gynecol Pathol*, **21**:108-116.

Szalayova G., Ogrodnik A., Spencer B., Wade J., Bunn J., Ambaye A., ... Rincon M (2016). Human breast cancer biopsies induce eosinophil recruitment and enhance adjacent cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat*, **157**:461-474.

Tadbir A. A., Ashraf M. J. & Sardari Y. (2009). Prognostic significance of stromal eosinophilic infiltration in oral squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg*, **20**:287-289.

Tostes Oliveira D., Tjioe K. C., Assao A., Sita Faustino S. E., Lopes Carvalho A., Landman G. & Kowalski L.P. (2009). Tissue eosinophilia and its association with tumoral invasion of oral cancer. *Int J Surg Pathol*, **17**:244-249.

Yellapurkar S., Natarajan S., Boaz K., Baliga M., Shetty P., Manaktala N., Prasad M. & Ravi M (2016). Tumour-Associated Tissue Eosinophilia in Oral Squamous Cell Carcinoma- A Boon or a Bane? *J Clin Diagn Res*, **10**:ZC65-68.

7- Submission

Tissue eosinophilia in oral intraepithelial neoplasia (OIN) as a probable indicator of invasion.

Martinelli-Kläy CP¹, Lombardi T¹, Mendis BRRN¹, Soares EG², Salvado F³, Courvoisier DS⁴, Mauricio P³

Running title: Eosinophils in oral intraepithelial neoplasia

1- Laboratory of Oral & Maxillofacial Pathology, Oral and Maxillofacial Pathology Unit, Division of Oral Maxillofacial Surgery, Department of Surgery, University Hospitals of Geneva, University of Geneva, Switzerland.

2- Department of Pathology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

3- Center for Interdisciplinary Research Egas Moniz (CiiEM), Health Sciences Institute, Monte da Caparica, Portugal.

4- Department of Rheumatology, University Hospitals of Geneva, University of Geneva, Switzerland.

Correspondence and reprint requests to:

Carla Patrícia Martinelli-Kläy

Laboratory of Oral & Maxillofacial Pathology, Oral and Maxillofacial Pathology Unit

1 rue Michel-Servet

1211 Genève 4

Switzerland.

e-mail: carla.martinelli@hispeed.ch

Abstract

OBJECTIVE: to investigate the presence of eosinophils in oral intraepithelial neoplasia (OIN) and OSCC lesions and its relation to invasion.

MATERIAL AND METHODS: Ninety-nine oral biopsies were selected and subdivided into: OIN-1(16 cases), OIN-2 (18 cases), OIN-3 (17 cases), microinvasive OSCC (10 cases), non-metastatic OSCC (22 cases) and metastatic OSCC (16 cases). The tissue eosinophilia was evaluated histologically in slices stained with hematoxylin and eosin.

RESULTS: Eosinophil distribution was associated with diagnosis severity ($p \leq 0.01$). A significant difference was found between OIN-3 or microinvasive OSCC and non-metastatic or metastatic OSCC. Stromal invasion threshold was 7 eos/10 hpf (96.1% specificity and 62.5% sensitivity). Eosinophils were absent in OIN-1; in OIN-2, 2 cases were positive. In OIN-3, 5 cases showed tissue eosinophilia, 4 of which had ≥ 3 eos/hpf or ≥ 7 eos/10 hpf. Three cases were suspected of invasion; 2 had a previous history of OSCC with elevated eosinophil infiltrate. In microinvasive OSCC, the four positive cases presented ≥ 3 eos/hpf and ≥ 7 eos/10 hpf. Although not significantly different, non-metastatic invasive OSCC had a higher number of cases (68.2%) with ≥ 22 eos/10hpf contrasting with 50% in metastatic OSCC.

CONCLUSIONS: Our results suggest that eosinophils can be considered an indicator of invasion in OIN, helping in cases of difficult diagnosis.

Keywords: tissue eosinophilia, oral intraepithelial neoplasia (OIN), oral epithelial dysplasia, oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Introduction

Squamous cell carcinoma accounts for over 90% of oral cavity cancers and is considered a major cause of morbidity and mortality worldwide (Warnakulasuriya 2009). In the oral mucosa, abnormal epithelial behaviour can initially be expressed as oral intraepithelial neoplasia (OIN) or epithelial dysplasia and progress to a fully established squamous cell carcinoma with minimal invasion (microinvasive SCC) or more advanced invasive squamous cell carcinoma (SCC). These lesions are frequently associated with an inflammatory infiltrate which include B cells, T cells, natural killer-NK, natural killer T-

NKT cells, dendritic cells-DC, macrophages and also eosinophils (Sakkal *et al*, 2016; Martinelli-Kläy *et al*, 2009; Lombardi *et al*, 2008).

Eosinophils are leukocytes mainly implicated in parasitic infections (e.g., helminthic infections) and in allergic diseases. According to the literature, these cells are able to stimulate or downregulate anti-tumour immunity, suggesting an important role in the context of immunity. Under diverse stimuli, the eosinophils may release various proteins such as eosinophil peroxidase (EPO), major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), and eosinophil-derived neurotoxin (EDN), growth factors (TGF- α , TGF- β , GM-CSF), cytokines (IL-8, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-13), leukotrienes, prostaglandin E2 (PGE2). These proteins can cause cell death and the induction of inflammatory symptoms as well as contribute to tumour progression or regulation (Sakkal *et al*, 2016; Martinelli-Kläy *et al*, 2009; Lombardi *et al*, 2008).

Tumor associated tissue eosinophilia (TATE) has been reported in diverse sites (Szalayova *et al*, 2016; Spiegel *et al*, 2002; Spiegel, 2002) including the head and neck region (Bankur *et al*, 2016; Tadbir *et al*, 2009; Said *et al*, 2005; Alrawi *et al*, 2005). Its exact function, however, remains unclear. In OSCC, several studies have shown that eosinophils can be associated with a good prognosis (Debta *et al*, 2016; Dorta *et al*, 2002), but there are other studies showing their association with a poor prognosis (Yellapurkar *et al*, 2016; Alrawi *et al*, 2005) or even having no influence on prognosis (Tadbir *et al*, 2009). In addition, very few studies have examined the presence of eosinophils in OIN and its role in invasion (Kargahi *et al*, 2015; Madhura *et al*, 2015; Jain *et al*, 2014). It is known that the diagnosis of OIN and OSCC is based exclusively on histopathological examination, and sometimes the recognition of a superficial or deep stromal invasion can be difficult to detect. Therefore, the awareness of a supporting feature associated with invasion would contribute to the precise diagnosis.

The aim of this study was to investigate the presence of eosinophils in OIN and OSCC lesions and to determine its relationship with invasion.

Material and Methods

A retrospective study consisted of 99 samples, including excisional and incisional biopsy specimens, from which 51 were diagnosed with OIN and 48 with OSCC. In the OIN group, 25 (49%) were male and 26 (51%) were female. The age ranged from 34 to 87 years (average age of 62.03 years). The most frequently affected region was the tongue

(43.1%) followed by the floor of the mouth (21.6%) and lips (15.7%). In OSCC, out of the 48 patients 32 (66.7%) were male and 16 (33.3%) were female. The age at diagnosis ranged from 39 to 84 years (average age of 62.62 years). The region with the highest incidence of OSCC was the tongue (47.9%) followed by the gingiva (22.9%) and the floor of the mouth (16.7%). A history of tobacco habit and alcohol consumption was collected, however, in several cases there was no accurate information. Details of the study are presented in Table 1.

Table 1- Summary of clinical features of patients with OIN and OSCC

Clinical characteristic	OIN (n=51) n° of patients (%)	OSCC (n=48) n° of patients (%)
Gender		
male	25 (49%)	32 (66.7%)
female	26 (51%)	16 (33.3%)
Age (mean, median, interquartile range)	62.03y; 64y (52-69y)	62.62y; 61y; (56-69y)
Tobacco		
negative	3 (5.9%)	4 (8.3%)
positive	19 (37.2%)	32 (66.7%)
unknown	29 (56.9%)	12 (25%)
Alcohol		
negative	4 (7.8%)	5 (10.4%)
positive	8 (15.7%)	27 (56.2%)
unknown	39 (76.5%)	16 (33.4%)
Location		
tongue	22 (43.1%)	23 (47.9%)
floor of mouth	11 (21.6%)	8 (16.7%)
gingiva	3 (5.9%)	11 (22.9%)
lip	8 (15.7%)	2 (4.2%)
other (buccal mucosa, palate)	7 (13.7%)	4 (8.3%)

The diagnosis was confirmed histologically and the OIN cases were graded according to the system proposed by Küffer and Lombardi (2002) as OIN-1 (mild dysplasia), OIN-2 (moderate dysplasia) and OIN-3 (severe dysplasia/carcinoma in situ). Independently of the tumor grade, the OSCC cases were separated into 2 groups: non-metastatic OSCC and metastatic OSCC. Regional metastasis was confirmed histologically by the presence of neoplastic cells in the lymph nodes. The samples were provided from the archives of the Department of Pathology, School of Medicine of Ribeirão Preto. The Ethical Committee of the University of São Paulo - USP, Brazil approved the protocol (n° 4012/2007). The samples selected were subdivided into 6 groups: OIN-1 (16 cases), OIN-2 (18 cases), OIN-3 (17 cases in total; 3 of them had a suspicion of invasion), microinvasive OSCC

(10 cases), non-metastatic OSCC (22 cases) and metastatic OSCC (16 cases). OSCC cases with ≤ 2 mm invasion were designated microinvasive carcinomas and grouped separately for the tissue eosinophilia to be more precisely analysed. In all cases of OIN-3 and microinvasive OSCC, serial sectioning was performed to exclude the presence of any invasive carcinoma.

Eosinophil quantification

The samples were cut into 4- μ m-thick sections and stained with hematoxylin and eosin. Eosinophils were evaluated histologically by 2 different oral pathologists (CPM, TL). Only cells with eosinophilic cytoplasmic granules were considered eosinophils. In an extensive necrotic area, eosinophils located within the blood vessels as well as red blood cells overlying inflammatory cells were excluded from the analysis. Ten microscopic fields per specimen were selected by using microscopy with 25-squares grid reticule, covering a total of 0.0576mm² per high-power field (hpf), under x400 magnification. For the first area (eos/hpf), a field was selected with the highest number of eosinophils followed by an additional nine hpfs in the contiguous areas (eos/10hpf, total area of 0.576mm²). Invasive OSCC (non-metastatic and metastatic) presented several positive cases of eosinophils and their distribution was mainly diffuse rather than focal. There was a variation between zero and 226 eos/10hpf and an average of 47.7 eos/10hpf for non-metastatic OSCC and 42.1 eos/10hpf for metastatic OSCC. Therefore, the table was categorized as: negative; 1-4 eos/10hpf; 5-10 eos/10 hpf; 11-21 eos/10hpf; 22-45 eos/10hpf and 46-89 eos/10hpf and ≥ 90 eos/10hpf.

Statistical analysis

The distribution of eosinophils (eos/10 hpf) in the OIN-1, OIN-2, OIN-3, microinvasive OSCC, non-metastatic OSCC and metastatic OSCC groups was analysed by Boxplot. The results of eosinophils within each group did not follow a normal distribution. The eosinophil count was then analysed using a Kruskal-Wallis test and differences were identified using a Mann-Whitney test. The predictive value of eos/10hpf in assessing invasion was demonstrated by receiver operating characteristic-curve (ROC-curve). Statistical analysis was performed using R software v. 3.3.2. (R foundation, Vienna, Austria) and IBM SPSS statistic v. 24. Statistical significance was set at $p < 0.05$ throughout the study.

Results

The distribution of eosinophils per 10hpf was significantly associated with the severity of the diagnosis ($p < 0.01$; Figure 1). In OIN, the tissue eosinophilia was limited to connective tissue in 100% of the cases, whereas in microinvasive (2 of the 4 positive cases of eosinophils) and invasive OSCC (17 of the 34 positive cases of eosinophils), the presence of intraepithelial eosinophils was also observed in 50% of the cases (Figure 2). No eosinophils were observed in the OIN-1 group while in the OIN-2 group, only 2 (11.11%) positive cases were found; 1 case presented 1 eosinophil/10hpf and the other 3 eos/10hpf (Table 2). In the OIN-3 group, 5 (29.41%) of the 17 cases showed tissue eosinophilia, 3 of them were suspected of invasion and two of the 3 cases had a previous history of OSCC. In these 3 cases suspected of invasion, 26 eos/10hpf (case 3 showing previous history of OSCC), 16 eos/10hpf (case 4 also with previous history of OSCC) and 7 eos/10hpf (case 5) were observed. The other 2 cases presented 1 eos/10hpf (case 1) and 7 eos/10hpf (case 2). There was no statistical difference between the OIN-2 and OIN-3 groups (Table 2; Figure 1). For microinvasive OSCC, despite having more cases (40%) than the OIN-3 group (29.41%), the eosinophil count was not statistically different. Four of the 10 cases were positive for eosinophils and presented ≥ 7 eos/10hpf (Table 2; Figure 1). The threshold for good sensitivity and specificity for the stromal invasion was 7 eos/10hpf, with 96.1% specificity and 62.5% sensitivity. The ROC curve showed a good prediction with an area under curve (AUC) of 0.87 (Figure 3).

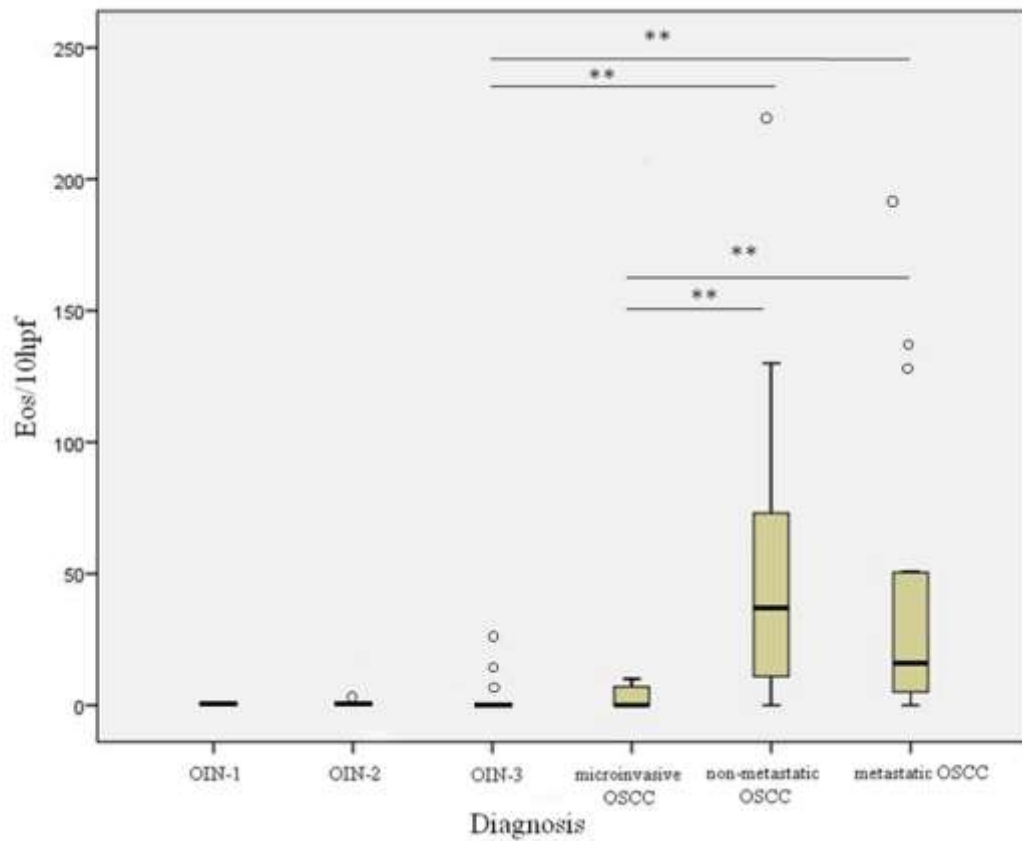


Figure 1- Boxplot showing the distribution of eosinophils per 10hpf in the different groups. Statistical difference ($p < 0.01$ **) is observed between groups OIN-3 and non-metastatic OSCC; OIN-3 and metastatic OSCC; microinvasive OSCC and non-metastatic OSCC; microinvasive OSCC and metastatic OSCC.

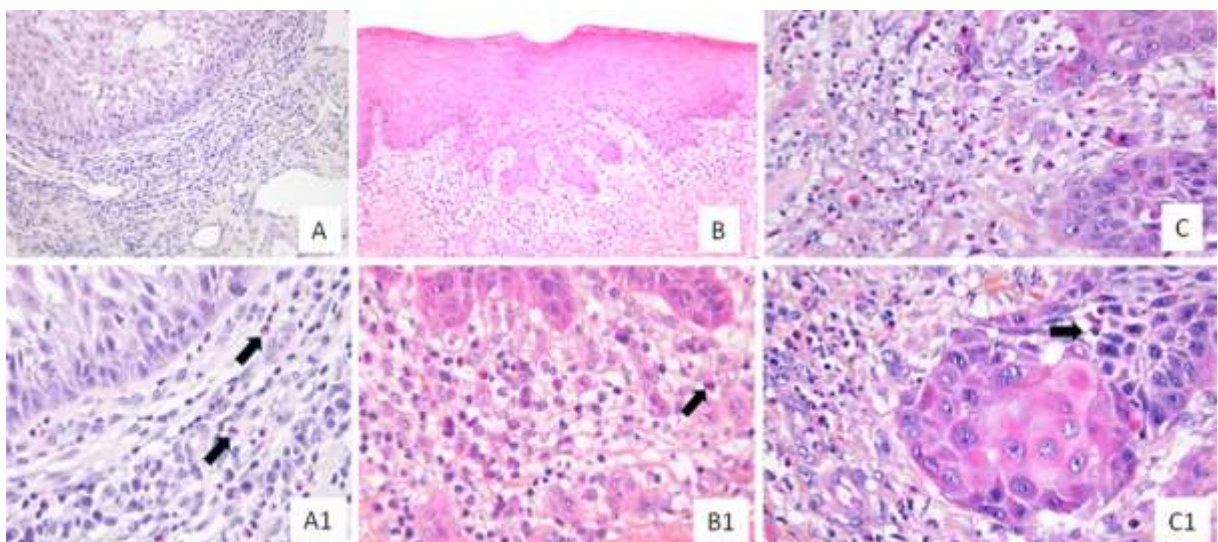


Figure 2- Histological views showing tissue eosinophilia (arrows) in OIN-3 (A, A1), microinvasive OSCC (B, B1) and invasive OSCC (C, C1). In OIN-3 (A, A1), the tissue eosinophilia is limited to connective tissue, whereas in OSCC (C, C1), the presence of intraepithelial eosinophils is also observed. A1,B1,C, C1 (HES, x40); A, B (HES, x10).

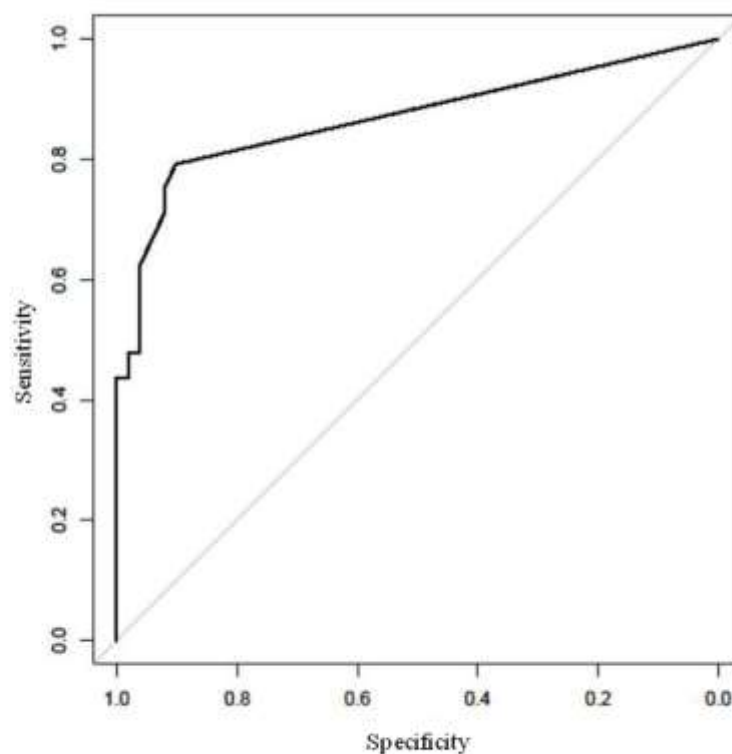


Figure 3- The ROC curve shows a good prediction with an area under curve (AUC) of 0.87. The threshold for sensitivity and specificity for the stromal invasion is 7 eos/10hpf, with 96.1% specificity and 62.5% sensitivity.

As the microinvasive or invasive foci may be restricted to a microscopic area, the eosinophil count per hpf was also analysed in OIN and microinvasive OSCC (Table 2). The OIN-2 group had 2 cases with only 1 eos/hpf. Four of the 5 positive cases in the OIN-3 group had ≥ 3 eos/hpf, 3 cases of which were suspected of invasion and presented 8 eos/hpf (case 3 showing previous history of OSCC), 7 eos/hpf, (case 4 also with previous history of OSCC) and 3 eos/hpf (case 5). The 2 other cases showed 1 eos/hpf (case 1) and 4 eos/hpf (case 2). In microinvasive OSCC, the 4 positive cases of eosinophils presented ≥ 3 eos/hpf. There was no statistical difference between the groups OIN-2, OIN-3 and microinvasive OSCC.

Table 2- Analysis of eosinophils (eos/10hpf and eos/hpf) in OIN and microinvasive OSCC

	positive cases	percentage (%)	eos/10hpf	mean (eos/10hpf)	eos/hp f	mean	invasion of tumour cells
OIN-1 (n=16)	0	0	0	0	0	0	0
OIN-2 (n=18)	case 1 case 2	11.11%	1 3	0.22	1 1	0.11	0
OIN-3 (n=17)	case 1 case 2 case 3 case 4 case 5	29.41%	1 7 26 16 7	3.29	1 4 8 7 3	1.29	No no suspected † suspected † suspected
microinvasive OSCC (n=10)	case 1 case 2 case 3 case 4	40%	10 7 7 8	3	4 3 3 3	1.3	yes yes yes yes

Eos/10hpf: for each specimen, one high power field (microscopy with 25-square grid reticule, under x400 magnification covering a total of 0.0576mm² per hpf) with a maximum number of eosinophils in the lesion area and additional nine hpf in the contiguous areas (total 0.576mm²).

† previous history of OSCC

Regarding invasive non-metastatic and metastatic OSCC, a significant increase in tissue eosinophilia (Figure 1) was observed when compared to the microinvasive OSCC or OIN-3 groups ($p < 0.01$). In non-metastatic OSCC, only 3 cases (13.6%) were negative and 15 (68.3%) of the 22 cases presented ≥ 22 eos/10 hpf while the metastatic OSCC group showed 8 (50%) of the 16 cases with ≥ 22 eos/10hpf; only 1 case (6.2%) was negative (Table 3). Although a higher eosinophil count was observed in the non-metastatic OSCC group than in metastatic OSCC, the statistical analysis was not significant (Figure 1). The inflammation ranged from mild to severe. All cases of OIN-3 and microinvasive OSCC positive for eosinophils had moderate/intense inflammation. The same occurred in the metastatic and non-metastatic OSCC groups; 100% and 80% of the non-metastatic and metastatic OSCC cases containing ≥ 22 eos/10hpf presented moderate to intense inflammation respectively (not shown).

Table 3- Analysis of eosinophils (eos/10hpf) in non-metastatic OSCC and metastatic OSCC

	0	1-4	5-10	11-21	22-45	46-89	≥90
non-metastatic OSCC (n=22)	3 (13.6%)	1 (4.5%)	1 (4.5%)	2 (9.1%)	7 (31.9%)	5 (22.7%)	3 (13.7%)
metastatic OSCC (n=16)	1 (6.2%)	3 (18.8%)	4 (25%)	0	3 (18.8%)	2 (12.5%)	3 (18.7%)

Eos/10hpf: for each specimen, one high power field (microscopy with 25-square grid reticule, under x400 magnification covering a total of 0.0576mm² per hpf) with a maximum number of eosinophils in the lesion area and additional nine hpf in the contiguous areas (total 0.576mm²).

Discussion

Very few studies have examined the presence of eosinophils in OIN and its relation to invasion but this is the first study that analyses eosinophils in OIN-3, microinvasive and invasive OSCC.

The literature reports a greater eosinophil count in dysplastic oral mucosa than in normal mucosa (Kargahi *et al*, 2015; Madhura *et al*, 2015). According to Madhura *et al* (2015), the mean eosinophil count was significantly higher in a severe grade of oral epithelial dysplasia than in moderate and mild epithelial dysplasia. Jain *et al* (2014), however, found no significant difference among the various degrees of oral epithelial dysplasia.

Our study showed that the number of eosinophils was directly proportional to the diagnosis severity ($p < 0.01$; Figure 1) although no statistical differences were observed between groups OIN-2 and OIN-3 (Figure 1). A certain disagreement regarding the number of eosinophils found in the different degrees of oral epithelial dysplasia has been demonstrated in the literature. Jain *et al* (2014) related a mean of eosinophils count in mild, moderate and severe dysplasia of 2.117, 2.850, 2.325 eos/10hpf, respectively, while Kargahi *et al* (2015) found 1.14, 2.85 and 8.2 eos/10hpf and Madhura *et al* (2015), had a mean of eosinophil count of 1.05, 2.71 and 6.4 eos/10hpf. In the present study, no eosinophils were observed in OIN-1. In OIN-2, only 2 cases were positive with a mean of 0.22 eos/10hpf (Table 2). In OIN-3, the mean of eosinophil count was 3.29 eos/10hpf. These differences may either be related to selection criteria of the cases or to the different methodology used for eosinophils count.

The optimum predictive value associated with invasion found in our study was 7 eos/10hpf (96.1% specificity and 62.5% sensitivity). Kargahi *et al* (2005), however, found that >15 eos/10hpf (sensitivity 61.9% and specificity 5.3%) was the threshold

number between oral dysplastic lesion and SCC. In the larynx (Said *et al*, 2005; Alrawi *et al*, 2005), the thresholds >10 eos/hpf or >20 eos/10hpf were significantly associated with invasion. We found that most cases of invasive carcinoma presented more than 22 eos/10hpf (Table 3). Studies performed in the vulva (Spiegel, 2002) showed >3 eos/hpf or ≥ 5 eos/10hpf were both significantly associated with invasion of squamous intraepithelial neoplasia. In cervical squamous neoplastic lesions (Spiegel *et al*, 2002), the presence of ≥ 5 eos/hpf and/or ≥ 10 eos/10hpf, supported the evidence for invasion, although >3 eos/hpf still retained its predictive values for invasion. Similarly, in our study, 4 out of the 5 OIN-3 positive cases presented ≥ 3 eos/hpf or ≥ 7 eos/10hpf, 3 of which were suspected of invasion. Two of these 3 cases had an increased eosinophil count (7 eos/hpf or 16 eos/10hpf and 8 eos/hpf or 26 eos/10hpf; Table 2) and were associated with a previous history of OSCC. These data may reinforce the relation between the eosinophils and the stromal invasion. Said *et al* (2005) found that a high grade dysplasia cases with elevated eosinophil infiltrate actually represent an invasive carcinoma.

Although the microinvasive OSCC already has an invasive behavior, the eosinophil count in our study was similar to the OIN-3 group (≥ 3 eos/hpf or ≥ 7 eos/10hpf; Table 2). In the only 2 cases of cervical microinvasive SCC reported by Spiegel *et al* (2002), 1 had 1-4 eos/hpf or 1-9 eos/10hpf and the other ≥ 5 eos/hpf or ≥ 10 eos/10hpf. Eosinophil count we found in OIN-3 hence may be indicative of tumor invasion prompting for tissue serial sectioning.

Another important finding in our study was the presence of eosinophils not only in the connective tissue as observed in OIN-3, but within epithelial tissue in microinvasive and invasive OSCC. This may in some cases be an auxiliary factor in the distinction between OIN-3 and microinvasive OSCC. The literature shows the presence of eosinophils within malignant epithelial islands in invasive SCC (Spiegel, 2002; Dorta *et al*, 2002).

With regard to invasive carcinoma, our study showed a significant increase of tissue eosinophilia between the OIN-3 or microinvasive OSCC groups and the invasive OSCC group (Figure 1) which is in agreement with the findings in the literature that correlate eosinophils to tumor invasion (Bankur *et al*, 2016; Debta *et al*, 2016; Tostes *et al*, 2009; Falconieri *et al*, 2008). Interestingly, the non-metastatic OSCC group showed a greater eosinophil count than the metastatic OSCC group although not significantly different. A similar outcome was reported by Jain *et al* (2014), who found a significantly higher

eosinophil count in non-metastatic than in metastatic OSCC suggesting a good prognostic role in OSCC.

In head & neck SCC, it has been shown that cases with a Th1 response is mainly associated with a better prognosis than those with the Th2 response (Dasgupta *et al*, 2006). According to Argarwal *et al* (2003), early stage OSCC expressed mainly INF- γ and IL-2 genes (Th1 response), whereas the advanced stage tumors exhibited IL-4 and IL-10 expression (Th2 response). However, Th2 response may also eliminate the cancer through eosinophils and macrophages. Furthermore, eosinophils may secrete a number of cytokines, including those associated with Th1 cells (INF- γ , TNF- α , IL-8) and Th2 cells such as, IL-4, IL-5 (Sakkal *et al*, 2016; Martinelli-Kl ay *et al*, 2009; Lombardi *et al*, 2008; Nishimura *et al*, 1999). IL-5 transgenic mice presented attenuated growth of fibrosarcoma induced by methylcholanthrene (Simson *et al*, 2007). Activated eosinophils inhibited DU 145 and PC-3 prostate tumour cell growth in vitro (Furbert-Harris *et al*, 2003) and in the OSCC cell line (SCC-9), the growth inhibition was correlated with eosinophil peroxidase activity (Davoine *et al*, 2013).

The results obtained in this study suggest that the presence of eosinophils in OIN can be an indicator of invasion contributing to diagnosis, especially in small biopsies or difficult cases. Further studies on eosinophils as well as their state of activation are necessary in order to elucidate their role in the mechanism of carcinomatous invasion.

Acknowledgements

The authors greatly thank technicians Ana Maria da Rocha, Eliane Dubois, Claire Herrmann, Maria Angela Fonseca and Dr. Philippe Mojon for their valuable contributions.

Disclosure Statement

There are no competing conflicts of interest.

References

Agarwal A., Rani M., Saha G. K., Valarmathi T. M., Bahadur S., Mohanti B. K., & Das S. N. (2003). Disregulated expression of the Th2 cytokine gene in patients with intraoral squamous cell carcinoma. *Immunol Invest*, **32**:17-30.

Alrawi S. J., Tan D., Stoler D. L., Dayton M., Anderson G. R., Mojica P., ... Loree T. (2005). Tissue eosinophilic infiltration: a useful marker for assessing stromal invasion, survival and locoregional recurrence in head and neck squamous. neoplasia. *Cancer J*, **11**:217-225.

Bankur R., Rodrigues C., Anjaly D., Gopinathan P. A., & Bankur P. K. (2016). Quantitative analysis of tumor-associated tissue eosinophilia in different histological grades of oral squamous cell carcinoma. *Indian J Dent Res*, **27**:463-467.

Dasgupta S., Bhattacharya-Chatterjee M., O'Malley B. W. Jr, & Chatterjee S. K. (2006). Recombinant vaccinia virus expressing interleukin-2 invokes anti-tumor cellular immunity in an orthotopic murine model of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Ther*, **13**:183-193.

Davoine F., Sim A., Tang C., Fisher S., Ethier C., Puttagunta L., ... Moqbel R. (2013). Eosinophils in human oral squamous carcinoma; role of prostaglandin D2. *J Inflamm*, **10**:4.

Debta P., Debta F. M., Chaudhary M., & Bussari S. (2016). Evaluation of myeloid cells (tumor-associated tissue eosinophils and mast cells) infiltration in different grades of oral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Paediatr Oncol*, **37**:158-167.

Dorta R. G., Landman G., Kowalski L. P., Lauris J. R., Latorre M. R., & Oliveira D. T. (2002). Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology*, **41**:152-157.

Falconieri G., Luna M. A., Pizzolitto S., DeMaglio G., Angione V., & Rocco M. (2008). Eosinophil-rich squamous carcinoma of the oral cavity: a study of 13 cases and delineation of a possible new microscopic entity. *Ann Diagn Pathol*, **12**:322-327.

Furbert-Harris P., Parish-Gause D., Laniyan I., Hunter K. A., Okomo-Awich J., Vaughn T. R. ... Oredipe OA. (2003). Inhibition of prostate cancer cell growth by activated eosinophils. *Prostate*, **57**:165-175.

- Jain M., Kasetty S., Sudheendra U. S., Tijare M., Khan S., & Desai A. (2014). Assessment of tissue eosinophilia as a prognosticator in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma-an image analysis study. *Patholog Res Int*, **2014**:507512.
- Kargahi N., Razavi S.M., Deyhimi P., & Homayouni S. (2015). Homayouni S. Comparative evaluation of eosinophils in normal mucosa, dysplastic mucosa and oral squamous cell carcinoma with hematoxylin-eosin, Congo red, and EMR1 immunohistochemical staining techniques. *Electron Physician*, **7**:1019-1026.
- Küffer R. & Lombardi T. (2002). Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). *Oral Oncol.* **38**:125-130.
- Lombardi T., Martinelli-Kläy C. P., Woolgar J. A. & Mendis B. R. (2008). The significance of eosinophils in oral and head & neck cancer (squamous cell carcinoma). *Res Adv in Dental Res*, 17-27.
- Madhura M. G., Gajalakshmi S., Kumar B. V., Suma S., Sarita Y. & Shweta R. D. (2015). Suma S, Sarita Y, Shweta RD. Role of tissue eosinophils in oral Leukoplakia: A pilot study. *J Oral Maxillofac Pathol*, **19**:286-290.
- Martinelli-Kläy C. P., Mendis B. R. & Lombardi T. (2009). Eosinophils and oral squamous cell carcinoma: a short review. *J Oncol*, 310132.
- Nishimura T., Iwakabe K., Sekimoto M., Ohmi Y., Yahata T., Nakui M., ... Ohta A. (1999). Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med*, **190**:617-627.
- Said M., Wiseman S., Yang J., Alrawi S., Douglas W., Cheney R., ... Tan D. (2005). Tissue eosinophilia: a morphologic marker for assessing stromal invasion in laryngeal squamous neoplasms. *BMC Clin Pathol*, **5**:1-8.
- Sakkal S., Miller S., Apostolopoulos V. & Nurgali K. (2016). Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable? *Curr Med Chem*, **23**:650-666.

- Simson L., Ellyard J. I., Dent L. A., Matthaei K. I., Rothenberg M. E., Foster P. S., ... Parish CR. (2007). Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J Immunol*, **178**:4222-4229.
- Spiegel G. W., Ashraf M. & Brooks J. J. (2002). Eosinophils as a marker for invasion in cervical squamous neoplastic lesions. *Int J Gynecol Pathol*, **21**:117-124.
- Spiegel G. W. (2002). Eosinophils as a marker for invasion in vulvar squamous neoplastic lesions. *Int J Gynecol Pathol*, **21**:108-116.
- Szalayova G., Ogrodnik A., Spencer B., Wade J., Bunn J., Ambaye A., ... Rincon M. (2016). Human breast cancer biopsies induce eosinophil recruitment and enhance adjacent cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat*, **157**:461-474.
- Tadbir A. A., Ashraf M. J. & Sardari Y. (2009). Prognostic significance of stromal eosinophilic infiltration in oral squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg*, **20**:287-289.
- Tostes Oliveira D., Tjioe K. C., Assao A., Sita Faustino S. E., Lopes Carvalho A., Landman G. & Kowalski L.P. (2009). Tissue eosinophilia and its association with tumoral invasion of oral cancer. *Int J Surg Pathol*, **17**:244-249.
- Yellapurkar S., Natarajan S., Boaz K., Baliga M., Shetty P., Manaktala N., Prasad M. & Ravi M. (2016). Tumour-Associated Tissue Eosinophilia in Oral Squamous Cell Carcinoma- A Boon or a Bane? *J Clin Diagn Res*, **10**:ZC65-68.