



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Alexandre Augusto Sarto Dominguetto

**Invasão perineural e correlação com sobrevida em carcinomas
espinocelulares orais**

Araraquara

2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Alexandre Augusto Sarto Dominguetto

**Invasão perineural e correlação com sobrevida em carcinomas
espinocelulares orais**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas, na Área de Diagnóstico e Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

Araraquara

2023

D671i	Dominguette, Alexandre Augusto Sarto Invasão perineural e correlação com sobrevida em carcinomas espinocelulares orais / Alexandre Augusto Sarto Dominguette. -- Araraquara, 2023 65 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade 1. Carcinoma de Células Escamosas. 2. Imuno-Histoquímica. 3. Proteínas S100. 4. Análise de Sobrevida. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Alexandre Augusto Sarto Dominguette

**Invasão perineural e correlação com sobrevida em carcinomas
espinocelulares orais**

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências Odontológicas

Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato

Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior

Profa. Dra. Patricia Peres Lucif Pereira

Prof. Dr. Matheus Henrique Lopes Dominguette

Araraquara, 06 de fevereiro de 2023.
(data da defesa)

DADOS CURRICULARES

Alexandre Augusto Sarto Dominguette

NASCIMENTO: 26 de setembro de 1988, Varginha, Minas Gerais.

FILIAÇÃO: Luiz Antonio Dominguette e Aparecida de Fátima Sarto Dominguette

2008 - 2011: Graduação em Odontologia pela Universidade Vale do Rio Verde – UninCor

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rabelo Ribeiro

Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

2012 - 2014: Mestrado em Clínica Odontológica, na área de Diagnóstico Bucal, pela Universidade Vale do Rio Verde – UninCor

Orientador: Prof. Dr. Tufi Neder Meyer

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

2014 - 2015: Especialização em Implantodontia pela Associação Brasileira de Odontologia de Minas Gerais – ABO-MG

2013 - 2016: Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial pela Faculdade São Leopoldo Mandic

2018 – 2022: Doutorando em Ciências Odontológicas, na área de Diagnóstico e Cirurgia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FOAr/UNESP

Orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

Dedico essa pesquisa a todos os pacientes acometidos pelo câncer oral.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Luiz Antonio** e **Fátima**, por todo amor, dedicação e apoio durante toda minha fase de estudos acadêmicos,

À minha esposa **Gisele**, pelo carinho e paciência, sempre incentivando minha evolução profissional,

Ao **Luiz Antonio, Pâmella, Pedro e Miguel**, pela ajuda incondicional durante toda a vida,

Ao meu orientador Prof. Dr. **Cleverton Roberto de Andrade**, pessoa digna onde atua, excelente pesquisador e profissional, por me ensinar tanto sobre a ciência e me dar conselhos que transcendem a carreira profissional, que levarei para toda vida,

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. **Edson Alves de Campos** e de sua vice-diretora Profa. Dra. **Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia**, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa,

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, na pessoa da coordenadora do programa Profa. Dra. **Andreia Bufalino**, por todo zelo e comprometimento com seus alunos e funcionários,

A todos os professores da pós-graduação da FOAr-UNESP, que num momento delicado de pandemia, souberam passar com maestria toda informação proposta aos alunos,

Aos meus colegas da pós-graduação, pela ajuda e ensinamentos passados,

A secretaria da pós-graduação, em especial ao **Cristiano Afonso Lamounier**, por toda ajuda nessa difícil e extensa caminhada da pós-graduação,

A Fundação Hospitalar do Município de Varginha (FHOMUV) – Hospital Bom Pastor, em especial ao Dr. **Ítalo Denelle Venturelli** que nos proporcionou a realização dessa pesquisa,

Ao Setor de Oncologia do Hospital Bom Pastor de Varginha-MG, em especial aos pacientes e funcionários,

Ao SAME - Serviço de Arquivo Médico do Hospital Bom Pastor de Varginha-MG, em especial a **Bruna Naiara da Silva**,

Ao IPD Laboratórios - Instituto de Prevenção e Diagnóstico J. Janinni de Varginha-MG, em especial a **Karen Bueno**,

A **Maria Clara Avila de Oliveira**, por toda ajuda e comprometimento nesse trabalho,

Ao **Pedro Sergio Simoes**, pela ajuda na confecção das lâminas histológicas,

A **Ana Claudia Couto de Abreu**, pela ajuda na análise estatística dos resultados,

Ao Prof. Dr. **Matheus Henrique Lopes Domingute**, pela amizade e companheirismo nessa pesquisa,

A Profa. Dra. **Patricia Peres Lucif Pereira**, pelo acolhimento como professora e pela amizade, hoje como colega de profissão,

Ao Prof. Dr. **José Carlos Rabelo Ribeiro**, por ter me inserido na pesquisa odontológica ainda na graduação, além de grande amigo e profissional,

Ao Prof. Dr. **João Gustavo Rabelo Ribeiro**, por ser exemplo de profissionalismo na Odontologia, e pelo incentivo em realizar a pós-graduação nessa instituição,

Aos colegas de profissão Prof. Dr. **Bruno Henrique Figueiredo Matos** e Prof. Ms. **Paulo Roberto Domingute**, por toda ajuda em minha caminhada profissional,

Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente dessa pesquisa

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer*

*Schopenhauer A. Parerga und Paralipomena. Alemanha: Cambridge University Press; 1851.

Dominguette AAS. Invasão perineural e correlação com sobrevida em carcinomas espinocelulares orais [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

O prognóstico de pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) oral é afetado por muitos fatores, sendo crítico na decisão de quais tratamentos serão instituídos. Dentre esses fatores destacam-se o estadiamento clínico e histopatológico, o tipo histológico, e a presença de invasão perineural (PNI), embora seja controversa. O objetivo dessa pesquisa foi verificar a correlação entre PNI e dados clínico-patológicos de pacientes diagnosticados com CEC oral tratados no Hospital Bom Pastor (Varginha-MG [2004 a 2014]). PNI foi avaliada a partir de laudos histopatológicos e por meio de análise histopatológica revisional utilizando-se a coloração de hematoxilina e eosina (H&E) e o anticorpo contra S100. Com os dados coletados e as novas análises realizadas, foi efetuado teste de Qui-quadrado (análise univariada) e regressão logística (análise multivariada). A taxa de sobrevida e o teste log-rank foram calculados pelo método de Kaplan-Meier. Os dados iniciais foram obtidos de 310 pacientes, havendo forte predomínio masculino (78,7%) e idade média de 60,1 anos. A língua foi a região mais prevalente (40,3%). Os tumores moderadamente diferenciados somaram 52,2%. Os estádios IV (54,5%) e III (21,6%) predominaram. A radioterapia associada a quimioterapia foi o tratamento predominante (33,5%). Pacientes com menores taxas de sobrevida apresentaram maiores percentuais de PNI, cerca de 11,4%. Obtivemos 39 peças em parafina que foram cortadas e coradas em H&E e realizadas as imuno-histoquímicas para S100 e Ki67. Nesta nova análise, sete casos foram positivos para PNI utilizando a coloração de H&E (17,9%), aumentando para 20 (51,2%) casos com ajuda de imuno-histoquímica pra S100 ($p=0,004$). O PNI-S100 intraneural foi o tipo mais prevalente ($n = 9$), seguida do envolvimento total do nervo ($n=8$). Todos os pacientes com idade inferior a 50 anos foram PNI-S100 positivos. Pacientes fumantes+etilistas representaram 80,0% de todos os casos PNI-S100 positivos. Os tumores N0 e M0 representaram a maioria dos casos positivos para PNI-S100. Todos os casos PNI-S100 positivos com recorrência locorregional apresentaram invasão intraneural ($p=0,001$). Pacientes fumantes+etilistas tem 2 vezes mais chances de apresentar PNI-S100. Portanto, pudemos concluir que o uso da imuno-histoquímica para S100 melhora a acurácia diagnóstica de PNI, reduzindo os erros alfa e beta. PNI-S100 intraneural é preditiva de recidiva locorregional no CEC oral.

Palavras chave: Carcinoma de Células Escamosas. Imuno-Histoquímica. Proteínas S100. Análise de Sobrevida.

Dominguette AAS. Perineural invasion and correlation with survival in oral squamous cell carcinoma [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

The prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) is affected by many factors, all of which are critical in deciding which treatments to apply. Among these factors, those that stand out are the clinical and histopathological staging, the histological type, and the presence of perineural invasion (PNI), though this is controversial. The objective of this research was to verify the correlation between PNI and clinicopathological data of patients diagnosed with OSCC treated at Bom Pastor Hospital (Varginha-MG [2004 to 2014]). PNI was evaluated by histopathological reports and through revised histopathological analysis using hematoxylin and eosin (H&E) staining and the antibody against S100. After collecting the data and performing the new analyzes, we performed the Chi-square test (univariate analysis) and logistic regression (multivariate analysis). Survival rate and log-rank test were calculated using the Kaplan-Meier method. Initial data were obtained from 310 patients, who were predominantly male (78.7%) with a mean age of 60.1 years. The tongue was found to be the most prevalent region (40.3%), and moderately differentiated tumors accounted for 52.2%. Stages IV (54.5%) and III (21.6%) predominated. Radiotherapy associated with chemotherapy was the most common treatment (33.5%). Patients with lower survival rates had higher percentages of PNI, around 11.4%. We obtained 39 samples in paraffin that were cut and stained in H&E, and immunohistochemistry for S100 and Ki67 was performed. In this new analysis, seven cases were positive for PNI using H&E staining (17.9%), increasing to 20 (51.2%) cases with the use of immunohistochemistry for S100 ($p=0.004$). Intraneural PNI-S100 was the most prevalent type ($n=9$), followed by total nerve involvement ($n=8$). All patients younger than 50 years old were PNI-S100 positive. Patients who were smokers & alcoholics represented 80.0% of all PNI-S100 positive cases. N0 and M0 tumors represented the majority of positive cases for PNI-S100. All PNI-S100 positive cases with locoregional recurrence showed intraneural invasion ($p=0.001$). Smokers & alcoholics are 2 times more likely to present PNI-S100. Therefore, we can conclude that the use of immunohistochemistry for S100 improves the diagnostic accuracy of PNI, reducing alpha and beta errors. Intraneural PNI-S100 predicts locoregional recurrence in OSCC.

Keywords: Carcinoma, Squamous Cell. Immunohistochemistry. S100 Proteins. Survival Analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAM	Membrana Corioalantóica
CEC	Carcinoma Espinocelular
CSF-1	Fator Estimulante de Colônia 1
DAB	Diaminobenzidina
DRG	Gânglio da Raiz Dorsal
FHOMUV	Fundação Hospitalar do Município de Varginha
GAL	Receptor de Galanina
GalR2	Receptor de Galanina 2
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
H&E	Hematoxilina e Eosina
HPV	Papilomavirus Humano
HRP	Peroxidase de Rábano Silvestre
LVI	Invasão Linfovascular
PNI	Perineural Invasion
Rxt	Radioterapia
SUS	Sistema Único de Saúde
TIF	Tumor Invasion Front
Qxt	Quimioterapia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Descrição microscópica de PNI.....	32
Figura 2 - Análise histológica de PNI (H&E e S100).....	43
Figura 3 - Análise histológica tumoral (Ki67).....	54
Gráfico 1 - Sobrevida global.....	39
Gráfico 2 - Sobrevida (localização).....	39
Gráfico 3 - Sobrevida (estadiamento).....	40
Gráfico 4 - Sobrevida (tamanho).....	40
Gráfico 5 - Sobrevida (metástase linfonodal).....	41
Gráfico 6 - Sobrevida (tratamento).....	41
Gráfico 7 - Sobrevida (PNI).....	42
Gráfico 8 - Probabilidade de PNI (S100+).....	50
Gráfico 9 - Probabilidade de invasão linfovascular.....	51
Gráfico 10 - Probabilidade de recidiva locorregional.....	53
Gráfico 11 - Probabilidade de metástase linfonodal.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise descritiva das características clínicas e patológicas relacionadas a PNI (n = 310)	35
Tabela 2 - Grau histológico dos tumores relacionados com PNI	36
Tabela 3 - Tratamentos realizados e sua relação com PNI	36
Tabela 4 - Análise descritiva das características clínicas e patológicas relacionadas a sobrevida (n = 128)	37
Tabela 5 - Relação entre PNI, recidiva locorregional e metástase linfonodal com características clínico-patológicas (n = 39)	45
Tabela 6 - Relação entre PNI, recidiva locorregional e metástase linfonodal com características histopatológicas (n = 39)	47
Tabela 7 - Comparação entre análise de PNI em H&E e por imuno-histoquímica com anti-S100	48
Tabela 8 - Caracterização dos pacientes com PNI (S100+) segundo o tipo de invasão (n = 20)	49
Tabela 9 - Análise multivariada para identificação dos fatores associados ao resultado de PNI (S100+) (n = 39)	50
Tabela 10 - Análise multivariada para identificação dos fatores associados a LVI (n = 39)	51
Tabela 11 - Análise multivariada para identificação dos fatores associados à recidiva locorregional (n = 39)	52
Tabela 12 - Análise multivariada para identificação dos fatores associados à metástase linfonodal (n = 39)	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 PROPOSIÇÃO	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Definição de PNI	20
3.2 Patogênese de PNI	21
3.3 Incidência de PNI no CEC Oral.....	23
3.4 Desfechos Relacionados a PNI	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Enfoque Metodológico da Investigação.....	28
4.2 Tipo de Estudo	28
4.3 Amostra	28
4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão	28
4.4.1 Inclusão	28
4.4.2 Exclusão	29
4.5 Coleta de Dados	29
4.6 Análise Histopatológica	30
4.6.1 Imuno-histoquímica	30
4.6.2 Definição de PNI e anticorpos.....	31
4.7 Análise Estatística.....	31
5 RESULTADO	34
5.1 Análise de Sobrevida	36
5.2 Análise Histopatológica	42
5.2.1 PNI.....	42
5.2.2 Recidiva locorregional e metástase linfonodal	51
6 DISCUSSÃO	55

7 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXO	65

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2020, mais de 375.000 casos novos de câncer oral e 175.000 mortes foram registradas no mundo¹, dentre os quais, 95,0% eram carcinoma espinocelular (CEC)².

A sobrevida dos pacientes diagnosticados com CEC de cavidade oral foi relacionada com tumor residual nas margens cirúrgicas, estadiamento, TNM (tamanho, linfonodos e metástase) e invasão vascular³ e, mais recentemente, com a presença de invasão perineural (PNI), que foi associada a tumores agressivos, metástase à distância e menores taxas de sobrevida⁴.

A PNI é descrita como a capacidade das células tumorais de invadir o tecido nervoso⁵. O tumor apresenta essa capacidade devido a interações de sinalização recíprocas entre as células tumorais e componentes nervosos, particularmente as células de Schwann, que colaboram com a migração do câncer pelos nervos⁶. Além disso, o processo de invasão tumoral pode ocorrer ao redor ou através do tecido nervoso⁷. De fato, PNI pode ser considerada quando o tumor envolve mais de 33% ou totalmente a circunferência do nervo, ou ainda atinge o nervo em profundidade, representando a invasão intraneural⁸.

A prevalência de PNI no CEC sempre foi considerada baixa e os primeiros relatos de PNI no CEC oral foram relatados na década de 1980^{7,9,10}. Entretanto, dados recentes demonstraram tumores com PNI com comportamento mais agressivo¹¹⁻¹³, além de maiores taxas de recidiva e mortalidade¹⁴⁻¹⁷. Assim, PNI tem se demonstrado como um novo parâmetro no tratamento dos CECs orais¹⁸ onde a correlação entre PNI e estado clínico ou taxa de sobrevida dos pacientes diagnosticados com CEC oral vem sendo, aos poucos, estabelecida⁴.

Desse modo, dados publicados que relatam diagnóstico de PNI no CEC oral tem suscitado menor sobrevida global e livre da doença em 5 anos, assim como maior taxa de recorrência^{3,19}. De fato, o diagnóstico de PNI parece ser um preditor independente de sobrevida³, especialmente em CECs orais com invasões profundas²⁰. Dados de recidiva locorregional mostraram-se significativos, especialmente quando houve envolvimento de troncos nervosos²¹, demonstrando aumento do risco relativo de recorrências em 1,8 vezes²².

De outra parte, a presença de PNI em tumores iniciais foi associada a menor controle locorregional²³. Tumores em estadiamento I e II com PNI podem apresentar

menores taxas de sobrevida livre de recorrência quando comparados a tumores em estádios III e IV sem PNI¹⁹. Sendo assim, o diagnóstico de PNI pode ser fator importante para a inclusão de terapias adjuvantes no tratamento de CEC oral²⁴.

2 PROPOSIÇÃO

De acordo com os dados encontrados na literatura sobre a presença de PNI nos CECs orais, e os desfechos relacionados a esse tipo de invasão, determinamos os objetivos dessa pesquisa.

2.1 Objetivo Geral

Analisar a presença de PNI nos CECs orais e sua correlação com recidiva locorregional, metástase linfonodal e sobrevida em pacientes tratados no Hospital Bom Pastor - FHOMUV da cidade de Varginha-MG no período de 2004 a 2014, setor de tumores de cabeça e pescoço.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar a incidência de PNI nos CECs orais.
- b) Analisar a acurácia diagnóstica de PNI por meio de duas análises histopatológicas distintas (H&E e imuno-histoquímica com anti-S100).
- c) Verificar o efeito da variável "invasão perineural" nos desfechos de recidiva locorregional, metástase linfonodal e sobrevida.
- d) Verificar o efeito da variável "escore para Ki67" nos desfechos de recidiva locorregional, metástase linfonodal e sobrevida dos pacientes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O câncer no Brasil é a segunda causa mais frequente de morte, com uma estimativa de 232.000 mortes e 450.000 novos casos diagnosticados a cada ano. Até o ano de 2040, devido ao crescimento e envelhecimento populacional, as estimativas apontam um aumento de 66,0% no número de novos casos e 81,0% nas mortes por câncer no Brasil. Esses dados podem representar aumento significativo nos valores gastos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) com pacientes oncológicos, estimando-se um gasto duas vezes maior no ano de 2040 comparado ao ano de 2018²⁵.

Dentre os vários locais de acometimento, o câncer oral vem se destacando pelo elevado número de novos casos e pela alta taxa de mortalidade. Segundo a *International Agency for Research on Cancer*, para o ano de 2020 estimou-se 377.713 novos casos de câncer oral em todo o mundo, incluindo 177.757 óbitos²⁶. No Brasil, esse tumor aparece como o 5º mais frequente em homens (11,22/100.000)²⁷, se destacando com a maior taxa de incidência entre os países da América do Sul (3,6/100.000)²⁶. No Brasil, a estimativa para cada ano do biênio 2018/2019 foi de 11.200 novos casos, destes 3.990 no estado de São Paulo e 1.440 em Minas Gerais, incluindo 6.455 óbitos no ano de 2018²⁷. Recentemente esse número se mostrou ainda maior, com uma estimativa de 15.190 novos casos para o triênio 2020/2022, sendo 11.180 do gênero masculino²⁸.

Apesar de não existir uma causa isolada e definida para o surgimento do câncer oral, seu perfil epidemiológico é bem estabelecido na literatura, sendo mais frequente em homens, entre a quinta e sétima década de vida, tabagistas, de baixa escolaridade e baixa renda, e acometendo principalmente a língua²⁸. A maioria desses tumores são diagnosticados em estágios mais avançados, como estadiamento III ou IV, e quase todos os casos (96,4%) são representados pelo CEC oral, sendo o tipo histológico mais frequente²⁹.

Recentemente o papilomavirus humano (HPV) foi associado a etiologia dos tumores de cabeça e pescoço sendo incluído no estadiamento de tumores de pescoço. Em 2021, dados globais estimaram que 33,0% dos pacientes com CEC de cavidade oral e orofaringe eram HPV positivos. No entanto, a prevalência varia consideravelmente dependendo da região geográfica, com estimativas variando de 0% a 85%³⁰.

3.1 Definição de PNI

Os nervos periféricos tem em sua estrutura uma bainha nervosa composta por três camadas de tecido. O epineuro envolve o nervo como camada mais externa, sendo composto de tecido conjuntivo denso, fibras colágenas e elastina. Já o perineuro, formado por células endoteliais, funciona como barreira permeável e seletiva³¹. A camada mais interna chama-se endoneuro e reveste as fibras nervosas individuais e as células de Schwann³². A presença do câncer dentro de qualquer uma das três camadas da bainha do nervo constitui PNI³³.

PNI nos tumores vem sendo discutido há bastante tempo na literatura, e suas definições são variadas. Segundo Panizza³⁴, “PNI clínica” também conhecida como disseminação perineural, refere-se à invasão neural capturada por exames de imagem. Em 1985, Batsakis⁷ observou o neurotropismo dos carcinomas de cabeça e pescoço, referindo-se à afinidade que as células tumorais teriam com os nervos. PNI foi descrita como a invasão de células tumorais dentro, ao redor e através dos nervos, podendo ocorrer ao longo dos planos de menor resistência do nervo. Fagan et al.³⁵ propuseram relacionar PNI (analisada histologicamente em coloração H&E) com os desfechos de CECs de 142 pacientes, incluindo o CEC oral. PNI foi definida como células tumorais tocando ou invadindo um nervo. Já Kurtz et al.³⁶ avaliaram o aumento na incidência de PNI e invasão vascular nos CECs orais com o uso de lâminas coradas imunohistoquimicamente com anti-S100 e anti-CD34, e definiram PNI como o envolvimento tumoral do espaço perineural com envolvimento completo ou parcial do nervo.

Em um estudo de revisão sobre PNI, Liebig et al.³⁷ discutiram definições de PNI, incluindo a forma de contato tumor-nervo. Segundo os autores, o achado de células tumorais em contato com o nervo não caracterizaria PNI, podendo ser apenas um foco tumoral na estrutura nervosa. Levando em conta essa observação, Nagakawa et al.³⁸ propuseram que pelo menos 33% da circunferência do nervo deveria estar circundada por células malignas para ser definida como PNI, e que qualquer valor menor a 33% representaria um foco e não invasão. Liebig et al.³⁷ sedimentaram as informações descritas anteriormente, e propuseram a definição de PNI como tumor envolvendo pelo menos 33% de sua circunferência, ou células tumorais dentro de qualquer uma das 3 camadas da bainha do nervo.

Aivazian et al.³⁹ analisaram a presença de PNI em 318 CECs orais, incluindo o tamanho e o número de nervos acometidos, assim como a distância entre nervo e tumor. PNI foi identificada quando as células tumorais eram observadas dentro de qualquer uma das três camadas da bainha do nervo e/ou nas proximidades do nervo, circundando um terço ou mais de sua circunferência. No estudo de Caponio et al.⁴⁰ PNI foi definida de forma intratumoral, peritumoral ou ainda presente nos dois espaços.

Essas definições são consideradas muito amplas e/ou subjetivas para futuras correlações com PNI, e pesquisas recentes tem sugerido definições mais específicas. Em 2015, Amit et al.⁴¹ estudaram a incidência, o padrão de disseminação e a correlação prognóstica de PNI em pacientes com carcinoma adenóide cístico. Para a definição de PNI, os autores diferenciaram dois estágios principais de invasão nervosa: a) invasão perineural - definida como células tumorais encontradas no espaço perineural; b) invasão intraneural - infiltração de células cancerígenas no endoneuro. Já em 2018, Schmitd et al.⁸ publicaram um estudo redefinindo PNI. Casos de CEC oral foram avaliados histologicamente por meio de imunocoloração para S100 e citoqueratina, e PNI foi correlacionada com todas as outras variáveis clínico-patológicas, inclusive sobrevida. PNI então foi definida como a invasão de células tumorais em mais de 33% da circunferência do nervo, totalmente ao redor do nervo, ou de forma intraneural. Além disso, classificaram PNI como unifocal (apenas um nervo acometido) ou multifocal (dois ou mais nervos afetados).

De fato, ainda não existe uma definição clara e objetiva de PNI, inclusive a interpretação microscópica de PNI é discordante mesmo entre os patologistas⁴², e um diagnóstico mais objetivo e amplamente aceitável de PNI poderia direcionar tratamentos mais resolutivos para o CEC oral⁸, melhorando as taxas de sobrevida dessa doença.

3.2 Patogênese de PNI

É evidente que o processo de patogênese de PNI deve ser claro para os pesquisadores, inclusive para uma definição mais precisa e detalhada de PNI. Por muito tempo PNI foi considerada uma extensão das metástases linfáticas, devido à presença de canais linfáticos no interior da camada espinhal. No entanto, a observação de que os canais linfáticos não penetram na camada do epineuro excluiu

essa hipótese^{37,43}. Também foi relatado que os nervos apresentariam baixa resistência a invasão, permitindo células tumorais se espalharem ao longo das bainhas neurais. Uma vez dentro da bainha do nervo, essas células poderiam estar em um ambiente que facilitasse a disseminação⁷. Entretanto, as várias camadas de colágeno e membrana basal que compõem a bainha dos nervos os tornam resistentes, dificultando o acesso pelas células tumorais³⁷, o que contrapõe a afirmação de Batsakis⁷.

Sabe-se que o microambiente nervoso é rico em células de suporte, com importante função na manutenção e apoio das células neuronais. A interação das células tumorais com estas células de suporte pode promover a invasão e disseminação tumoral ao longo dos nervos³³.

Estudo em câncer pancreático publicado por Cavel et al.⁴⁴ demonstrou que macrófagos endoneurais estimulados pelo fator estimulante de colônia 1 (CSF-1), produzem fatores neurotróficos derivados da glia (GDNF) que podem promover PNI. CSF-1 é um fator de crescimento que regula a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células tumorais⁴⁵.

As células de Schwann, importantes na regeneração nervosa e degeneração Walleriana⁴⁶, também foram associadas no processo de PNI. Demir et al.⁴⁷ avaliaram células de Schwann em tumores de pâncreas e cólon. Segundo os autores, essas células proliferam e migram dos nervos lesados em direção as células tumorais malignas, o que não foi observado em tumores benignos.

Além disso, Ayala et al.⁴⁸ trabalharam com cocultura de células de gânglios da raiz dorsal (DRG) de ratos e células de câncer de próstata em uma matriz de Matrigel. Foi observado migração recíproca. As células tumorais migraram na direção dos gânglios, assim como o crescimento de neurites em direção a colônias de células cancerígenas.

Fato também observado com o receptor de galanina 2 (GalR2). O neuropeptídeo galanina (GAL), expresso por nervos periféricos após algum dano⁴⁹, possui três receptores principais, e o GalR2 é conhecido por ter efeitos proliferativos no CEC⁵⁰ e tem sido correlacionado com PNI. Scanlon et al.⁵¹ realizaram estudo sobre o impacto do GalR2 em PNI, no qual células de CEC oral cultivadas com alta expressão de GalR2 foram injetadas em ratos, e os tumores gerados foram analisados imunohistoquimicamente com anti-S100 e citoqueratina. Além disso, desenvolveram um modelo in vivo de PNI demonstrando a neuritogênese tumoral, onde células de

DRG de ratos foram enxertados em membrana corioalantóica (CAM) de embriões de galinha juntamente com células de CEC de cabeça e pescoço. A partir desse modelo, puderam observar que a expressão do GalR2 aumenta significativamente o processo de neuritogênese, e que a invasão de células tumorais em direção ao nervo e o comprimento das neurites foram maiores em tumores com expressão elevada do GalR2. Esses resultados confirmam a interação entre o câncer e os nervos por meio do neuropeptídeo GAL, fornecendo um potencial alvo de tratamento.

Além disso, fatores neurotróficos representados por proteínas que regulam o crescimento e o desenvolvimento dos axônios, assim como a manutenção dos neurônios, também estão presentes no processo de PNI³³. No estudo de Gil et al.⁵² foi verificado que a invasão e migração do câncer pancreático ao longo dos nervos foi guiada por GDNF, e a redução da expressão de GDNF reduziu a invasão nervosa. Além disso, GDNF também induziu maior expressão de metaloproteinases de matriz em CECs orais, promovendo um fenótipo de câncer mais invasivo⁵³.

3.3 Incidência de PNI no CEC Oral

A literatura vem demonstrando diferentes incidências de PNI no CEC de cabeça e pescoço, com valores entre 4,1% a 82,0%. Esses valores podem sofrer influência de diversos fatores, como a localização e tamanho do tumor, o comportamento clínico, o modo de análise de PNI (por revisão de lâminas ou registros de laudos histopatológicos), e ainda o uso de marcações auxiliares diagnósticas (imuno-histoquímica)¹².

Outro ponto a ser discutido é a localização do tumor com PNI. De fato, alguns trabalhos correlacionaram PNI com tumores em locais específicos. Rodolico et al.⁵⁴ realizaram um estudo com 95 CECs de lábio, e PNI foi descrita apenas como ausente ou presente, não especificando os parâmetros de definição de PNI. As peças foram analisadas em coloração H&E e com ajuda de imunocoloração para p27, e 5 (5,2%) tumores apresentaram resultados positivos para PNI, dos quais, 4 (80,0%) pacientes apresentavam linfonodos comprometidos. Já Nair et al.⁵⁵ analisaram a incidência de PNI em uma amostra de 1.400 CECs de língua e mucosa jugal, e desses, 309 (22,0%) foram positivos para PNI, representados por 200 (27,0%) casos em língua e 109 (16,5%) em mucosa jugal. Caponio et al.⁴⁰ revisaram 200 lâminas de CEC de língua em coloração H&E, e mostraram uma incidência de PNI de 40,5% (n=81), no qual 40

(49,4%) PNIs foram observadas dentro do tumor, 19 (23,4%) próxima ao tumor, e 22 (27,1%) acometendo os dois espaços citados.

Pesquisas sem revisão diagnóstica das lâminas, ou sem descrição de forma de diagnóstico de PNI também são encontradas. Liao et al.⁵⁶ realizaram um estudo de CECs (pT1-3N0) de cavidade oral com diagnóstico prévio de PNI em 14,8% dos casos, desses, 92,6% eram do gênero masculino e tinham mais de 40 anos, sendo a língua o local mais acometido (n=41, 60,3%). Spoerl et al.²², em estudo com 493 laudos histopatológicos de rotina, descreveram incidência de 9,7% (n=48) de PNI. A maioria dos pacientes PNI positivos era gênero masculino (70,6%), com idade entre 50 e 69,9 anos (66,9%), etilistas (67,7%) e tabagistas (73,8%). As localizações tumorais predominantes nos casos com PNI foram assoalho de boca (36,7%) e língua (30,0%).

Autores que determinaram a inclusão de tumores com características clínicas e histopatológicas específicas também foram encontrados. Huang et al.⁵⁷ incluíram apenas casos de CEC oral tratados cirurgicamente, com tamanho T1 ou T2, sem nenhuma evidência de envolvimento linfonodal (N0), e com margens patológicas livres. Os casos não foram revisados histopatologicamente e a definição de PNI foi por meio de laudos histológicos. Os autores observaram uma taxa de incidência de PNI de 6,08% (n=9) em 148 casos. Low et al.²³ realizaram estudo com 121 pacientes com CEC de língua ou assoalho de boca, classificados como T1N0, e tratados cirurgicamente. Todas as peças cirúrgicas foram revisadas, e PNI foi encontrada em apenas 5 casos, mostrando uma incidência de 4,1%.

Alguns trabalhos utilizaram apenas a coloração em H&E para revisão ou análise histológica dos tumores. Brandwein-Gensler et al.⁵⁸ realizaram um estudo com 290 casos de CEC oral, e desses 217 (76,0%) eram negativos para PNI. Casos positivos para PNI somaram 72 (24,0%) pacientes, no qual a maioria das invasões neurais (14,0%) aconteceram em nervos menores que 1mm de diâmetro. No estudo de Fagan et al.³⁵, PNI foi encontrada em 74 (52,1%) casos de CEC de cabeça e pescoço analisados, com grande predomínio do gênero masculino (97,3%). O CEC oral e de orofaringe representaram os tumores com maior número de casos PNI positivos somando 40 (54,0%) casos. Aivazian et al.³⁹ revisaram 318 casos de CEC e PNI foi observada em 93 (29,0%) pacientes dos quais foram classificados como unifocais (12,6%) e 53 como multifocais (16,7%).

Pesquisas com metodologias que fazem uso da imuno-histoquímica no diagnóstico de PNI vem demonstrando maiores taxas de incidência de PNI, muitas vezes de forma expressiva. Shen et al.⁵⁹ realizaram estudo em 166 casos de CEC de língua relacionando PNI a outras características clínico-patológicas e sobrevida. Originalmente, 22,0% dos laudos histopatológicos descreviam PNI, após a revisão com no H&E, 39,0% foram diagnosticados com PNI e subiram para 51,0% quando a imuno-histoquímica para S100 foi realizada. Os autores também descreveram PNI mais prevalente em tumores T1 e T2, assim como em tumores bem diferenciados.

Kurtz et al.³⁶ também utilizaram S100 como auxiliar diagnóstico. A presença de PNI e invasão vascular foi identificada em 40 casos de CEC oral. Os autores trouxeram dados dos laudos histopatológicos, da revisão diagnóstica de peças cirúrgicas em H&E e com auxílio da imuno-histoquímica para S100. Os autores descreveram, respectivamente, incidência de PNI de 30,0% (n=12), 60,0% (n=25) e 82,0% (n=33). Tumores moderadamente diferenciados se mostraram com maior número de casos positivos pra PNI, somando 23 (69,9%). Além disso, dentre os CECs de língua (n=18), 17 (94,4%) apresentaram PNI.

Do mesmo modo, Schmitd et al.⁸ analisaram peças cirúrgicas em H&E e com auxílio da imuno-histoquímica para S100. 71 casos de CEC oral foram analisados e a presença de PNI correlacionada com dados clínico-patológicos. Numa primeira análise em H&E, PNI foi observada em 16 (22,5%) casos, já com a imunocoloração para S100 a taxa aumentou para 24 (33,8%).

3.4 Desfechos Relacionados a PNI

Diversos autores têm relatado a presença de PNI como fator associado a tumores mais agressivos e prognósticos desfavoráveis no CEC oral. Vários estudos relacionaram PNI com o aumento de metástases e recidivas locais, além de baixas taxas de sobrevida global e livre da doença em 5 anos, e sintomatologia dolorosa no momento do diagnóstico.

Zanoni et al.³ realizaram estudo retrospectivo incluindo 2.082 CECs orais que receberam tratamento cirúrgico, e analisaram as características tumorais que poderiam impactar na sobrevida desses pacientes. A incidência de PNI foi de 24,0%, e os autores consideram PNI preditor independente para menor sobrevida global e sobrevida livre da doença em 5 anos.

O impacto de PNI na sobrevida pode ser observado mesmo em tumores em estádios iniciais. No estudo de Low et al.²³, apesar da baixa porcentagem de PNI (4,1%), foi observada associação entre menor recorrência nos pacientes sem PNI que também apresentaram maior taxa de sobrevida livre da doença em 5 anos (92,0%) comparada com os pacientes PNI positivos (53,0%).

No estudo de Spoerl et al.²² os valores de sobrevida global e sobrevida livre da doença revelaram significativa redução nos pacientes com PNI. Casos negativos para PNI mostraram sobrevida global e livre da doença em 5 anos de 67,0% e 60,6% respectivamente, enquanto pacientes positivos para PNI apresentaram taxas de 38,8% para sobrevida global e 42,0% para sobrevida livre da doença em 5 anos. O desfecho metástase a distância também mostrou valores estatisticamente significantes, com taxa de 16,6% em pacientes com PNI e 6,8% sem PNI. Ainda sobre valores significantes, PNI foi associada a maior prevalência de metástase linfonodal e LVI. Já casos com recidiva locorregional não apresentaram resultados significantes, representando 15 (31,2%) dos 48 casos diagnosticados com PNI.

Laske et al.¹⁹ observaram diminuição de 30,3% na sobrevida global e 33,3% na sobrevida livre da doença em 5 anos em pacientes que apresentaram PNI no CEC oral. De fato, mesmo em tumores iniciais, com estádios I e II, pacientes PNI positivos apresentaram sobrevida livre de recorrência em 5 anos foi próxima dos 60,0%, enquanto pacientes PNI negativos mostraram taxa de 94,1%.

Subramaniam et al.²⁰ analisaram o efeito de PNI e LVI na sobrevida de 442 pacientes com CEC oral (T1 e T2). PNI foi observada em 30 tumores T1 e 81 tumores T2. Em relação a sobrevida global em 5 anos, pacientes PNI positivos mostraram menores taxas de sobrevida tanto em tumores T1 (75,0%) quanto em tumores T2 (50,0%). Pacientes negativos para PNI mostraram taxas de sobrevida global de 90,0% em T1 e 77,0% em T2.

A presença de PNI dentro ou fora do tumor também mostrou associação com a sobrevida de pacientes com CEC oral. Lee et al.⁶⁰ analisaram 229 tumores positivos para PNI, e 153 pacientes apresentaram PNI intratumoral e 76 fora ou próximo do tumor. Foi observado que pacientes com PNI extratumoral tiveram piores taxas de controle de recorrência locorregional, sobrevida livre da doença e sobrevida global em 5 anos, comparado aos casos com PNI intratumoral.

Em 2020, Alkhadar et al.¹¹ observaram incidência de PNI de 17,4% (n=75) em 430 casos de CEC oral. Os autores observaram diferença significativa na análise de

presença de dor, e 35 (46,0%) dos 75 casos PNI positivos apresentavam história de dor no momento do diagnóstico, enquanto apenas 12,0% dos casos PNI negativos apresentavam dor. Casos positivos para PNI também mostraram maior prevalência de envolvimento linfonodal e LVI pelas células tumorais, e foram associados com baixa taxas de sobrevida livre da doença no CEC oral.

Aivazian et al.³⁹ relacionaram o tamanho e quantidade dos nervos acometidos com desfechos do CEC oral. Pacientes com PNI multifocal e com envolvimento de pelo menos um feixe nervoso maior que 1mm demonstraram maior risco de recidiva locorregional e mortalidade específica da doença. Em contraste, pacientes com PNI unifocal não tiveram aumento no risco de recorrências ou morte específica da doença, independentemente do tamanho do nervo envolvido.

No estudo de Fagan et al.³⁵ PNI foi encontrada em 74 tumores (52,0%), e observaram sua associação com metástase linfonodal no CEC de cavidade oral e orofaringe. CEC de laringe e hipofaringe não se mostraram significantes em PNI nesse quesito. Além disso, PNI foi significativamente associada à recorrência local e a mortalidade específica da doença, mas não à recorrência regional ou metástase a distância.

Carrillo et al.²¹ estudaram 634 pacientes diagnosticados com CEC oral. Dentre os fatores histológicos, a invasão vascular mostrou associação significativa com a sobrevida global em 5 anos, não observada com PNI. Entretanto, relataram que PNI em nervos maiores que 1mm pode ser associada significativamente à recidiva locorregional.

Schmidt et al.⁸ revelaram menor taxa de sobrevida global associada a presença de PNI, embora não significativa. A análise de Kaplan-Meier para sobrevida livre da doença mostrou uma tendência semelhante em que a curva de sobrevida foi menor para pacientes com PNI. Os autores também associaram PNI, metástase linfonodal e sobrevida, e entre os pacientes com linfonodos negativos, a ocorrência de PNI foi associada com menor taxa de sobrevida global, sustentando que PNI é um fator prognóstico de sobrevida no CEC oral, mesmo sem envolvimento de linfonodos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo seguiu as normas previstas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – MS, e foi submetido a apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sendo aprovado pelo comitê (CAAE: 38707119.3.0000.5416; Número do parecer: 4.545.832; Emenda 5.796.506).

4.1 Enfoque Metodológico da Investigação

Qualitativo e quantitativo.

4.2 Tipo de Estudo

Descritivo, longitudinal e retrospectivo.

4.3 Amostra

Foram selecionados pacientes diagnosticados com CEC oral entre 2004 e 2014 no Hospital Bom Pastor - FHOMUV, da cidade de Varginha-MG, setor de tumores de cabeça e pescoço, e que cumpriam os critérios de inclusão e exclusão.

4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os prontuários e laudos histopatológicos dos pacientes diagnosticados com CEC oral foram analisados, e seguiram os critérios de inclusão e exclusão.

4.4.1 Inclusão

- a) Pacientes com CEC oral e tratados no Hospital Bom Pastor - FHOMUV, da cidade de Varginha-MG, setor de tumores de cabeça e pescoço.
- b) Diagnóstico de CEC oral como tumor primário.
- c) Dados clínicos e histológicos dos prontuários completos.

4.4.2 Exclusão

- a) Pacientes diagnosticados com tumores diferentes de CEC oral.
- b) Dados clínicos e histológicos dos prontuários incompletos.
- c) Óbitos por motivos não ligados ao CEC oral.

4.5 Coleta de Dados

A coleta dos dados foi realizada por pesquisador previamente treinado e ciente dos dados que devia reconhecer e coletar nas fichas dos pacientes e nas descrições histopatológicas. Dados demográficos e clínico-patológicos foram obtidos dos prontuários e organizados em tabelas. Os dados coletados foram: idade, gênero, localização do tumor, grau histológico, estadiamento clínico e histopatológico, tamanho do tumor, metástase linfonodal e a distância, data do início do tratamento, protocolo de tratamentos, estado atual do paciente (vivo, óbito pela doença [data], perda de seguimento [data], óbito por outras causas), recidiva e fatores de risco associados (tabagismo e etilismo), LVI e PNI. Os dados histológicos dos pacientes e o bloco de tecido embebido em parafina foram obtidos nos arquivos do Laboratório IPD - Instituto de Prevenção e Diagnóstico de Varginha-MG. Algumas variáveis seguiram alguns critérios de inclusão, como:

- a) Foram considerados tabagistas indivíduos que fumavam ou fumaram pelo menos 100 cigarros durante sua vida.
- b) Foram considerados etilistas os indivíduos que bebem ou beberam pelo menos um drink/dia por pelo menos seis meses continuamente.
- c) Foi considerada como "cirurgia" a remoção do tumor e suas margens cirúrgicas.
- d) No caso de pacientes submetidos à radioterapia, foram anotados a forma aplicada, adjuvante ou neoadjuvante, assim como o local de aplicação (margens e linfonodos regionais). Também foi anotada a dose aplicada e o número de sessões, assim como se fora utilizado aparelho convencional ou de alta dosagem.
- e) Para pacientes submetidos à quimioterapia, foram anotados os medicamentos que foram utilizados (no caso do uso de associações), a dose e o tempo de administração, assim como se fora aplicada como medicação adjuvante ou neoadjuvante.
- f) O acompanhamento dos casos foi obtido a partir dos dados descritos nas fichas

dos pacientes. A mediana de tempo de acompanhamento foi realizada para 72 meses para todos os pacientes. A taxa de sobrevida global foi calculada da data de diagnóstico até o óbito do paciente por qualquer motivo ou até a data da última visita de acompanhamento. Foram considerados “censuras” as datas de óbito por causas não relacionadas com o câncer oral ou a data de “perda de seguimento”.

g) Os dados histopatológicos analisados por meio dos laudos emitidos pelo IPD – Laboratórios de Varginha-MG, foram todos obtidos por meio de análise em coloração H&E.

4.6 Análise Histopatológica

As peças cirúrgicas foram obtidas junto ao IPD – Laboratórios, e novos cortes foram produzidos e corados em H&E, assim como foram produzidos cortes para as reações de imuno-histoquímica. Patologista certificado realizou as análises histopatológicas de forma independente. A frente de invasão tumoral (TIF) foi definido como a área tumoral mais avançada na borda de avanço do CEC oral. O estadiamento e gradação do CEC oral foram realizados seguindo os critérios do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e da Classificação Internacional de Tumores pela Organização Mundial da Saúde. O diagnóstico de PNI no TIF foi feito por microscopia óptica de luz (Carl Zeiss, Primo Star, Alemanha) com aumentos de 5x, 10x, 20x e 40x.

4.6.1 Imuno-histoquímica

Lâminas coradas com H&E foram usadas para melhorar a identificação do tecido. Em seguida, novas lâminas silanizadas de 4mm de espessura foram produzidas a partir do bloco de tecido embebido em parafina contendo o TIF para realizar a imunomarcagem para anti-S100 e anti-Ki67. As seções de 4mm de espessura foram coradas com H&E (primeira e última seções) e as seções sequenciais foram coradas com os seguintes anticorpos a 4 °C durante a noite: proteínas anti-S100 (Abcam 4C4.9, ab4066, 1:100; Cambridge, MA, EUA) para identificar estruturas nervosas e anti-Ki67 (Abcam 4C4.9, ab4066, 1:100; Cambridge, MA, EUA) para identificar células tumorais. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão (95 °C) com tampão citrato 10 mmol/L, com pH 6,0. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3,0% e o bloqueio do epítipo

foi feito com soroalbumina bovina a 1,0% em solução salina tamponada com fosfato 1x (1 hora em temperatura ambiente). Peroxidase de rábano silvestre (HRP)/3,3'Diaminobenzidina (DAB), micropolímero do kit de detecção imunocitoquímica (Ab236466) foi usado como o sistema de anticorpo secundário por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas e contrastadas com hematoxilina de Mayer (Thermo Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA). Uma reação positiva com nervos periféricos (S100+) e proliferação celular (Ki67+) dentro da amostra de CEC oral foi considerada como controle positivo interno. Como controle negativo, solução salina tamponada com fosfato foi usada no lugar do anticorpo primário.

4.6.2 Denificação de PNI e anticorpos

A avaliação de PNI nos CECs orais foi observada de 02 maneiras: 1) Por meio dos laudos histopatológicos obtidos nos prontuários, emitidos pelo IPD – Laboratórios por análise em coloração H&E, onde PNI era descrita como “ausente” ou “presente”; 2) Por meio de análise histopatológica das peças cirúrgicas em coloração H&E e com ajuda de imuno-histoquímica utilizando anti-S100 e anti-Ki67.

Casos em que a presença de PNI foi detectada pelo método de imunocoloração com anti-S100, consideramos PNI (S100+), sendo descrita da seguinte forma: a) ausente; b) >33% da circunferência do nervo infiltrado por células tumorais; c) envolvimento total do nervo por células tumorais; e d) invasão intraneural por células tumorais (Figura 1).

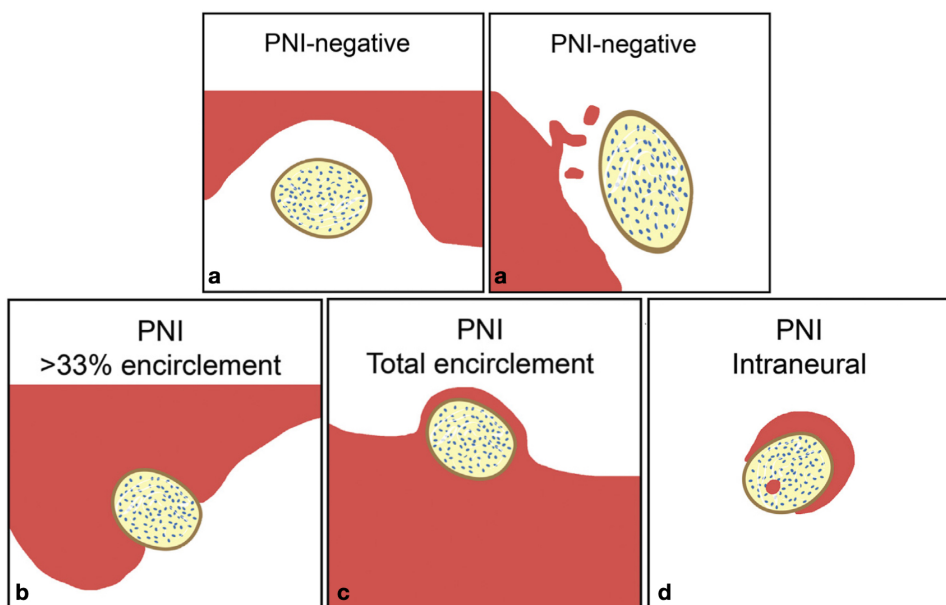
Para o anticorpo Ki67, a análise de proliferação das células tumorais respeitou os seguintes critérios: a) intensidade (nenhuma, pouca, média ou alta); b) quantidade (<10%, 11-25%, 26-50%, >51%); e c) escore (baixo: 0 – 4, moderado: 5 – 8, alto: 9 – 12).

4.7 Análise Estatística

Após a coleta de dados, foi realizado teste de normalidade das variáveis, e as variáveis quantitativas foram verificadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov observando se eram paramétricas ou não paramétricas. Os resultados foram analisados em programa estatístico SPSS® versão 23.0. Os dados clínico-patológicos

foram apresentados com medidas descritivas de mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartil, média e desvio-padrão, além de percentuais como medidas. Todos os resultados obtidos foram organizados em forma de tabelas e gráficos.

Figura 1 - Descrição microscópica de PNI



Representação dos diferentes aspectos microscópicos de PNI. (a) PNI ausente. (b) Envolvimento de >33% da circunferência do nervo. (c) Envolvimento total do nervo. (d) Invasão intraneural.

Fonte: Schmitd et al.⁸

Os dados encontrados foram analisados utilizando o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando necessário, com nível de significância de 5%, ou seja, $p < 0,05$. Os desfechos clínicos e histológicos de interesse foram relacionados ou associados entre si e entre as demais variáveis descritas no item 4.5. O teste de McNemar foi aplicado com finalidade de comparar os dois métodos utilizados no diagnóstico de PNI, sendo coloração em H&E e imunocoloração para S100, avaliando se ocorreram mudanças significativas entre eles, testando a homogeneidade dos totais marginais. Além disso, utilizou-se o Índice de Kappa para avaliar a concordância entre esses dois métodos de diagnóstico de PNI, observando se existiu alguma concordância entre eles.

O modelo de regressão logística foi utilizado para identificar quais variáveis e fatores estavam associados, de forma conjunta, na ocorrência de um determinado desfecho. Os resultados da análise univariada foram utilizados como forma de realizar

uma pré-seleção dessas variáveis que seriam conduzidas na análise multivariada. Foram selecionadas as variáveis com probabilidade de significância igual ou inferior a 0,25 ($p \leq 0,25$). Foi utilizado o teste de Wald de regressão logística. Ressalta-se que o teste da razão de Verossimilhança foi utilizado com o intuito de verificar se a retirada das variáveis não significativas não interferia na variável de desfecho. Além disso, parâmetros para avaliação de acuidade (sensibilidade e especificidade) do modelo gerado pela análise de regressão logística foram utilizados.

A análise de Kaplan-Meier foi realizada para estimar a sobrevida global, enquanto o teste de Log-rank foi usado para comparar as curvas de sobrevida das variáveis de interesse. Pacientes com perda de seguimento ou sem acompanhamento de no mínimo 05 anos após o início do tratamento primário não foram incluídos nessa análise.

5 RESULTADO

Dos 532 prontuários avaliados, 310 casos com dados clínicos e histopatológicos completos foram incluídos nesse estudo, e a análise descritiva foi apresentada na Tabela 1. Os dados demonstraram forte predomínio do gênero masculino em relação ao feminino. Observamos 244 homens (78,7%) com média de idade de 60 anos, variando de 30 a 98 anos. Já as mulheres apresentaram uma média de 60,4 anos e mediana de 58 anos, variando de 21 a 95 anos.

Dentre os hábitos, o tabagismo associado ao etilismo foi identificado em 159 indivíduos (51,2%) e foi predominante, mas o tabagismo isolado também foi frequente sendo hábito de 111 indivíduos (35,8%). Desse modo, 87,0% dos pacientes do estudo relataram fazer uso de tabaco, associado ou não ao álcool.

Quanto a localização de diagnóstico ou origem do tumor, a língua foi a mais frequente com 40,3% dos casos, seguido da orofaringe com 21,2% e do assoalho bucal com 12,9%.

No sistema TNM, verificamos que tumores maiores foram mais frequentemente diagnosticados e T3 e T4 foram observados em 214 (69,0%) pacientes, onde somente T4 foi responsável por 44,5% do total de casos. De forma semelhante, mas não necessariamente direta, os estádios III e IV também se mostraram predominantes, somando 67 (21,6%) casos com estágio III e 169 (54,5%) pacientes com estadiamento IV.

Em relação aos dados histopatológicos obtidos nas fichas diagnósticas, 29 (9,3%) tumores apresentaram PNI. A distribuição destes casos em relação ao gênero demonstrou predomínio masculino com 21 casos (72,4%), resultado ligeiramente menor da distribuição geral de homens no grupo, que foi de 78,7%. Mulheres somaram 27,6% dos casos descritos. Ainda sobre a distribuição dos tumores com PNI relatada, pacientes com mais de 60 anos foram maioria (13 pacientes), porém chamou atenção o número de pacientes com menos de 45 anos com PNI (19,2%). Outro dado importante foi a associação de localização e diagnóstico de PNI. Tumores de língua e assoalho somaram 82,7% dos casos com PNI, com 18 casos de língua (62,0%) e 6 casos de assoalho (20,7%).

Em relação a classificação de TNM e PNI, pacientes classificados como T2 e T4 apresentaram as maiores taxas de PNI com respectivamente 11,5% e 10,1%. O

estadiamento IV somou 20 casos que representou 68,9% do total de tumores PNI positivos.

Tabela 1 - Análise descritiva das características clínicas e patológicas relacionadas a PNI (n = 310)

Variáveis	Total (%)	PNI (%)
Gênero		
Masculino	244 (78.7)	21 (8.6)
Feminino	66 (21.2)	8 (12.1)
Idade (60,1±11,3)		
>60	143 (46.1)	13 (9.1)
60-45	141 (45.4)	11 (7.8)
<45	26 (8.3)	5 (19.2)
Localização		
Língua	125 (40.3)	18 (14.4)
Assoalho de Boca	40 (12.9)	6 (15.0)
Orofaringe	66 (21.2)	2 (3.0)
Mucosa Jugal	4 (1.3)	-
Lábio	21 (6.7)	1 (4.7)
Área Retromolar	18 (5.8)	-
Rebordo Alveolar	14 (4.5)	1 (7.1)
Palato Duro	22 (7.1)	1 (4.5)
Tamanho		
T1	27 (8.7)	2 (7.4)
T2	69 (22.2)	8 (11.5)
T3	76 (24.5)	5 (6.5)
T4	138 (44.5)	14 (10.1)
Metástase Linfonodal		
Não	176 (56.7)	9 (5.1)
Sim	134 (43.2)	20 (14.9)
Metástase a Distância		
M0	270 (87.0)	20 (7.4)
M1	2 (0.7)	-
Mx	38 (12.3)	9 (23.7)
Estadiamento		
I	22 (7.1)	1 (4.5)
II	52 (16.7)	4 (7.6)
III	67 (21.6)	4 (5.9)
IV	169 (54.5)	20 (11.8)
Recidiva Locorregional		
Não	245 (79.0)	17 (6.9)
Sim	65 (21.0)	12 (18.5)
Fatores de Risco		
Nenhum	40 (13.0)	4 (10.0)
Tabagismo	111 (35.8)	10 (9.0)
Tabagismo + Etilismo	159 (51.2)	15 (9.4)

Fonte: Elaboração própria.

Pacientes com metástase linfonodal apresentaram prevalência quase três vezes maior de PNI (14,9%) que os pacientes sem metástase linfonodal (5,1%). A prevalência de PNI em pacientes com recidiva locorregional foi mais que o dobro

comparado a pacientes sem recorrências, e apesar de PNI estar presente em maior número nos pacientes expostos aos fatores de risco, a prevalência se manteve muito próxima a dos pacientes não expostos (Tabela 1).

Em relação a gradação dos CECs orais, tumores moderadamente diferenciados prevaleceram, somando 162 casos (52,2%) (Tabela 2). Quando associamos grau histológico com presença de PNI verificamos que, tanto os tumores moderadamente diferenciados quanto os tumores bem diferenciados apresentaram valores muito semelhantes com 10,4% e 10,5%, e tumores pouco diferenciados apresentam valor ligeiramente menor (9,3%).

Tabela 2 - Grau histológico dos tumores relacionados com PNI

Grau Histológico	Total (%)	PNI (%)
Bem diferenciado	38 (12.2)	4 (10.5)
Moderadamente diferenciado	162 (52.2)	17 (10.4)
Pouco diferenciado	32 (10.3)	3 (9.3)
Não especificado no laudo	78 (25.1)	5 (6.4)

Fonte: Elaboração própria.

Dentre os tratamentos propostos para o CEC oral, radioterapia e cirurgia utilizados de forma isolada representaram as menores taxas (Tabela 3). O uso concomitante de radioterapia e quimioterapia, associada a cirurgia ou não, representaram a maioria dos tratamentos realizados (60,0%). Casos positivos para PNI tratados apenas com terapia adjuvante (radioterapia + quimioterapia) ou cirurgia, representaram somente 2 (6,9%) casos. Já o protocolo de tratamento abordando cirurgia combinada a radioterapia, associados a quimioterapia ou não, representaram 27 (93,1%) dos 29 casos positivos para PNI.

Tabela 3 - Tratamentos realizados e sua relação com PNI

Tratamento	Total (%)	PNI (%)
Radioterapia	19 (6.1)	-
Cirurgia	24 (7.7)	1 (4.1)
Cirurgia + Radioterapia	81 (26.1)	10 (12.3)
Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia	82 (26.4)	17 (20.7)
Radioterapia + Quimioterapia	104 (33.5)	1 (1.0)

Fonte: Elaboração própria.

5.1 Análise de Sobrevida

Do total de casos desse estudo (n=310), mais da metade (58.7%) apresentou perda de seguimento dos primeiros 05 anos após o início do tratamento primário, ou

foi a óbito por outro motivo não ligado ao CEC oral, representando 182 casos. A taxa de sobrevida e sua relação com as variáveis, incluindo PNI, foram avaliadas somente nos pacientes com um acompanhamento mínimo de 05 anos ou que foram a óbito pela doença, um total de 128 pacientes (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise descritiva das características clínicas e patológicas relacionadas a sobrevida (n = 128)

Variáveis	Total (%)	Sobrevida em 5 anos (%)	X²	p*
Gênero				
Masculino	98 (76.5)	24.5	1,342	2,467
Feminino	30 (23.4)	40.0		
Idade				
≥60 anos	55 (42.9)	32.9	3,689	0,054
<60 anos	73 (57.0)	21.8		
Localização				
Língua	55 (43.0)	21.8	16,840	0,031
Assoalho de Boca	17 (13.3)	35.3		
Orofaringe	30 (23.4)	25.0		
Mucosa Jugal	1 (0.8)	-		
Lábio	7 (5.4)	100.0		
Área Retromolar	10 (7.8)	20.0		
Rebordo Alveolar	7 (5.4)	14.3		
Palato Duro	1 (0.8)	-		
Tamanho				
T1	12 (9.4)	50.0	2,210	<0,001
T2	29 (22.6)	48.3		
T3	31 (24.2)	29.0		
T4	56 (43.7)	12.5		
Metástase Linfonodal				
N0	68 (53.1)	41.2	23,120	<0,001
N1	17 (13.3)	29.4		
N2	26 (20.3)	11.5		
N3	17 (13.3)	-		
Metástase a Distância				
M0	98 (76.5)	27.5	22,240	0,675
M1	1 (0.8)	-		
MX	29 (22.6)	31.0		
Estadiamento				
I	8 (6.2)	62.5	17,430	<0,001
II	22 (17.2)	54.5		
III	29 (22.6)	34.5		
IV	69 (53.9)	13.0		

Grau Histológico				
Bem diferenciado	12 (9.4)	33.3	0,786	0,504
Moderadamente diferenciado	66 (51.5)	27.3		
Pouco diferenciado	11 (8.6)	10.0		
Não especificado	39 (30.4)	32.5		
Recidiva Locorregional				
Não	89 (69.5)	30.3	0,559	0,529
Sim	39 (30.5)	23.0		
Fatores de Risco				
Nenhum	18 (14.1)	33.3	1,272	0,331
Tabagismo	44 (34.4)	22.7		
Tabagismo + Etilismo	66 (51.5)	22.2		
Tratamento				
Radioterapia	12 (9.4)	-	32,690	<0,001
Cirurgia	4 (3.1)	50.0		
Cirurgia + Rxt	37 (28.9)	54.0		
Cirurgia + Rxt + Qxt	33 (25.8)	24.2		
Rxt + Qxt	42 (32.8)	14.3		
PNI				
Ausente	114 (89.0)	73.6	0,024	0,876
Presente	14 (11.0)	71.4		

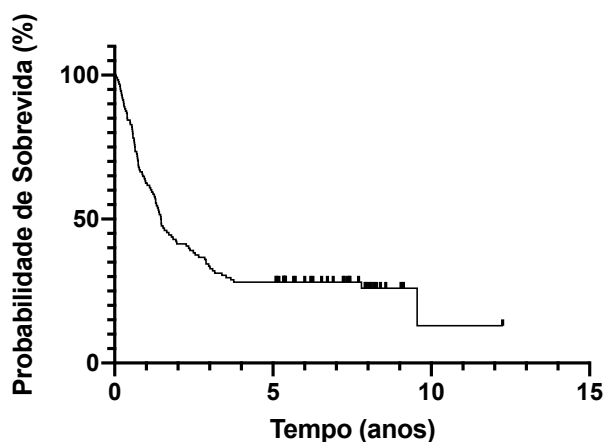
PNI, invasão perineural; Rxt, radioterapia; Qxt, quimioterapia.

*As probabilidades de significância referem-se ao teste de Log-Rank e $p < 0,05$ indica significância estatística.

Fonte: Elaboração própria.

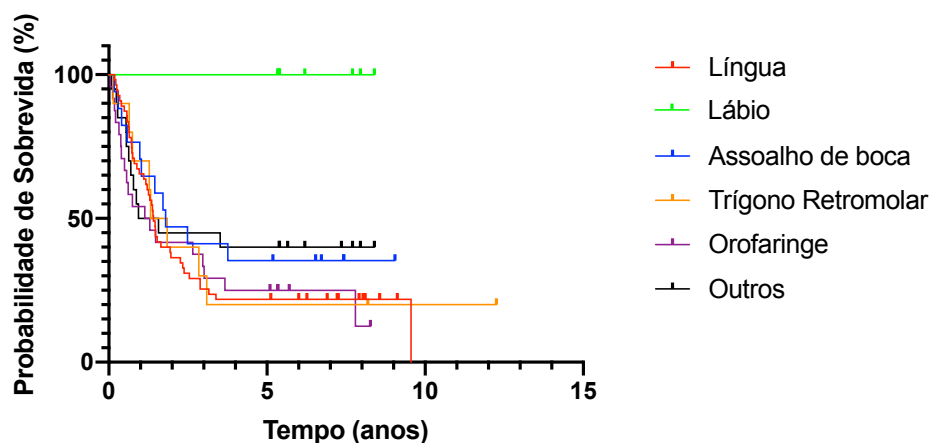
Noventa e oito (76,5%) casos eram homens e 30 mulheres (23,44%), com média de idade de 58 anos ($\pm 11,81$). Noventa e quatro (73,4%) foram a óbito antes dos primeiros 5 anos do início do tratamento primário, e a taxa de sobrevida global em 5 anos foi de 28,1% (Gráfico 1).

Entre as variáveis analisadas, localização apresentou resultados significantes para menor sobrevida ($p=0,038$), e 80,0% ($n=44$) dos casos com tumores em língua foram a óbito, situação não vista em nenhum dos casos com tumor em lábio (Gráfico 2). Além disso, mais da metade dos casos ($n=69$) encontravam-se em estadiamento IV, e desses, 61 (88,4%) foram a óbito antes dos primeiros 5 anos de acompanhamento, apresentando uma taxa de sobrevida em 5 anos de apenas 13,0% ($p < 0,001$) (Gráfico 3).

Gráfico 1 - Sobrevida global

Sobrevida global dos pacientes com CEC oral tratados no Hospital Bom Pastor de Varginha-MG, entre os anos de 2004 e 2014. Análise de Kaplan-Meier.

Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 2 - Sobrevida (localização)

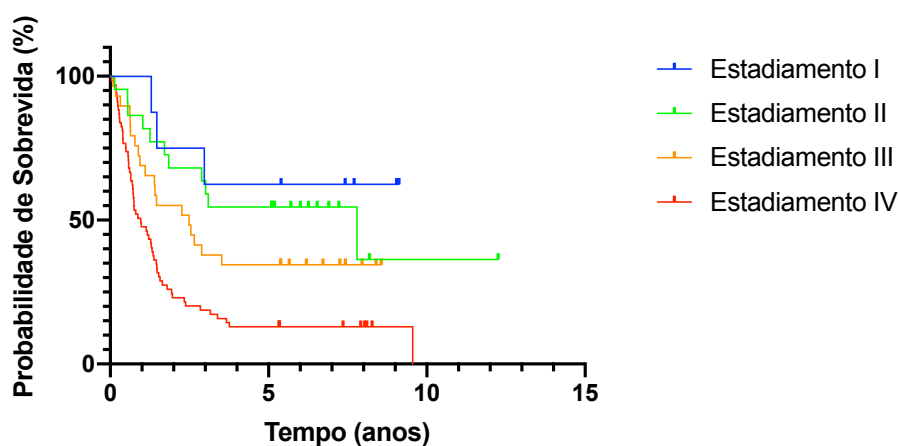
Sobrevida dos pacientes com CEC oral segundo a localização do tumor. Análise de Kaplan-Meier. Teste de Log-Rank ($p=0,038$).

Fonte: Elaboração própria.

Em relação ao tamanho do tumor, 50 (53,2%) dos 94 óbitos registrados eram representados por T4, revelando uma taxa de sobrevida em 5 anos de 12,5% ($p<0,001$) (Gráfico 4). Ausência de metástase linfonodal (N0) mostrou-se maior tanto em número de casos ($n=68$) quanto em número de óbitos ($n=42$), entretanto pacientes com status linfonodal positivo apresentaram as menores taxas de sobrevida, especialmente os casos N3 ($n=17$), onde nenhum paciente sobreviveu mais de 5 anos

após o início do tratamento ($p<0,001$) (Gráfico 5). Fato semelhante ocorreu com pacientes submetidos somente a radioterapia, onde todos os 12 pacientes (100,0%) foram a óbito antes dos 5 primeiros anos ($p<0,001$), enquanto casos submetidos a cirurgia associada a radioterapia estão entre as maiores taxas de sobrevida em 5 anos desse estudo (54,0%) (Gráfico 6).

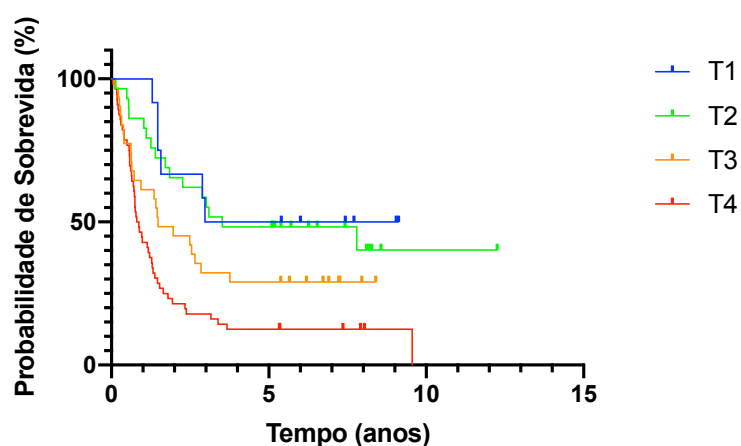
Gráfico 3 - Sobrevida (estadiamento)



Sobrevida dos pacientes com CEC oral segundo o estadiamento tumoral. Análise de Kaplan-Meier. Teste de Log-Rank ($p<0,001$).

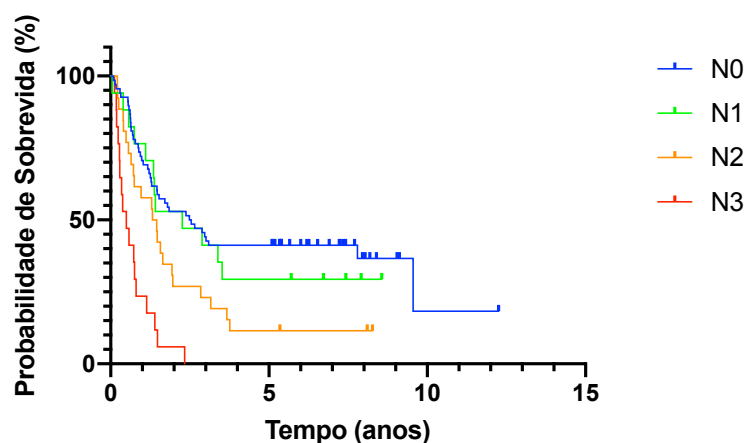
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 4 - Sobrevida (tamanho)



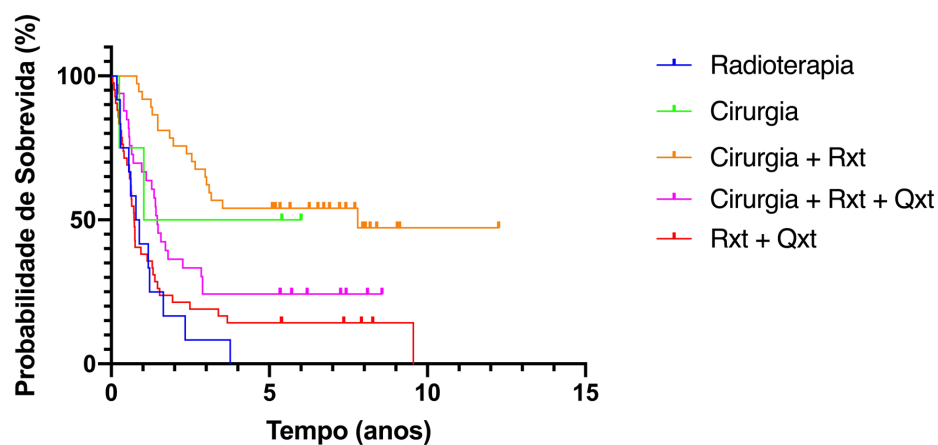
Sobrevida dos pacientes com CEC oral segundo o tamanho do tumor. Análise de Kaplan-Meier. Teste de Log-Rank ($p<0,001$).

Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 5 - Sobrevida (metástase linfonodal)

Sobrevida dos pacientes com CEC oral segundo o status nodal. Análise de Kaplan-Meier. Teste de Log-Rank ($p < 0,001$).

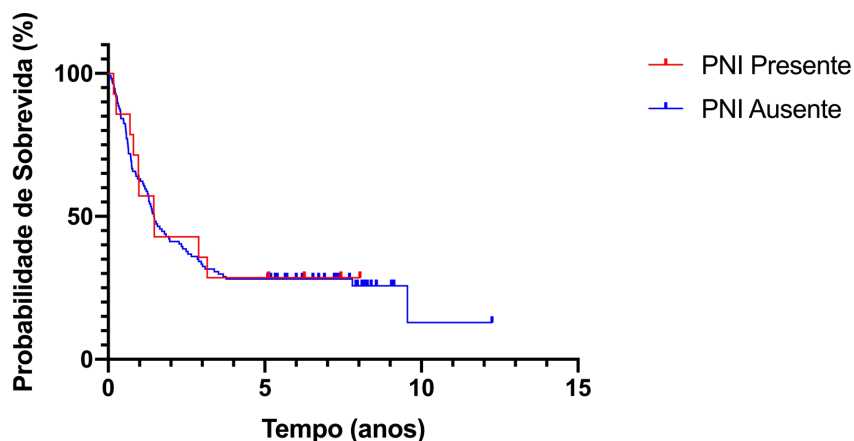
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 6 - Sobrevida (tratamento)

Sobrevida dos pacientes com CEC oral segundo o tratamento. Análise de Kaplan-Meier. Teste de Log-Rank ($p < 0,001$).

Fonte: Elaboração própria.

Diferentemente das variáveis citadas acima, PNI não mostrou resultados significativos ($p = 0,831$), observando taxas de sobrevida muito próximas tanto em pacientes com PNI (28,5%), quanto sem PNI (28%) (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Sobrevida (PNI)

Sobrevida dos pacientes com CEC oral segundo a PNI. Análise de Kaplan-Meier. Teste de Log-Rank ($p=0,831$).

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Análise Histopatológica

Os tumores que estavam em condições de análise histopatológica foram disponibilizados pelo laboratório IPD e incluídos nessa pesquisa. Todos os casos foram analisados por meio de coloração em H&E e com imuno-histoquímica para S100 e Ki67.

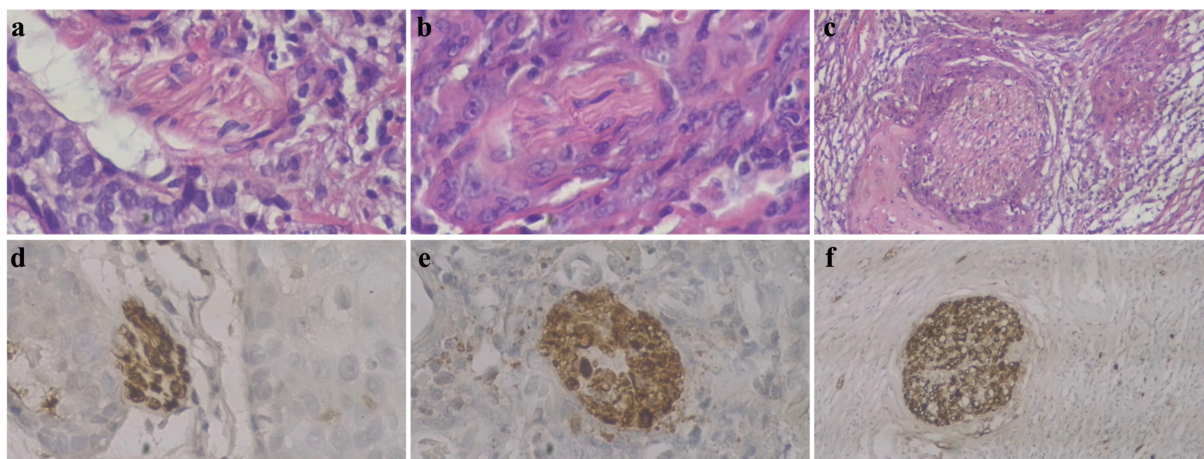
5.2.1 PNI

Trinta e nove tumores foram incluídos e os dados demográficos e clínico-patológicos foram apresentados nas Tabelas 5 e 6. A nova análise histopatológica com microscopia óptica em lâminas coradas em H&E identificou 7 casos com PNI (17,9%), enquanto a análise com auxílio da imuno-histoquímica para S100 identificou vinte tumores com PNI (51,3%) (Tabela 7). De fato, a imuno-histoquímica para S100 aumentou a precisão diagnóstica na detecção de PNI em comparação com a coloração H&E ($p=0,004$).

Nesse ponto da descrição, é importante enfatizar que tanto a nova análise em H&E, quanto a análise com auxílio da imuno-histoquímica para S100, descreveram detalhadamente a forma como ocorria PNI, citada no item 4.6.2. Sendo assim, a maioria dos casos PNI (S100+) foram representados por invasão intraneural com um

total de 9 (45,0%) casos, seguidos pelo envolvimento total do nervo com 8 (40,0%) casos, e >33% da circunferência do nervo que totalizou 3 (15,0%) casos (Figura 2). Embora a invasão intraneural se mostre com maior número de casos, não houve diferença significativa entre os tipos de PNI observadas (Tabela 8).

Figura 2 - Análise histológica de PNI (H&E e S100)



Análise histológica de PNI no CEC oral utilizando coloração em H&E e imuno-histoquímica com anti-S100. (a,d) Envolvimento de >33% da circunferência do nervo. (b,e) Envolvimento total do nervo. (c,f) Invasão intraneural.

Fonte: Arquivo pessoal de Cleverton Roberto de Andrade.

Os gêneros masculino e feminino apresentaram prevalências semelhantes de PNI (S100+), e embora não estatisticamente significante ($p=0,161$), 100,0% dos pacientes ≤ 50 anos apresentaram PNI (S100+). Pacientes fumantes e etilistas de forma associada apresentaram quase o dobro da prevalência de PNI (S100+) em comparação com pacientes não expostos ou somente tabagistas, apesar de estatisticamente não significante ($p=0,182$). Língua e assoalho bucal representaram mais da metade (53,8%) dos locais acometidos por PNI (S100+) seguidos pela orofaringe (20,0%), que representou o local com a maior prevalência de PNI (S100+) (66,7%).

Na classificação TNM, 20,0% dos tumores T1 apresentaram PNI (S100+), e números bem maiores foram observados em T2, T3 e T4, apresentando uma prevalência >55,0% de PNI (S100+). Apesar de 71,8% da amostra analisada não apresentar metástase linfonodal (N0), os resultados de PNI (S100+) se mostraram muito próximos aos casos com metástase linfonodal (N1, N2 e N3), 50,0% e 54,5%.

Tumores com estadiamento IV apresentaram a menor prevalência (42,9%) de PNI (S100+), enquanto 71,4% dos casos com estadiamento III mostraram PNI (S100+).

Tabela 5 - Relação entre PNI, recidiva locorregional e metástase linfonodal com características clínico-patológicas (n = 39)

Características Clínico-Patológicas	Total	PNI (S100+)		Recidiva Locorregional +		Metástase Linfonodal +	
	n (%)	n (%)	p*	n (%)	p*	n (%)	p*
Gênero							
Feminino	6 (15.4)	3 (50.0)	1,000	4 (66.7)	0,028	1 (16.7)	0,655
Masculino	33 (84.6)	17 (51.5)		6 (18.2)		10 (30.3)	
Idade (média 59.1 ± 9)							
≤50	4 (10.2)	4 (100.0)	0,161	2 (50.0)	0,264	3 (75.0)	0,078
51-60	22 (56.4)	10 (45.5)		4 (18.2)		6 (27.3)	
>60	13 (33.3)	6 (46.2)		4 (30.8)		2 (15.4)	
Fatores de Risco							
Nenhum	3 (7.7)	1 (33.3)	0,182	1 (33.3)	0,860	1 (33.3)	0,859
Tabagismo	10 (25.6)	3 (30.0)		3 (30.0)		2 (20.0)	
Tabagismo + Etilismo	26 (66.7)	16 (61.5)		6 (23.1)		8 (30.8)	
Localização							
Língua	11 (28.2)	5 (45.5)	0,802	3 (27.3)	0,828	6 (54.5)	0,184
Assoalho	10 (25.6)	6 (60.0)		2 (20.0)		2 (20.0)	
Orofaringe	6 (15.4)	4 (66.7)		2 (33.3)		2 (33.3)	
Lábio	4 (10.3)	1 (25.0)		-		-	
Trígono Retromolar	5 (12.8)	2 (40.0)		2 (40.0)		-	
Outros	3 (7.7)	2 (66.7)		1 (33.3)		1 (33.3)	
Tamanho							
T1	5 (12.8)	1 (20.0)	0,627	1 (20.0)	0,166	-	0,392
T2	16 (41.0)	9 (56.3)		6 (37.5)		5 (31.3)	
T3	9 (23.1)	5 (55.6)		-		4 (44.4)	
T4	9 (23.1)	5 (55.6)		3 (33.3)		2 (22.2)	
Metástase Linfonodal							
N0	28 (71.8)	14 (50.0)	1,000	9 (32.1)	0,632	-	-
N1	5 (12.8)	2 (40.0)		-		-	
N2	5 (12.8)	3 (60.0)		1 (20.0)		-	
N3	1 (2.6)	1 (100.0)		-		-	
Metástase a Distância							
M0	27 (69.2)	16 (59.3)	0,176	7 (25.9)	1,000	7 (25.9)	0,709
Mx	12 (30.8)	4 (33.3)		3 (25.0)		4 (33.3)	

Estadiamento							
I	4 (10.3)	2 (50.0)	0,739	2 (50.0)	0,213	-	0,001
II	14 (35.9)	7 (50.0)		5 (35.7)		-	
III	7 (17.9)	5 (71.4)		-		4 (57.1)	
IV	14 (35.9)	6 (42.9)		3 (21.4)		7 (50.0)	
Recidiva Locorregional							
Não	29 (74.4)	13 (44.8)	0,273	-	-	9 (31.0)	0,402
Sim	10 (25.6)	7 (70.0)		-		1 (10.0)	
Tratamento							
Cirurgia	2 (5.1)	-	0,328	-	1,000	-	0,164
Cirurgia + Rxt	27 (69.2)	16 (59.3)		7 (25.9)		6 (22.2)	
Cirurgia + Rxt + Qxt	6 (15.4)	3 (50.0)		2 (33.3)		4 (66.7)	
Rxt + Qxt	4 (10.3)	1 (25.0)		1 (25.0)		1 (25.0)	

PNI, invasão perineural; Rxt, radioterapia; Qxt, quimioterapia.

*As probabilidades de significância referem-se ao teste exato de Fisher e $p < 0,05$ indica significancia estatística.

PNI (S100+) representa todos os casos diagnosticados com PNI por imuno-histoquímica.

Recidiva Locorregional + representa todos os casos analisados histologicamente com recorrências locorregionais.

Metástase Linfonodal + representa todos os casos analisados histologicamente com comprometimento linfonodal.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6 - Relação entre PNI, recidiva locorregional e metástase linfonodal com características histopatológicas (n = 39)

Características Histopatológicas	Total	PNI (S100+)	Recidiva Locorregional +		Metástase Linfonodal +	
	n (%)	n (%)	p*	n (%)	p*	n (%)
Grau Histológico						
Bem diferenciado	25 (64.1)	14 (56.0)	0,514	4 (16.0)	0,124	8 (32.0)
Moderadamente Diferenciado	14 (35.9)	6 (42.9)		6 (42.9)		3 (21.4)
PNI (S100+)						
Ausente	19 (48.7)	-	-	3 (15.8)	0,001	5 (26.3)
Envolvimento >33%	3 (7.7)	-		-		1 (33.3)
Envolvimento Total	8 (20.5)	-		-		3 (37.5)
Intraneural	9 (23.1)	-		7 (77.8)		2 (22.2)
Intensidade (Ki67)						
Nenhuma	2 (5.1)	1 (50.0)	0,290	-	0,740	-
Pouco	6 (15.4)	2 (33.3)		2 (33.3)		2 (33.3)
Média	15 (38.4)	6 (40.0)		5 (33.3)		-
Alta	16 (41.0)	11 (68.8)		3 (18.8)		9 (56.3)
Quantidade (Ki67)						
<10%	4 (10.2)	1 (25.0)	0,720	-	0,211	-
11-25%	6 (15.4)	3 (50.0)		3 (50.0)		1 (16.7)
26-50%	19 (48.7)	11 (57.9)		6 (31.6)		3 (15.8)
>51%	10 (25.6)	5 (50.0)		1 (10.0)		7 (70.0)
Escore (Ki67)						
Baixo (0-4)	23 (59.0)	9 (39.1)	0,099	7 (30.4)	0,103	2 (8.7)
Moderado (5-8)	7 (18.0)	6 (85.7)		3 (42.9)		2 (28.6)
Alto (9-12)	9 (23.0)	5 (55.5)		-		7 (77.8)
Invasão Linfovacular						
Não	23 (59.0)	11 (47.8)	0,748	5 (21.7)	0,711	5 (21.7)
Sim	16 (41.0)	9 (56.3)		5 (31.3)		6 (37.5)

PNI, invasão perineural.

*As probabilidades de significância referem-se ao teste exato de Fisher e $p < 0,05$ indica significância estatística.

PNI (S100+) representa todos os casos diagnosticados com PNI por imuno-histoquímica.

Recidiva Locorregional + representa todos os casos analisados histologicamente com recorrências locorregionais.

Metástase Linfonodal + representa todos os casos analisados histologicamente com comprometimento linfonodal.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7 - Comparação entre análise de PNI em H&E e por imuno-histoquímica com anti-S100

Análise Histopatológica	PNI (S100-)	PNI (S100+)	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
PNI (H&E-)	16 (41.0)	16 (41.0)	32 (82.1)
PNI (H&E+)	3 (7.7)	4 (10.3)	7 (17.9)
Total	19 (48.7)	20 (51.3)	39 (100.0)

PNI, invasão perineural; H&E, hematoxilina e eosina.

Índice de Kappa ($k=0.04$) ($p=0,732$).

Teste de McNemar ($p=0,004$).

PNI (H&E+) e PNI (H&E-) representam todos os casos positivos e negativos para PNI diagnosticados por meio de coloração H&E.

PNI (S100+) e PNI (S100-) representam todos os casos positivos e negativos para PNI diagnosticados por meio de imuno-histoquímica.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 8 - Caracterização dos pacientes com PNI (S100+) segundo o tipo de invasão (n=20)

Tipo de Invasão	Distribuição	
	Observada (%)	Esperada (%)
Envolvimento >33%	15.0	33.3
Envolvimento Total	40.0	33.3
Intraneural	45.0	33.3

Teste de Qui-quadrado de aderência (p=0,212).

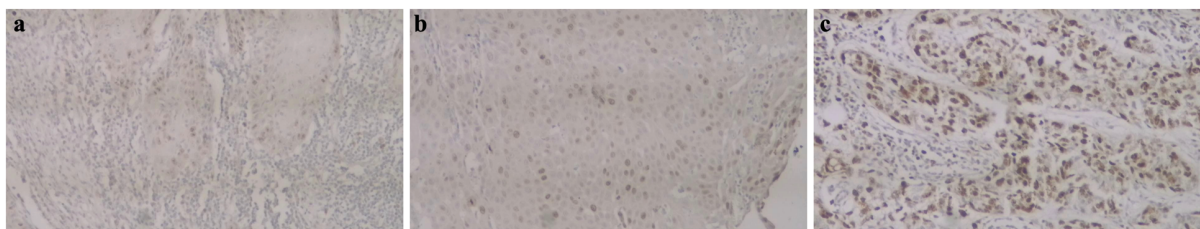
Fonte: Elaboração própria.

Metade dos pacientes que foram submetidos a cirurgia associada a radioterapia e quimioterapia apresentaram PNI (S100+), e casos tratados com cirurgia e radioterapia mostraram prevalência de 59,3% de PNI (S100+), ou seja, 95,0% dos pacientes positivos para PNI receberam terapia adjuvante.

Tumores bem diferenciados totalizaram o maior número de casos (64,1%), assim como maior prevalência (56,0%) de PNI (S100+).

A análise proliferativa das células tumorais realizada por imuno-histoquímica com anti-Ki67 analisou intensidade, quantidade e escore (Figura 3). O escore baixo foi mais predominante (59,0%), seguidos de alto (23,0%) e moderado escore (18,0%). Para os casos PNI (S100+) tumores de escore moderado apresentaram maior porcentagem (85,0%) de casos positivos, seguido do alto escore (55,5%) e baixo escore (39,1%).

A análise estatística multivariada (Tabela 9) mostrou que pacientes etilistas com moderado e alto escore para Ki67 têm maior probabilidade apresentar PNI (S100+) (Gráfico 8).

Figura 3 - Análise histológica tumoral (Ki67)

Análise histológica do CEC oral por imunocoloração com anti-Ki67. (a) Baixo escore (1 - 4). (b) Moderado escore (5 – 8). (c) Alto escore (9 – 12).

Fonte: Arquivo pessoal de Cleverton Roberto de Andrade.

Tabela 9 - Análise multivariada para identificação dos fatores associados ao resultado de PNI (S100+) (n = 39)

Variáveis	Modelo cheio		Modelo final		
	C	p*	C	p*	OR (IC _{95%})
Metástase a Distância (Ref. Mx)					
M0	1,2	0,151	-	-	-
Etilismo (Ref. Não)					
Sim	1,6	0,051	1,4	0,076	3,9 (0,9; 17,5)
Escore (Ref. 0 - 4)					
Escore 5 - 12	1,1	0,137	1,3	0,074	3,7 (0,9; 15,4)

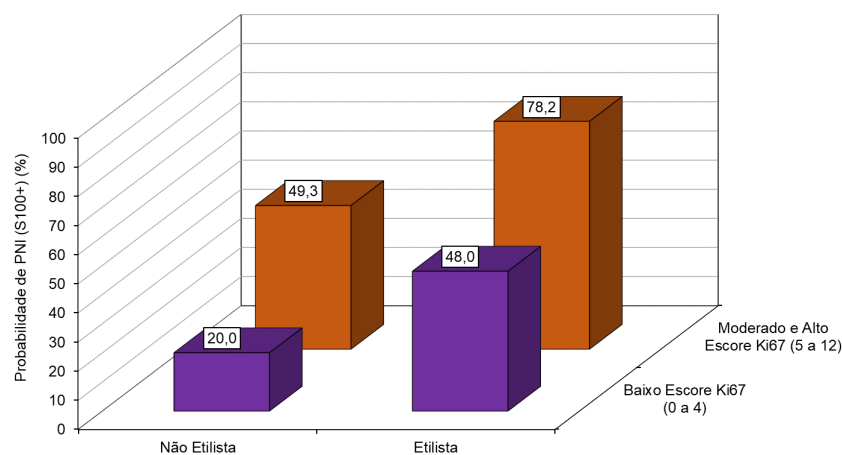
Ref., referência; C, coeficiente.

*As probabilidades de significância referem-se ao teste de Wald da Regressão Logística.

Parâmetros do modelo: Sensibilidade → 40,0%; Especificidade → 84,2%.

Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 8 - Probabilidade de PNI (S100+)



Probabilidade de o paciente com CEC oral apresentar PNI (S100+) segundo o fator de risco e o escore de Ki67.

Fonte: Elaboração própria.

A LVI foi identificada em 41,0% dos casos (n=16). A maioria dos casos positivos para LVI também apresentou PNI (S100+) (56,3%), sendo menor nos casos negativos para LVI (47,8%).

A análise estatística multivariada (Tabela 10) mostrou que pacientes negativos para PNI e com mais de 56 anos tiveram 14,6% de probabilidade de apresentar LVI, enquanto pacientes PNI (S100+) e com menos de 56 anos tiveram probabilidade de 92,6% de apresentar PNI (S100+) (Gráfico 9).

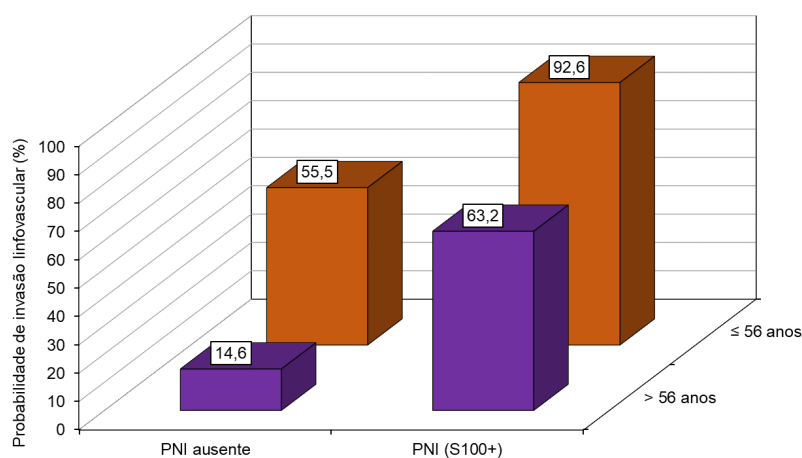
Tabela 10 - Análise multivariada para identificação dos fatores associados a LVI (n=39)

Variáveis	Modelo cheio		Modelo final		
	C	p*	C	p*	OR (IC _{95%})
Gênero (Ref. Masculino)					
Feminino	0,4	0,741	-	-	-
Idade (Ref. >56 anos)					
≤ 56 anos	1,8	0,044	2,3	0,005	10,0 (2,0;49,8)
Localização (Ref. Assoalho, Orofaringe, Lábio, Área Retromolar)					
Língua + Outros Locais	1,1	0,212	-	-	-
Grau Histológico (Ref.: Bem Diferenciado)					
Moderadamente Diferenciado	0,6	0,453	-	-	-
PNI (S100) (Ref. Ausente)					
Presente	1,4	0,241	2,0	0,061	7,3 (0,9;58,3)

Ref., referência; C, coeficiente; PNI, invasão perineural.

*As probabilidades de significância referem-se ao teste de Wald da Regressão Logística.
Parâmetros do modelo: Sensibilidade → 87,5%; Especificidade → 73,9%.

Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 9 - Probabilidade de invasão linfovascular

Probabilidade de o paciente com CEC oral apresentar LVI segundo PNI (S100) e a idade.

Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Recidiva locorregional e metástase linfonodal

Os casos analisados histologicamente (n=39) tiveram os desfechos recidiva locorregional e metástase linfonodal comparados com todas as outras variáveis estudadas (Tabelas 5 e 6).

A recidiva locorregional foi observada em 10 (25,6%) casos, sendo mais prevalente no gênero feminino (66,7%) comparado com o masculino (18,2%), com resultado significativo ($p=0,028$). Todos os pacientes com recidiva locorregional foram tratados com terapia adjuvante, principalmente associada à cirurgia (90,0%). A maioria dos casos com recorrência locorregional não apresentou metástase linfonodal (90,0%) ou metástase à distância (70,0%).

Nos pacientes com recidiva locorregional, PNI (S100+) esteve presente em 7 casos (70,0%). Desses, todos apresentaram padrão de invasão intraneural, mostrando resultado significativo ($p=0,001$).

A análise multivariada (Tabela 11) mostrou que, tumores bem diferenciados e moderadamente diferenciados PNI (S100+), têm maior chance de recidiva locorregional nos CECs orais, independentemente do estadiamento (Gráfico 10).

Tabela 11 - Análise multivariada para identificação dos fatores associados à recidiva locorregional (n = 39)

Variáveis	Modelo cheio		Modelo final		
	C	p*	C	p*	OR (IC _{95%})
Tamanho (Ref. T1)					
T2	19,3	0,999	-	-	-
T3 e T4	17,9	0,999	-	-	-
Estadiamento (Ref. III/IV)					
Estadiamento I	21,0	0,999	3,6	0,019	36,1 (1,8; 718,6)
Estadiamento II	0,8	0,619	1,5	0,145	4,5 (0,6; 34,1)
Grau Histológico (Ref. Bem Diferenciado)					
Moderadamente Diferenciado	2,4	0,126	2,0	0,056	7,3 (1,0; 56,6)
PNI S100 (Ref. Ausente)					
Presente	1,8	0,177	2,2	0,051	9,0 (1,0; 80,8)
Quantidade de Ki67 (Ref. ≤ 25%)					
26% - 50%	1,0	0,619	-	-	-
>50%	-0,7	0,722	-	-	-

Ref., referência; C, coeficiente; PNI, invasão perineural.

*As probabilidades de significância referem-se ao teste de Wald da Regressão Logística.

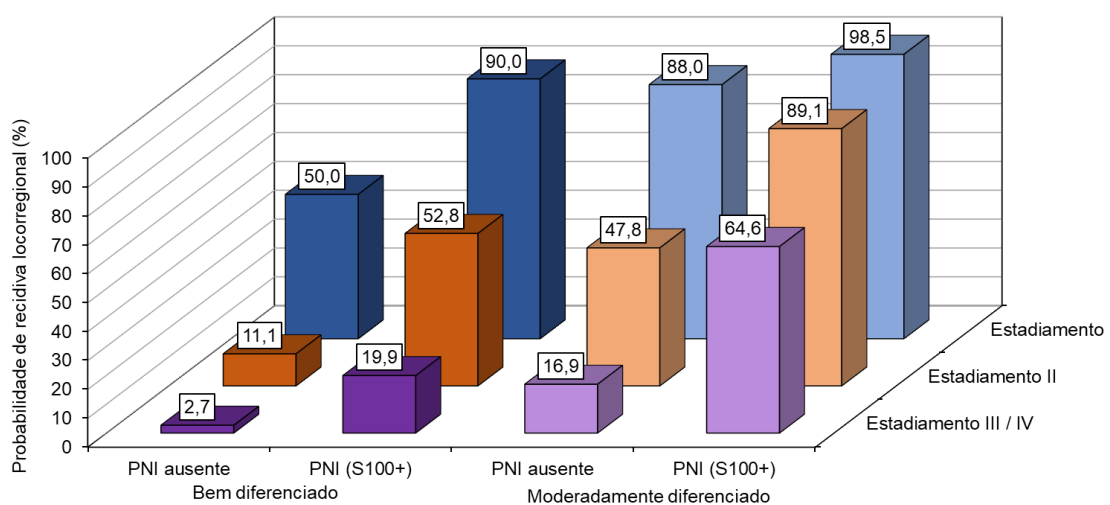
Parâmetros do modelo: Sensibilidade → 60,0%; Especificidade → 89,7%.

Fonte: Elaboração própria.

Onze (28,2%) pacientes com CEC oral apresentaram metástase linfonodal, a maioria N1 e N2. Os homens representaram 91,0% desses casos e 75,0% dos pacientes tinham idade igual ou menor a 50 anos. Além disso, observamos diminuição progressiva da prevalência com o aumento da idade. O CEC de língua representou 54,4% de todos os pacientes com metástase linfonodal. Os tumores iniciais

(estadiamento I e II), não apresentaram nenhum caso com metástase linfonodal, diferentemente dos estadiamentos III e IV com 4 e 7 casos, respectivamente, sendo um resultado significativo ($p=0,001$). PNI (S100+) esteve presente na maioria dos casos com metástase linfonodal (54,5%), sendo mais prevalente o envolvimento total do nervo (37,5%).

Gráfico 10 - Probabilidade de recidiva locorregional



Probabilidade de o paciente apresentar recidiva locorregional segundo o grau histológico, PNI e estadiamento tumoral.

Fonte: Elaboração própria.

A correlação entre imunomarcção com anti-Ki67 e pacientes com metástase linfonodal apresentou resultados significativos, sendo alta intensidade de Ki67 ($p=0,002$), quantidade $>51\%$ de Ki67 ($p=0,012$) e alto escore (9-12) para Ki67 ($p<0,001$) mais prevalentes nesses casos.

A análise estatística multivariada (Tabela 12) mostrou que pacientes ≤ 50 anos, com CEC de língua e com baixo ou moderado escore para Ki67 têm 83,8% de chance de apresentar metástase linfonodal, e casos com alto escore para Ki67 têm ainda mais chance, independentemente da idade (Gráfico 11).

Tabela 12 - Análise multivariada para identificação dos fatores associados à metástase linfonodal (n = 39)

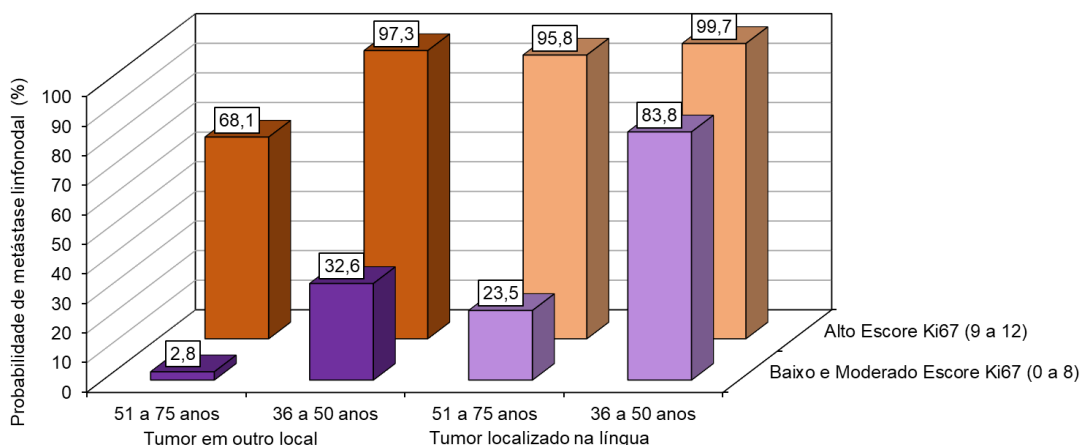
Variáveis	Modelo cheio		Modelo final		
	C	p*	C	p*	OR (IC _{95%})
Idade (Ref. 51 - 75 anos)					
36 - 50 anos	2,4	0,179	2,8	0,082	16,8 (0,7; 406,9)
Localização (Ref. demais locais)					
Língua	2,1	0,133	2,4	0,073	10,7 (0,8; 142,2)
Tratamento (Ref. demais tratamentos)					
Cirurgia + Rxt + Qxt	0,9	0,532	-	-	-
Escore de Ki67 (Ref. 0 - 8)					
Escore 9 - 12	4,1	0,002	4,3	0,002	74,3 (4,9; 1.135,8)

Ref., referência; C, coeficiente.

*As probabilidades de significância referem-se ao teste de Wald da Regressão Logística.
Parâmetros do modelo: Sensibilidade → 81,8%; Especificidade → 92,9%.

Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 11 - Probabilidade de metástase linfonodal



Probabilidade de o paciente apresentar metástase linfonodal segundo a localização, idade e escore de Ki67.

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

A incidência de PNI nos CEC orais tem se mostrado variada ao longo dos anos com taxas entre 4,1% e 82,0%^{4,8,11,22,23,36,57,59}, principalmente por conta das várias formas de padrão diagnóstico e uso de imunohistoquímica auxiliar.

Em nosso estudo, analisamos a presença de PNI nos CECs orais por três formas distintas. As incidências de PNI se mostraram diferentes de acordo com o método utilizado revelando valores concordantes com a literatura. Nossa amostra iniciou-se com 310 laudos histopatológicos analisados em H&E. Dessa amostra inicial apenas 29 casos apresentavam descrição de PNI positivo, uma taxa de 9,3%. Dessa amostra, nos foram cedidos para análise 39 casos (peças cirúrgicas), os quais foram cortados em cortes de 4µM corados em H&E e marcados com imuno-histoquímica para Ki67 e S100. Após a revisão destes casos, 17,9% se mostraram positivos para PNI no H&E (n=7) e 51,3% (n=20) positivos para PNI com auxílio da imuno-histoquímica para S100.

O diagnóstico de PNI utilizando apenas coloração em H&E têm mostrado menores taxas. Spoerl et al.²² investigaram a presença de PNI em 493 CECs orais, mostrando uma incidência de PNI de 9,7% (n=48), enquanto Huang et al.⁵⁷ observaram uma incidência ainda menor, de 6,1% em 148 tumores investigados. Esses dois estudos não reavaliaram os espécimes das biópsias e nem utilizaram imuno-histoquímica. Low et al.²³ reavaliaram os espécimes das biópsias em H&E e revelaram as menores taxas de incidência de PNI (4,1%). Entretanto, incluíram em seu estudo uma amostra específica, apenas tumores de língua ou assoalho de boca classificados como T1N0 e tratados cirurgicamente. A reavaliação das peças cirúrgicas em coloração H&E mostrou aumento de quase 2 vezes no número de casos PNI positivos^{36,59}, e esses dados aumentaram ainda mais com a utilização da imuno-histoquímica^{8,36,59}.

O uso de imunocoloração para S100 em nosso estudo aumentou significativamente o número de casos PNI positivos (p=0,004), mostrando resultado quase 3 vezes maior, passando de 7 (17,9%) casos em H&E, para 20 (51,3%) casos com S100. Schmitd et al.⁸ e Shen et al.⁵⁹ descreveram aumento de 22,5% e 39,0% em H&E, para 33,8% e 51,0% com o uso da imuno-histoquímica para S100, respectivamente. Resultados semelhantes foram descritos por Kurtz et al.³⁶, revelando incidência de PNI de 62,0% em H&E, aumentando para 82,0% com o uso

da imuno-histoquímica para S100. De fato, a imuno-histoquímica com anti-S100 tem sido descrita como o método de maior acurácia no diagnóstico de PNI^{8,36,59}. Portanto, apenas os casos diagnosticados com auxílio da imunocoloração para S100 e Ki67 (n=39) (Tabelas 5 e 6) entraram na discussão a seguir, com exceção da sobrevida (n=128) (Tabela 4).

Diversos estudos relacionaram PNI com variáveis clínico-patológicas. Shen et al.⁵⁹ mostraram que tumores menores (T1 e T2) representaram a maioria (69,5%) dos casos positivos para PNI. Além disso, 32 (72,7%) dos 44 tumores em estadiamento III e IV, e 23 (76,6%) dos 30 casos com metástase linfonodal, relevaram a presença de PNI. Os estudos de Alkhadar et al.¹¹ e Kurtz et al.³⁶ corroboram com a maioria desses resultados, mostrando que tumores em estadiamento avançado e pacientes com linfonodos comprometidos, apresentaram maiores porcentagens de PNI. Entretanto, Alkhadar et al.¹¹ observaram que 23,0% (n=18) dos casos positivos para PNI eram representados por tumores maiores (T4), enquanto apenas 7,3% (n=26) dos casos sem PNI tinham esse tamanho. Nair et al.⁴ também observaram a prevalência de PNI em tumores maiores (T3 e T4) e em casos com metástase linfonodal. Em nosso trabalho, os resultados mostraram que tumores T2, T3 e T4 tiveram uma prevalência de PNI muito semelhantes, com maior porcentagem em tumores T2 (56,3%). De outra parte, nos tumores T1 (n=5), apenas 20% (n=1) apresentou PNI. Além disso, observamos maiores porcentagens de PNI em tumores N2 (60,0%) e N3 (100,0%) e menor nos tumores N1 (40,0%), este que mostrou uma prevalência de PNI menor que tumores N0 (50,0%). Dos tumores em estadiamento III, 5 (71,4%) dos 7 casos mostraram PNI, representando o estágio com maior porcentagem de casos PNI positivos.

Todos os pacientes (100,0%) com idade igual ou menor a 50 anos apresentaram PNI em nosso estudo (n=4). Nessa faixa etária, apesar de não significativa, a porcentagem de casos PNI positivos foi mais que o dobro comparado com os pacientes com mais de 50 anos (46,0%). No estudo de Shen et al.⁵⁹, mais da metade (55,2%) dos pacientes ≤50 anos apresentaram PNI, além de representarem o grupo com o maior número de casos positivos para PNI (n=32). Já Laske et al.¹⁹ observaram que apenas 6 (35,3%) dos 17 pacientes com PNI tinham ≤50 anos.

Em 2018, Baumeister et al.⁶¹ investigaram a relação entre PNI e o uso de tabaco em 178 casos de CEC de cabeça e pescoço, representados em sua maioria por tumores de cavidade oral e orofaringe (90,4%). Os autores mostraram que PNI foi

detectada mais frequentemente em pacientes fumantes (34,7%) e ex-fumantes (26,1%), quando comparados a não fumantes (10,3%). Curiosamente, embora não significativa ($p=0,182$), revelamos que pacientes fumantes + etilistas mostraram chance cerca de 2 vezes maior de apresentar PNI comparados a pacientes não expostos a esses fatores de risco, ou a pacientes apenas tabagistas, corroborando com este estudo.

Embora não demonstrada em outros trabalhos^{4,8,11,22,36,59}, a recidiva locorregional associada a PNI apresentou resultados significativos em nosso estudo. Dentre os pacientes com recorrências ($n=10$), 7 (70,0%) pacientes eram PNI-positivos, em todos os casos, PNI intraneural, demonstrando significância estatística em comparação a invasões $>33\%$ ou envolvimento total do nervo ($p=0,001$). Tal associação também foi observada de forma significativa por Aivazian et al.³⁹, entretanto apenas em casos com nervos $>1\text{mm}$ acometidos e PNI de forma multifocal. Laske et al.¹⁹ mostraram 10 casos (58,8%) com recorrência locorregional em 17 pacientes positivos para PNI, dos quais dois casos invadiram o endoneuro.

De forma interessante, nossa amostra demonstrou maioria de pacientes do gênero feminino em estádios I e II (66,7%), mas quatro (66,7%) das seis mulheres incluídas no estudo apresentaram recidiva locorregional, representando um número muito maior quando comparado a taxa de recorrência geral do estudo (25,6%). Esses dados nos mostraram que pacientes do gênero feminino tem 9 vezes mais chance de apresentar recidiva locorregional do que homens ($p=0,028$), o que se mostra mais importante ainda considerando que os tumores eram iniciais. Além disso, é importante ressaltar que 75,0% ($n=3$) das mulheres com recorrência eram positivas para PNI, todas de forma intraneural.

Autores tem discutido se o diâmetro do nervo invadido pelas células tumorais teria relevância clínica, especialmente PNI em nervos menores, com diâmetro $<1\text{mm}$. Brandwein-Gensler et al.⁵⁸ e Aivazian et al.³⁹ associaram a presença de PNI em nervos $>1\text{mm}$ de diâmetro com recorrência locorregional e baixa taxa de sobrevida, sendo um fator preditivo para esses desfechos no CEC oral. De outra parte, Schmitd et al.⁸ mostraram PNI acometendo principalmente nervos pequenos ($<1\text{mm}$ de diâmetro), e mesmo assim, PNI impactou na sobrevida dos pacientes. Nosso estudo não considerou o tamanho dos nervos invadidos, entretanto 16 (80,0%) pacientes positivos para PNI foram detectados apenas pela imunocoloração (S100), não sendo detectados pela coloração H&E. Desses, 7 (43,7%) casos com PNI apresentaram

recidiva locorregional, sendo 5 (71,4%) tumores em estágio inicial (4 casos T2N0M0 e 1 caso T1N0Mx). De fato, considerando PNI como fator preditivo para recorrência locorregional e o aumento significativo de casos positivos de PNI diagnosticados pela imuno-histoquímica, sugerimos o uso de imunocoloração no diagnóstico de PNI, independentemente do tamanho do nervo.

Finalmente, diversos estudos têm relacionado sobrevida com PNI, e a presença de PNI no CEC oral parece diminuir ainda mais a taxa de sobrevida dos pacientes. No estudo de Spoerl et al.²², os valores de sobrevida global e sobrevida livre da doença revelaram redução significativa em pacientes com PNI. Casos negativos para PNI mostraram sobrevida global e livre da doença em 5 anos de 67,0% e 60,6% respectivamente, enquanto pacientes positivos para PNI apresentaram taxas de 38,8% para sobrevida global e 42,0% para sobrevida livre da doença. Laske et al.¹⁹ observaram diminuição de 30,3% na sobrevida global e 33,3% na sobrevida livre da doença em 5 anos em pacientes que apresentaram PNI no CEC oral. Subramaniam et al.²⁰ revelaram que pacientes com PNI mostraram menores taxas de sobrevida global tanto em tumores T1 (75%), quanto em tumores T2 (50%), comparados a pacientes negativos para PNI, com taxas de 90,0% e 77,0%, respectivamente. Schmitd et al.⁸ revelaram menores taxas de sobrevida global e livre da doença associadas a presença de PNI, embora não significativas. Zanoni et al.³ relataram que PNI pode ser considerada um preditor independente tanto na sobrevida global, quanto na sobrevida livre da doença em 5 anos.

Nosso trabalho mostrou uma taxa de sobrevida global em 5 anos extremamente baixa, cerca de 28,1%, e tal fato pode ser explicado pelo elevado número de casos em estádios mais avançados (76,5%) incluídos nessa análise. Entretanto, a presença de PNI nos tumores não revelou diferenças significativas, e pacientes com e sem PNI apresentaram taxas de sobrevida muito semelhantes, cerca de 28,5% e 28,0% respectivamente.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia proposta e os resultados obtidos, podemos concluir que:

- a) A análise histológica dos CECs orais com auxílio de imuno-histoquímica para S100 melhora a acurácia diagnóstica de PNI, reduzindo os erros alfa e beta.
- b) Alto escore de Ki67 no CEC oral pode ser considerado fator preditivo de metástase linfonodal.
- c) PNI intraneural no CEC oral pode ser considerada fator preditivo para recidiva locorregional.
- d) As taxas de sobrevida dos pacientes positivos e/ou negativos para PNI foram extremamente baixas, entretanto não mostraram diferenças significativas entre si.

REFERÊNCIAS*

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3): 209-49.
2. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(5): 401-21.
3. Zanoni DK, Montero PH, Migliacci JC, Shah JP, Wong RJ, Ganly I, et al. Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015). *Oral Oncol.* 2019; 90: 115-21.
4. Nair D, Mair M, Singhvi H, Mishra A, Nair S, Agrawal J, et al. Perineural invasion: independent prognostic factor in oral cancer that warrants adjuvant treatment. *Head Neck.* 2018; 40(8): 1780-7.
5. Binmadi NO, Basile JR. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: a discussion of significance and review of the literature. *Oral Oncol.* 2011; 47(11): 1005-10.
6. Misztal CI, Green C, Mei C, Bhatia R, Velez Torres JM, Kamrava B, et al. Molecular and cellular mechanisms of perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: potential targets for therapeutic intervention. *Cancers (Basel).* 2021; 13(23): 6011.
7. Batsakis JG. Nerves and neurotropic carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1985; 94(4 Pt 1): 426-7.
8. Schmitd LB, Beesley LJ, Russo N, Bellile EL, Inglehart RC, Liu M, et al. Redefining perineural invasion: integration of biology with clinical outcome. *Neoplasia.* 2018; 20(7): 657-67.
9. Brown B, Barnes L, Mazariegos J, Taylor F, Johnson J, Wagner RL. Prognostic factors in mobile tongue and floor of mouth carcinoma. *Cancer.* 1989; 64(6): 1195-202.
10. Conte CC, Ergin MT, Ricci A, Jr., Deckers PJ. Clinical and pathologic prognostic variables in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg.* 1989; 157(6): 582-4.
11. Alkhadar H, Macluskey M, White S, Ellis I. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: Incidence, prognostic impact and molecular insight. *J Oral Pathol Med.* 2020; 49(10): 994-1003.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

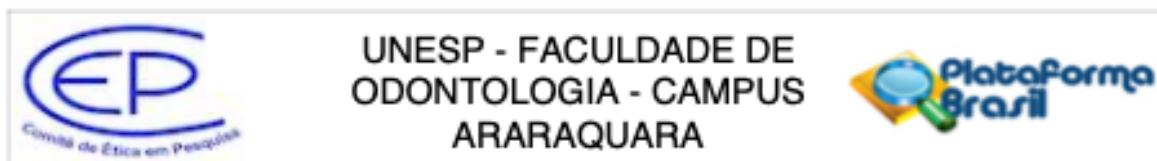
12. Schmitd LB, Scanlon CS, D'Silva NJ. Perineural invasion in head and neck cancer. *J Dent Res.* 2018; 97(7): 742-50.
13. Chen YW, Yu EH, Wu TH, Lo WL, Li WY, Kao SY. Histopathological factors affecting nodal metastasis in tongue cancer: analysis of 94 patients in Taiwan. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 37(10): 912-6.
14. Bonifazi M, Malvezzi M, Bertuccio P, Edefonti V, Garavello W, Levi F, et al. Age-period-cohort analysis of oral cancer mortality in Europe: the end of an epidemic? *Oral Oncol.* 2011; 47(5): 400-7.
15. Chatzistefanou I, Lubek J, Markou K, Ord RA. The role of perineural invasion in treatment decisions for oral cancer patients: A review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017; 45(6): 821-5.
16. Perea LME, Antunes JLF, Peres MA. Oral and oropharyngeal cancer mortality in Brazil, 1983-2017: age-period-cohort analysis. *Oral Dis.* 2022; 28(1): 97-107.
17. Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Faratzis G, Stavrianos SD, Vilos GA, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Clinicopathological analysis of 23 patients and review of the literature. *Oral Oncol.* 2005; 41(3): 328-35.
18. Amit M, Na'ara S, Gil Z. Mechanisms of cancer dissemination along nerves. *Nat Rev Cancer.* 2016; 16(6): 399-408.
19. Laske RD, Scholz I, Ikenberg K, Meerwein C, Vital DG, Studer G, et al. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the oral cavity: histology, tumor stage, and outcome. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2016; 1(1): 13-8.
20. Subramaniam N, Murthy S, Balasubramanian D, Low TH, Vidhyadharan S, Clark JR, et al. Adverse pathologic features in T1/2 oral squamous cell carcinoma classified by the American Joint Committee on Cancer eighth edition and implications for treatment. *Head Neck.* 2018; 40(10): 2123-8.
21. Carrillo JF, Carrillo LC, Cano A, Ramirez-Ortega MC, Chanona JG, Aviles A, et al. Retrospective cohort study of prognostic factors in patients with oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2016; 38(4): 536-41.
22. Spoerl S, Spoerl S, Reil S, Gerken M, Ludwig N, Taxis J, et al. Prognostic value of perineural invasion on survival and recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Diagnostics (Basel).* 2022; 12(5): 1062.
23. Low TH, Gao K, Gupta R, Clifford A, Elliott M, Ch'ng S, et al. Factors predicting poor outcomes in T1N0 oral squamous cell carcinoma: indicators for treatment intensification. *ANZ J Surg.* 2016; 86(5): 366-71.
24. Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, Anzai Y, Brizel DM, et al. Head and neck cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2020; 18(7): 873-98.
25. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Câncer e consumo de álcool. Rio de Janeiro: INCA. 2022.

26. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Diagnóstico precoce do câncer de boca. Rio de Janeiro: INCA. 2022.
27. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2018.
28. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2020.
29. Rutkowska M, Hnitecka S, Nahajowski M, Dominiak M, Gerber H. Oral cancer: the first symptoms and reasons for delaying correct diagnosis and appropriate treatment. *Adv Clin Exp Med*. 2020; 29(6): 735-43.
30. Carlander AF, Jakobsen KK, Bendtsen SK, Garset-Zamani M, Lynggaard CD, Jensen JS, et al. A contemporary systematic review on repartition of HPV-positivity in oropharyngeal cancer worldwide. *Viruses*. 2021; 13(7): 1326.
31. Stolinski C. Structure and composition of the outer connective tissue sheaths of peripheral nerve. *J Anat*. 1995; 186 (Pt 1): 123-30.
32. Olsson Y. Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. *Crit Rev Neurobiol*. 1990; 5(3): 265-311.
33. Bakst RL, Wong RJ. Mechanisms of perineural invasion. *J Neurol Surg B Skull Base*. 2016; 77(2): 96-106.
34. Panizza BJ. An overview of head and neck malignancy with perineural spread. *J Neurol Surg B Skull Base*. 2016; 77(2): 81-5.
35. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998; 124(6): 637-40.
36. Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement. *Arch Pathol Lab Med*. 2005; 129(3): 354-9.
37. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*. 2009; 115(15): 3379-91.
38. Nagakawa T, Kayahara M, Ohta T, Ueno K, Konishi I, Miyazaki I. Patterns of neural and plexus invasion of human pancreatic cancer and experimental cancer. *Int J Pancreatol*. 1991; 10(2): 113-9.
39. Aivazian K, Ebrahimi A, Low TH, Gao K, Clifford A, Shannon K, et al. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: quantitative subcategorisation of perineural invasion and prognostication. *J Surg Oncol*. 2015; 111(3): 352-8.

40. Caponio VCA, Troiano G, Togni L, Zhurakivska K, Santarelli A, Laino L, et al. Pattern and localization of perineural invasion predict poor survival in oral tongue carcinoma. *Oral Dis.* 2021; 29: 411-422.
41. Amit M, Binenbaum Y, Trejo-Leider L, Sharma K, Ramer N, Ramer I, et al. International collaborative validation of intraneural invasion as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 2015; 37(7): 1038-45.
42. Chi AC, Katabi N, Chen HS, Cheng YL. Interobserver Variation Among Pathologists in Evaluating Perineural Invasion for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2016; 10(4): 451-64.
43. Rodin AE, Larson DL, Roberts DK. Nature of the perineural space invaded by prostatic carcinoma. *Cancer.* 1967; 20(10): 1772-9.
44. Cavel O, Shomron O, Shabtay A, Vital J, Trejo-Leider L, Weizman N, et al. Endoneurial macrophages induce perineural invasion of pancreatic cancer cells by secretion of GDNF and activation of RET tyrosine kinase receptor. *Cancer Res.* 2012; 72(22): 5733-43.
45. Huang L, Xu X, Hao Y. The possible mechanisms of tumor progression via CSF-1/CSF-1R pathway activation. *Rom J Morphol Embryol.* 2014; 55(2 Suppl): 501-6.
46. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* 2011; 8: 110.
47. Demir IE, Boldis A, Pfitzinger PL, Teller S, Brunner E, Klose N, et al. Investigation of Schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion. *J Natl Cancer Inst.* 2014; 106(8): 184.
48. Ayala GE, Wheeler TM, Shine HD, Schmelz M, Frolov A, Chakraborty S, et al. In vitro dorsal root ganglia and human prostate cell line interaction: redefining perineural invasion in prostate cancer. *Prostate.* 2001; 49(3): 213-23.
49. Hulse RP, Wynick D, Donaldson LF. Activation of the galanin receptor 2 in the periphery reverses nerve injury-induced allodynia. *Mol Pain.* 2011; 7: 26.
50. Banerjee R, Henson BS, Russo N, Tsodikov A, D'Silva NJ. Rap1 mediates galanin receptor 2-induced proliferation and survival in squamous cell carcinoma. *Cell Signal.* 2011; 23(7): 1110-8.
51. Scanlon CS, Banerjee R, Inglehart RC, Liu M, Russo N, Hariharan A, et al. Galanin modulates the neural niche to favour perineural invasion in head and neck cancer. *Nat Commun.* 2015; 6: 6885.
52. Gil Z, Cavel O, Kelly K, Brader P, Rein A, Gao SP, et al. Paracrine regulation of pancreatic cancer cell invasion by peripheral nerves. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(2): 107-18.

53. Chuang JY, Tsai CF, Chang SW, Chiang IP, Huang SM, Lin HY, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration in human oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2013; 49(12): 1103-12.
54. Rodolico V, Barresi E, Di Lorenzo R, Leonardi V, Napoli P, Rappa F, et al. Lymph node metastasis in lower lip squamous cell carcinoma in relation to tumour size, histologic variables and p27Kip1 protein expression. *Oral Oncol.* 2004; 40(1): 92-8.
55. Nair S, Singh B, Pawar PV, Datta S, Nair D, Kane S, et al. Squamous cell carcinoma of tongue and buccal mucosa: clinico-pathologically different entities. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016; 273(11): 3921-8.
56. Liao CT, Chang JT, Wang HM, Ng SH, Hsueh C, Lee LY, et al. Does adjuvant radiation therapy improve outcomes in pT1-3N0 oral cavity cancer with tumor-free margins and perineural invasion? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 71(2): 371-6.
57. Huang TY, Hsu LP, Wen YH, Huang TT, Chou YF, Lee CF, et al. Predictors of locoregional recurrence in early stage oral cavity cancer with free surgical margins. *Oral Oncol.* 2010; 46(1): 49-55.
58. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29(2): 167-78.
59. Shen WR, Wang YP, Chang JY, Yu SY, Chen HM, Chiang CP. Perineural invasion and expression of nerve growth factor can predict the progression and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2014; 43(4): 258-64.
60. Lee LY, De Paz D, Lin CY, Fan KH, Wang HM, Hsieh CH, et al. Prognostic impact of extratumoral perineural invasion in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 2019; 8(14): 6185-94.
61. Baumeister P, Welz C, Jacobi C, Reiter M. Is perineural invasion of head and neck squamous cell carcinomas linked to tobacco consumption? *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018; 158(5): 878-81.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Invasão perineural e correlação com sobrevida em carcinomas espinocelulares orais

Pesquisador: Cleverton Roberto de Andrade

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 38707119.3.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.545.832

Apresentação do Projeto:

Trata-se da apresentação do projeto de pesquisa cujo resumo consta: "O comportamento do prognóstico do carcinoma espinocelular (CEC) oral é afetado por muitos fatores e o prognóstico é crítico na decisão de quais tratamentos serão instituídos. Dentre esses fatores destacam-se o estadiamento clínico e histopatológico, o tipo histológico, invasão de tecidos circunvizinhos e até mesmo a condição sistêmica do paciente. A terapia combinada, usualmente instituída, inclui ressecção cirúrgica e radioterapia e/ou quimioterapia. Especificamente quanto à invasão de tecidos circunvizinho, recentemente foi caracterizada (quantificada e qualificada) a invasão perimetral (IPN). No entanto, sua implicação clínica ainda é controversa e novas pesquisas clínico-patológicas podem estabelecer ou refutar a sua correlação prognóstica. O objetivo de nossa pesquisa é realizar uma análise quantitativa e qualitativa de IPN, através de estudo histopatológico de 200 casos, incluindo o número de IPN (unifocal vs multifocal), o tamanho de IPN, e a localização de IPN nos CECs de cavidade oral tratados no Hospital Bom Pastor (HBP)- FOMUV na cidade de Varginha-MG (2004 a 2014). Serão utilizados os marcadores S100 e AE1/AE3. Os critérios de inclusão dos tumores incluirão (1) CEC de cavidade oral primário com um mínimo de 5 anos de seguimento, (2) pacientes primeiramente tratados e acompanhados no hospital HBP, (3) espécimes cirúrgicos/patológicos completos e (4) dados completos de acompanhamento clínico-patológico disponíveis. A taxa de sobrevida e o teste log-rank serão calculados pelo método de Kaplan-Meier e dados como a idade, gênero, localização primária, recorrência, metástase loco-regional (nodal),

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Telefone: (16)3301-6459

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.901-903

E-mail: cep@foar.unesp.br

**Não autorizo a reprodução deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de
defesa**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 06 de fevereiro de 2023.

Alexandre Augusto Sarto Dominguette