



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

BRUNO EDUARDO ARRUDA ALVES

**Análise Fractal como Ferramenta Complementar no Diagnóstico de Carcinoma
Mucoepidermóide e Carcinoma Espinocelular Oral**

Recife - PE
2022

BRUNO EDUARDO ARRUDA ALVES

**Análise Fractal como Ferramenta Complementar no Diagnóstico de Carcinoma
Mucoepidermóide e Carcinoma Espinocelular Oral**

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Morfotecnologia. Área de concentração: “Métodos Clássicos e Avançados”.

Orientador: Prof^a. Dra. Juliana Pinto de Medeiros.

Coorientador: Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes.

Recife - PE

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Alves, Bruno Eduardo Arruda

Análise fractal como ferramenta complementar no diagnóstico de carcinoma mucoepidermóide e carcinoma espinocelular oral / Bruno Eduardo Arruda Alves. – 2022.

33 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Pinto de Medeiros.

Coorientador: Prof.Dr. Thiago de Salazar e Fernandes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Câncer. 2. Faringe - Câncer. 3. Boca - Câncer. I. Medeiros, Juliana Pinto de (orientadora). II. Fernandes, Thiago de Salazar e (coorientador). III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB - 2022-142

BRUNO EDUARDO ARRUDA ALVES

“Análise Fractal como ferramenta complementar no diagnóstico de Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma espinocelular Oral”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 24/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Juliana Pinto de Medeiros
(Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia de Souza
(Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes
(Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Eduardo Eudes Nóbrega de Araújo
(Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

¹Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife-PE - Brasil, 50670-901, Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE. Fone: (81) 2126.8515. Sítio: <https://www.ufpe.br/ppgm>

RESUMO

Atualmente existem vários métodos de diagnóstico para neoplasias localizadas na boca e orofaringe, como os carcinomas espinocelular (CEC) e o mucoepidermóide (CME), a exemplo de radiografias, tomografias e ultrassonografias. No entanto, métodos morfométricos atuais que avaliam a textura por meio da dimensão fractal podem vir a ser ferramentas complementares e objetivas para se mensurar a alteração dessas estruturas, auxiliando no diagnóstico de alterações como melanomas, cânceres de mama e linfomas. O objetivo desse trabalho foi determinar a dimensão fractal histopatológica do CME e CEC. Foram utilizadas lâminas de CEC, CME e de tecidos saudáveis. Utilizaram lâminas de cada caso de CEC e CME do Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, no laboratório de Patologia Oral UFPE. Utilizou-se a técnica morfométrica de dimensão fractal pelo método de “*Box-Counting*”. A análise da dimensão fractal do núcleo entre os grupos CME de baixo e grau intermediário, mostrou a ausência de diferença significativa entre os grupos analisados. Com relação às médias da dimensão fractal do núcleo entre os grupos controle e CEC moderadamente e bem diferenciado, a análise demonstrou que houve diferença significativa entre os grupos controle e o CEC moderadamente diferenciado 40x, com $p < 0,05$. Também foi identificado que houve diferença significativa entre o controle e o CEC bem diferenciado 40x, com $p < 0,001$. Não foi identificada significância estatística entre os grupos CEC moderadamente diferenciado 40x e o CEC bem diferenciado 40x. Portanto, diante dos achados podemos sugerir que a dimensão fractal nuclear é uma ferramenta que pode auxiliar no diagnóstico de forma mais rápida.

Palavra-chaves: Carcinoma Mucoepidermóide; Carcinoma Espinocelular Oral; Dimensão fractal; Morfometria.

ABSTRACT

Currently there are several methods of diagnosis for neoplasms located in the mouth and oropharynx, such as squamous cell carcinomas (SCC) and mucoepidermoid carcinomas (MEC), such as radiography, tomography and ultrasonography. However, current morphometric methods that evaluate the texture by means of fractal dimension may become complementary and objective tools to measure the alteration of these structures, helping in the diagnosis of alterations such as melanomas, breast cancers and lymphomas. The objective of this work was to determine the histopathological fractal dimension of SCC and SCC. SCC, SME and healthy tissue slides were used. Slides from each case of SCC and SCC from the Department of Clinical and Preventive Dentistry, in the UFPE Laboratory of Oral Pathology, were used. The morphometric technique of fractal dimension was used by the "Box-Counting" method. The analysis of the fractal dimension of the nucleus between the low and intermediate degree CME groups showed the absence of significant difference between the groups analyzed. Regarding the averages of the fractal dimension of the nucleus between the control and moderately and well differentiated SCC groups, the analysis showed that there was a significant difference between the control groups and the moderately differentiated 40x SCC, with $p < 0.05$. It was also identified that there was a significant difference between the control and the well-differentiated 40x SCC, with $p < 0.001$. No statistical significance was identified between the groups CPB moderately differentiated 40x and CPB well differentiated 40x. Therefore, in view of the findings we can suggest that the nuclear fractal dimension is a tool that can help diagnose more quickly.

Keywords: mucoepidermoid carcinoma; oral squamous cell carcinoma; fractal dimension; morphometry

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1	Carcinoma Mucoepidermóide	9
2.2	Carcinoma Espinocelular oral	11
2.3	Análise Fractal de Células Cancerígenas	13
3	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivos gerais	15
3.2	Objetivos específicos	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	Comitê de ética	16
4.2	Delineamento experimental	16
4.3	Obtenção de imagens	16
4.4	Análise de Dimensão	16
4.5	Análises de Estatísticas	17
5	ARTIGO 1 - Fractal analysis as a complementary tool in the diagnosis of mucoepidermoid carcinoma (MEC) and oral squamous cell carcinoma (OSCC)	18
6	CONCLUSÃO	27
7	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

De acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para cada ano do biênio 2020-2021, serão diagnosticados, no Brasil, 15.810 novos casos de câncer de boca, sendo o 5º mais frequente entre homens e o 13º entre mulheres, em 2020 com estimativa de 15.210 novos casos. Em 2018, foram estimados 354.864 casos novos de cânceres de lábio e cavidade oral no mundo, sendo responsáveis por 177.384 óbitos no mesmo período (BRAY *et al.*, 2018; INCA, 2021). O câncer de boca atinge uma faixa etária jovem, mas apresenta maior proporção dos casos entre as idades 40 e 60 anos, período em que os indivíduos ainda podem ser bastante produtivos (Borges *et al.*, 2009).

Dentre os cânceres de boca, o Carcinoma Espinocelular (CEC), também denominado de Carcinoma de Células Escamosas, é a neoplasia maligna que mais acomete a cavidade bucal e, quando não é diagnosticado precocemente, apresenta prognóstico comprometido. A cada ano, ocorrem 300.000 casos novos de CEC bucal, cada vez mais acometendo pacientes jovens (THOMSON, 2018). Seu quadro clínico inclui a presença de células escamosas, normalmente com endurecimento e infiltração periférica, podendo ou não estar acompanhada de manchas avermelhadas ou esbranquiçadas (VALLE *et al.*, 2016).

O método diagnóstico histopatológico de CEC é realizado pelo patologista de maneira subjetiva, não sendo empregados até hoje métodos computacionais de análise de imagens que auxiliem no diagnóstico e prognóstico da doença. Quando o diagnóstico não é realizado de maneira correta e precoce, cerca de 50% dos pacientes podem vir a óbito em um prazo de 5 anos (THOMSON *et al.*, 2018).

Do mesmo modo, o carcinoma mucoepidermóide (CME), considerado o tumor maligno de glândulas salivares mais comum e com sua etiologia desconhecida, também é diagnosticado a partir de observações anatomopatológicas subjetivas, sem a implementação de métodos matemáticos de análise de imagens (SANTOS *et al.*, 2012; THOMSON *et al.*, 2018). Esse tipo de carcinoma é caracterizado pelo crescimento intraósseo nos maxilares, sendo mais comum em mulheres de meia idade, com a mandíbula como a região mais acometida. Clinicamente, pode ocorrer de forma lenta, geralmente assintomática, associada à ulceração superficial e parestesia, podendo apresentar a coloração azul ou vermelha nas lesões (SANTOS *et al.*, 2012). Acometem frequentemente as glândulas salivares maiores, contudo, as glândulas menores também podem ser afetadas e, quando isso acontece, a região envolvida geralmente é o palato (PIRES *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2012).

Atualmente, existem vários métodos de diagnóstico para neoplasias localizadas em boca e orofaringe, a exemplo de radiografias, tomografias e ultrassonografias (BAGAN; SCULLY, 2008). Contudo, ainda se tem como padrão ouro para a confirmação de diagnóstico, a realização da biópsia associada à análise anatomopatológica subjetiva, realizada por patologista (FAVERO *et al.*, 2007).

Sabe-se que os cânceres se originam de alterações genéticas que, por vezes, repercutem na estrutura global da cromatina no núcleo das células, o que pode ser evidenciado como alterações morfológicas visíveis ao microscópio e descritas pelo patologista. No entanto, métodos morfométricos atuais que avaliam a textura por meio da dimensão fractal podem vir a ser ferramentas complementares e objetivas para se mensurar a alteração dessas estruturas, auxiliando no diagnóstico de alterações como melanomas, cânceres de mama e linfomas (METZE, 2013).

A análise fractal se baseia na irregularidade das estruturas que não possuem dimensões inteiras, tal qual a geometria euclidiana, e sim dimensões fracionárias que podem ser medidas por técnicas especiais, como o método de box-counting (contagem por caixas). Sendo assim, a dimensão fractal do núcleo da célula forneceria um valor numérico que estaria associado à lesão ou mesmo ao estadiamento (METZE, 2013). Nesse sentido, o cálculo da dimensão fractal histopatológica se mostra como uma ferramenta com potencial para auxiliar o patologista no diagnóstico de CEC e CME, permitindo, desta forma, que valores de dimensão possam ser associados ao tipo de câncer e ao seu grau de estadiamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma Mucoepidermóide

O carcinoma mucoepidermóide é a neoplasia maligna de glândula salivar mais comum descrita na literatura, representando 7% a 11% dos tumores de glândulas salivares, tendo uma predileção da segunda até a sétima década de vida, ocorrendo raramente na primeira década, apesar de ser a neoplasia maligna de glândula salivar mais comum em crianças (Barradas, Queila *et al.*, 2018; Menezes, Pedro Henrique *et al.*, 2020). Frente a uma análise mais tardia, Jiménez Rodríguez, Yuniesky *et al.*, (2021) identificaram que de um total de 189 pacientes tratados foram revisados, com um total de 189 lesões. Houve maior incidência em mulheres (54,49%) e o carcinoma mucoepidermóide foi o tumor maligno mais predominante (32,69%).

A etiologia do CME ainda é desconhecida, no entanto, pode estar associada a fatores genéticos, ao tabaco ou a exposição à radiação ionizante. Frente a translocação gênica, t (11; 19) (q21; p13.1), foi identificada como uma anormalidade solitária em alguns casos de CME e pode ser um evento precoce na patogênese. A clonagem dessa translocação levou à identificação de um transcrito de fusão do exon 1 de um novo gene denominado MECT1 (Bell *et al.*, 2013). O gene MECT1 é de função desconhecida em 10p12-13, com exons de 2% a 5% da família de genes do tipo mastermindlike (MAML2) em 11q21 (Kang *et al.*, 2017). O transcrito é um coativador do gene notch e um mecanismo recém-descoberto de tumorigênese. Pela reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), o transcrito foi identificado em 2 de 4 tecidos CME e era indetectável em tecidos normais, indicando uma associação entre este transcrito e CME (Perez-De- Oliveira *et al.*, 2020).

A glândula parótida (48% dos casos) constitui a localização preferencial dessa lesão, sendo as glândulas salivares menores (35%) o segundo local. Usualmente se apresenta como um aumento de volume assintomático, podendo ser confuso clinicamente com uma mucocèle, quando nas glândulas salivares menores, e a presença da lesão costuma ser percebida com um ano ou menos de evolução (Barradas, Queila *et al.*, 2018; Schwars *et al.*, 2011). O palato e a mucosa bucal são os locais mais frequentes nas glândulas salivares menores, seguidos do antro, língua, gengiva, assoalho da boca e cavidade nasal. Uma origem ectópica de glândula salivar nos linfonodos próximos da parótida também foi observada. A localização anatômica mais incomum relatada seja a mandíbula e a maxila (Ettl *et al.*, 2012).

Os CMEs consistem em cerca de 15% de todos os tumores de glândulas salivares, porém são responsáveis por quase 30% de todas as neoplasias malignas de glândulas salivares, originando-se das glândulas principais (22%) e secundárias (41%), respectivamente. CME é o tumor maligno primário mais comum em adultos e crianças (Devaraju *et al.*, 2014). Em crianças, a maioria são neoplasias de baixo grau, porém, em adultos, os CMEs são mais comuns entre a terceira e a quinta décadas de vida (idade média de 45 anos). Há predileção 3:2 masculino: feminino, exceto para as lesões linguais, retro molares e intraósseas, sendo mais comuns em mulheres (Coca-Pelaz *et al.*, 2015).

Atualmente, um número significativo de CMEs são caracterizados por um coativador de transcrição regulado por proteína de ligação a elemento de resposta de AMP (Adenosina Monofosfato) cíclico, produto de fusão gênica que, inicialmente, foi pensado para ser limitado a CMEs de grau baixo e intermediário. Todavia, estudos mais recentes mostram sua prevalência também em CMEs de alto grau (Mchugh *et al.*, 2012).

Os CME são tumores firmes, lisos, frequentemente císticos, com cores que podem variar entre o castanho, branco ou rosado, com bordas bem definidas ou infiltrativas. Os tumores de baixo grau são muito semelhantes aos tumores císticos benignos. CMEs de grau intermediário e de alto grau são geralmente crescimentos infiltrativos e as formações císticas são menos pronunciadas (Qureshi *et al.*, 2012). Há estudos que observam variação de tamanho do tumor para menos de 1 cm a mais de 12 cm nas glândulas salivares maiores e até 5 cm nas glândulas menores (Joseph *et al.*, 2015; Techavichit *et al.*, 2016).

Histopatologicamente, é composto de uma mistura de células produtoras de muco, células escamosas (epidermóides), e também células intermediárias. As células mucosas apresentam formato variado, mas contêm um abundante citoplasma espumoso que se cora positivamente com colorações para mucina e as células epidermóides são caracterizadas por se assemelharem às células escamosas, geralmente demonstrando formato poligonal, pontes intercelulares e, raramente, ceratinização (Barradas, Queila *et al.*, 2018).

O tratamento do carcinoma mucoepidermóide é determinado pela localização, grau histopatológico e estágio clínico do tumor (Barradas, Queila *et al.*, 2018). Um dos principais modos de controlar a doença é a excisão completa da lesão com margens cirúrgicas livres, por apresentar o melhor controle local da doença. No entanto, a avaliação da seção de congelação das margens cirúrgicas CME pode ser difícil, devido à hiperplasia ductal, metaplasia escamosa no tecido da glândula salivar adjacente ao tumor e porque ilhas microscópicas de tumor podem se estender além

do tumor (Vander *et al.*, 2011). A radioterapia é indicada para carcinomas de alto grau, tumores de estágio III e IV, tumores com invasão perineural ou vascular extensa, tumores do lobo profundo da glândula parótida ou base da língua e tumores excisados incompletamente. Há muitas especulações sobre o papel da quimioterapia no tratamento do CME salivar, sendo em muitos casos não efetivo. Porém, com a chegada da terapia de alvo molecular, os carcinomas das glândulas salivares são um candidato ideal para ensaios clínicos (Lombardi *et al.*, 2017).

2.2 Carcinoma Espinocelular oral

O carcinoma espinocelular oral (CEC) corresponde a 95% dos tumores que acometem a cavidade bucal e apresenta uma taxa de sobrevida em 5 anos de aproximadamente 50%. Mesmo a incidência do câncer bucal mundial sendo altamente variável, aceita-se que a cavidade oral varia entre o sexto e a nona localização anatômica mais comum para o câncer, a depender principalmente do país (e até mesmo região específica em alguns países) e sexo dos pacientes (Campos, Paloma Santos de. 2020; Feller, Altini E Lemmer, 2013).

Apesar dessa incidência média, pode representar a localização mais comum de câncer em algumas regiões específicas, especialmente no sudeste da Ásia. Os principais fatores etiológicos e predisponentes para o CEC incluem, sobretudo, tabagismo, beber e radiação ultravioleta (especificamente para câncer de lábio), mas vários outros fatores, como papilomavírus humano (HPV) e infecções por *Candida*, deficiências nutricionais e predisposição genética também foram associados (Feller *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2017; Silveira, Heitor Albergoni., 2020). Foi identificado que entre os 383 pacientes incluídos com carcinomas espinocelulares orais, 17 (4,4%) eram HPV/mRNA-positivos (Melo, Bernardo Augusto de Carvalho *et al.*, 2021).

A incidência do CEC oral é maior em homens do que mulheres (M: F = 1,5: 1), provavelmente porque homens costumam desenvolver hábitos de alto risco com maior frequência. A probabilidade de desenvolver CEC oral aumenta com o período de exposição a fatores de risco e o aumento da idade acrescenta uma dimensão adicional às alterações mutagênicas e epigenéticas relacionadas à idade. Nos EUA, a idade média de diagnóstico de CEC oral é de 62 anos. Contudo, a incidência de CEC oral em pessoas com menos de 45 anos está aumentando em todo o mundo (Malik *et al.*, 2016; Oliveira, Jailce Alves *et al.*, 2021). A razão para isso ainda não é evidenciada claramente pelos pesquisadores. Uma série de condições foram associadas a um risco elevado de desenvolver CEC oral, incluindo síndrome de Li Fraumeni, síndrome de Plummer-Vinson, anemia de Fanconi, imunossupressão

induzida por quimioterapia de transplante de órgãos, disceratose congênita, xeroderma pigmentoso e lúpus eritematoso discoide (Khurshid *et al.*, 2018).

A superfície ventral da língua, assoalho da boca e lábio inferior são os locais mais comumente afetados pelo CEC, pois são revestidos por um epitélio fino não queratinizado. Assim, não apenas os carcinógenos penetram facilmente neste fino epitélio para atingir o compartimento da célula progenitora, pois, outros carcinógenos, particularmente produtos do tabaco e o álcool, constantemente se acumulam no assoalho da boca e ventre da língua. Isso resulta em estresse e perturbação celular, o que pode ocasionar a desregulação das suas funções normais (Jadhav e Gupta, 2013; Mamani, Laura Cruz *et al.*, 2021; Oliveira, Jailce Alves *et al.*, 2021; Vargas-Ferreira *et al.*, 2012).

Visando avaliar a prevalência de carcinomas espinocelulares de boca diagnosticados no Laboratório de Anatomopatologia Bucal da Unifal-MG, dos 270 pacientes avaliados, as lesões acometeram preferencialmente pacientes do gênero masculino (71,5%), leucodermas (61,5%), numa faixa etária que variou de 24 a 94 anos, com uma média de 59,7 anos; e se localizavam com maior frequência em assoalho bucal e borda lateral da língua. O tipo de lesão mais frequente foi a úlcera infiltrativa. CEC foi o diagnóstico mais frequente, observado em 145 pacientes (41,9%). A análise microscópica revelou que a maioria dos tumores apresentava acentuada queratinização, pleomorfismo Grau 2, padrão de invasão na forma de cordões grossos e infiltrado inflamatório peritumoral intenso. No somatório dos escores, houve um predomínio de tumores com valores entre 5 e 10 (72,2%). No período avaliado, houve um aumento no número de casos de CEC e uma expansão da área de cobertura do Serviço (Mamani, Laura Cruz *et al.*, 2021).

O CEC oral pode assumir várias características clínicas, podendo assemelhar-se a uma leucoplasia, uma leucoplasia verrucosa, uma eritroleucoplasia ou uma eritroplasia, podendo, eventualmente, constituir úlcera de aparência necrótica com bordas endurecidas elevadas e irregulares ou e

m uma massa exofítica de base ampla com uma textura superficial que pode ser verrucosa (Bagan, Sarrion e Jimenez, 2010; Oliveira, Jailce Alves *et al.*, 2021). O CEC oral geralmente é indolor, a menos que tenha uma infecção associada. Lesões grandes podem interferir na fala, mastigação ou deglutição (Dissanayaka *et al.*, 2012; Sheno *et al.*, 2012).

As metástases regionais são usuais, porém à distância são raramente observadas. Ambas impactam negativamente o prognóstico do paciente, contribuindo para a perda de controle e/ou possibilidade de cura da doença o que resulta em uma menor sobrevida, assim como em uma piora da qualidade de vida dos pacientes

acometidos. Portanto o seguimento do paciente oncológico ao longo do tempo é vital para detecção precoce de recorrência, assim como das metástases regionais e a distância (Oliveira, Jailce Alves *et al.*, 2021).

O tratamento convencional envolve cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. Objetiva-se, com isso, principalmente, erradicar o câncer, prevenir a recorrência e, na medida do possível, restaurar a forma e função das partes afetadas (Campos, Paloma Santos de. 2020; Murer *et al.*, 2011). A seleção de uma modalidade de tratamento específica é ditada pela natureza do carcinoma e pelo estado geral do paciente. Fatores importantes relacionados ao carcinoma incluem o local específico afetado, o tamanho clínico, a extensão da invasão local, características histopatológicas, envolvimento de linfonodo regional e metástase à distância. Os fatores do paciente incluem idade, estado geral de saúde, história de CEC oral tratado anteriormente e hábitos de alto risco (Omura, 2014).

2.3 Análise Fractal de Células Cancerígenas

A geometria fractal é uma das grandes descobertas da matemática, sendo uma superfície chamada de fractal quando sua geometria se repete periodicamente em diferentes escalas. Esses padrões complexos e desordenados são, geralmente, formados em condições distantes do equilíbrio ou emergem do caos (Namazi e Kiminezhadmalaie, 2015). Exemplos de forma fractal variam desde a estrutura em grande escala do universo a formas de costas continentais, árvores, estruturas de grãos de muitos metais, cerâmicas e minerais, nuvens e até mesmo algumas criações artísticas. Alguns tecidos biológicos mostram-se como padrões fractais. Atualmente, até mesmo uma estrutura fractal da cromatina foi usada para mostrar como o núcleo da célula contém moléculas que gerenciam o DNA nuclear no local certo (Metze, 2013; Lennon *et al.*, 2013).

A existência de uma possível conexão entre os cânceres e os fractais (autoafinidade) foi observada em vários trabalhos (Santos, Jordan Boeira dos., 2021). Foi proposto que o desequilíbrio de várias reações bioquímicas, que é tipicamente associado ao câncer, poderia resultar na formação caótica de várias características geométricas do câncer, resultando no aparecimento da geometria fractal porque o caos normalmente resulta no aparecimento de fractais (Lorthois e Cassot, 2010). E assim, estudos demonstraram que a vasculatura tumoral e a angiogênese demonstraram comportamento fractal explícito. O comportamento fractal específico do câncer de tumores na macroescala foi recentemente encontrado ao se analisar os perímetros do tumor. A geometria fractal também foi encontrada na estrutura da angiogênese tumoral (Dokukin *et al.*, 2011).

Uma análise semelhante nas escalas micro e submicrônicas foi feita em células neoplásicas e normais. Várias análises morfométricas foram aplicadas para analisar células individuais e núcleos celulares. O perímetro unidimensional de seções transversais de células ou núcleos celulares foi analisado nesses trabalhos, porém, a análise fractal nas escalas micro e submicrônicas não mostrou a transição para fractal, quando as células se tornam cancerosas (Uppal *et al.*, 2010). Tanto as células cancerosas quanto as normais demonstraram bom comportamento fractal, embora com dimensões fractais diferentes. Além disso, essas obras eram de natureza descritiva, baseadas na análise das características morfométricas previamente conhecidas do limite celular (pseudópodes) e não forneceram nenhuma melhora perceptível na identificação de células cancerosas (Sullivan *et al.*, 2011; Bose *et al.*, 2015).

Sendo assim, a geometria fractal é adequada para quantificar as características morfológicas que os patologistas têm usado há muito tempo de uma forma qualitativa, para descrever doenças malignas. Durante a última década, várias análises da aplicação de medidas fractais em patologia delinearam que a análise fractal pode fornecer informações confiáveis e úteis para as ciências médicas (Pasqualato *et al.*, 2012; Stehlil, Wartner e Minarova, 2013).

A análise da textura da cromatina através da avaliação da dimensão fractal (DF) possibilita quantificação de características nucleares que não seguem às regras da geometria Euclidiana, em que o valor da dimensão representa a dimensionalidade do espaço em que está inserido. A DF representa o nível de irregularidade existente em um fractal, ou seja, a proporção da quantidade de pixels presentes dentro de uma estrutura de formato irregular que repete-se inúmeras vezes na região nuclear (Brigham EO., 1998). O objetivo desse projeto é investigar se a dimensão fractal do núcleo das células (cromatina) de CEC e CME pode ser um método complementar para diagnóstico oral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a dimensão fractal histopatológica do Carcinoma Mucoepidermóide (CME) e Carcinoma Espinocelular Oral (CEC).

3.2 Objetivos Específicos

- Capturar imagens dos núcleos de células de CEC, CME e tecido sadio, por scanner 400x;
- Determinar a dimensão fractal do núcleo das células no CEC, CME e tecido sadio;
- Comparar os valores de dimensão fractal entre grupos;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob parecer nº 41082620.8.0000.5208. Os procedimentos para coletas e pesquisa do material foram realizados em parceria com Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, através dos Laboratórios de Patologia Oral e Biofísica da UFPE. Foram utilizadas lâminas de Carcinoma Espinocelular Oral (CEC), Carcinoma Mucoepidermóide (CME) e de tecidos sadios da mucosa oral.

4.2 Delineamento Experimental

Foram capturadas 150 imagens de células. Os grupos foram divididos da seguinte maneira:

- **Grupo Controle (GC):** foram analisadas 30 imagens de 1 paciente, para cálculo da Dimensão Fractal (DF) do núcleo das células.
- **GRUPO CEC (GCEC):** este grupo foi subdividido em 2 subgrupos (CECI, CECII), conforme abaixo:
 - **GCECI (bem diferenciado):** foram analisadas 30 imagens de 1 paciente;
 - **GCECII (moderadamente diferenciado):** foram analisadas 30 imagens de 1 paciente;
- **Grupo CME (GCME):** este grupo foi subdividido em 2 subgrupos (CMEI, CMEII), conforme abaixo:
 - **GCMEI (baixo grau):** foram analisadas 30 imagens de 1 paciente;
 - **GCMEII (grau intermediário):** foram analisadas 30 imagens de 1 paciente;

4.3 Obtenção de imagens

Para o presente estudo, foram selecionadas 2 lâminas de cada caso de CEC e CME do Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, no laboratório de Patologia Oral UFPE, onde foi caracterizada pela determinação do grau histopatológico de malignidade em uma série de casos de CEC e CME, obtidos dos arquivos do referido laboratório. Foram incluídas lâminas apenas dos casos de CEC e CME provenientes de ressecções cirúrgicas (que pertencem ao banco de lâminas do laboratório).

4.4 Análise de Dimensão Fractal

Utilizou-se a técnica morfométrica de dimensão fractal pelo método de “*Box-Counting*” (Contagem por Caixas) das imagens de Carcinoma Espinocelular Oral (CEC) e Carcinoma Mucoepidermóide (CME) de pacientes, obtidas no Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, no Laboratório de Patologia Oral da UFPE, para

estimar a complexidade das estruturas celulares, identificando o grau de rugosidade e textura das células normais e alteradas, permitindo o diagnóstico e a possível identificação do grau de severidade da lesão (i.e., bem diferenciado e moderadamente diferenciado, podendo estes graus de lesão estarem relacionados ao prognóstico dos pacientes).

A dimensão fractal é obtida pelo método de contagem por caixas, a partir do uso de quadrantes que cobrem a imagem, em que são contabilizados o número de caixas que cobrem pelo menos um pixel da imagem ($N(r)$), conforme descrito em Xavier *et al.* (2018). Repete-se o procedimento com caixas de tamanhos diferentes, e então traça-se um gráfico duplo log de $N(r)$ em função de r (lado das caixas). A inclinação da reta com o sinal invertido é a dimensão da estrutura, obtida pela expressão abaixo:

$$FD = \lim_{r \rightarrow 0} \left(\frac{\log Nr}{\log(1/r)} \right)$$

Onde $N(r)$ é o número mínimo de cubos elementares para cobrir a imagem digitalizada e r é a dimensão linear do cubo elementar (Nussenzveig, 1990; Timbó, 2009).

4. Análises de Estatísticas

Os resultados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk, com isso foi realizado o teste ANOVA, com o Post-Hoc de Tukey, que é paramétrico, realizado no GraphPad Prim 7.0, adotando-se o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

ARTIGO 1

Fractal analysis as a complementary tool in the diagnosis of mucoepidermoid carcinoma (MEC) and oral squamous cell carcinoma (OSCC)

Bruno Eduardo Arruda Alves^{1*}, Anna Beatriz de Oliveira Barbosa², Eduardo Eudes Nóbrega de Araújo⁴, Danyel Elias da Cruz Perez³, Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes², Thiago de Salazar e Fernandes², Juliana Pinto de Medeiros¹

¹Department of Histology and Embryology ,Federal University of Pernambuco, Professor Moraes Rego Avenue, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

²Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Professor Moraes Rego Avenue, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

³Department of Clinical and Preventive Dentistry, Federal University of Pernambuco, Professor Moraes Rego Avenue, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

⁴Department of Nuclear Energy, Federal University of Pernambuco, Professor Moraes Rego Avenue, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

Corresponding author*: brunoalvesodontologia24@gmail.com (+55 11 9 58187800)

ABSTRACT

The objective of this work is to determine the histopathological fractal dimension. We used slides of oral squamous cell carcinoma, mucoepidermoid carcinoma and healthy tissue, provided by the Department of Clinical and Preventive Dentistry, at the Oral Pathology Laboratory of the Federal University of Pernambuco. The fractal dimension morphometric technique was used through the *Box-Counting* method. Analysis of the fractal dimensions of the nuclei between the low and intermediate grade mucoepidermoid carcinoma groups showed no significant difference between groups. Regarding the mean fractal dimensions of the nuclei between the control and moderately and well-differentiated oral squamous cell carcinoma groups, analysis showed that there was a significant difference between the control group and the moderately differentiated oral squamous cell carcinoma 40x, with $p < 0.05$. A significant difference was identified between the control and 40x well-differentiated oral squamous cell carcinoma, with $p < 0.001$. No statistical significance was seen between the 40x moderately differentiated oral squamous cell carcinoma and the 40x well differentiated oral squamous cell carcinoma groups. Therefore, given the findings, we can suggest that the fractal nuclear dimension analysis is a tool that can help in early diagnosis.

Key words: Box-Counting; Fractal dimension; Mucoepidermoid carcinoma; Oral squamous cell carcinoma;

1. INTRODUCTION

According to estimates by the National Cancer Institute (NCI), for each year of the 2020-2021 biennium, 15,810 new cases of oral cancer will be diagnosed in Brazil. It was the 5th most frequent type of cancer in men and the 13th in women in 2008, causing 36 million deaths (63%).

In 2018, 354,864 new cases of lip and oral cavity cancers were estimated worldwide, responsible for 177,384 deaths in the same period. (Bray F et al, 2018; INCA, 2019). Oral cancer affects a young age group, with a higher proportion of cases between the ages of 40 and 60, a period in which individuals can still be quite productive (Borges *et al.*, 2009).

Among oral cancers, oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the malignant neoplasm that most affects the oral cavity and, when it is not diagnosed early, often leads to compromised prognosis. Each year, there are 300,000 new cases of OSCC in increasingly younger patients (Thomson, 2018).

The clinical condition includes the presence of squamous cells, usually with hardening and peripheral infiltration, which may or may not be accompanied by reddish or whitish spots (Valle *et al.*, 2016).

The histopathological diagnostic method of OSCC is performed by a pathologist in a subjective way; computational methods of image analysis to help in the diagnosis and prognosis of the disease have not been used to date. When the diagnosis is not made correctly and early, about 50% of patients can die within 5 years (Thomson *et al.*, 2018).

Likewise, mucoepidermoid carcinoma (MEC), considered the most common malignant idiopathic tumor of the salivary glands, is also diagnosed based on subjective anatomopathological observations, without implementation of mathematical methods of image analysis (Santos *et al.*, 2012; Thomson *et al.*, 2018).

This type of carcinoma is characterized by intraosseous growth of the jaws, being more common in middle-aged women, with the mandible as the most affected region.

Clinically, it may occur slowly, generally asymptomatic, sometimes associated with superficial ulceration and paresthesia, and may present a blue or red color in the lesions (Santos *et al.*, 2012).

Often affects the major salivary glands, however, the minor glands can also be affected and, when this happens, the region involved is usually the palate (Pires *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2012).

Currently, there are several diagnostic methods for neoplasms located in the mouth and oropharynx, such as radiographs, tomography and ultrasound (Bagan; Scully, 2008). However, the gold standard for confirming the diagnosis is still the performance of biopsy associated with subjective anatomopathological analysis, performed by a pathologist (Favero *et al.*, 2007).

It is known that cancers originate from genetic alterations that sometimes affect the global structure of chromatin in the cell nucleus, which can be evidenced as morphological alterations visible under the microscope and described by a pathologist. Nevertheless, Current morphometric methods that assess texture through the fractal dimension can become complementary and objective tools to measure changes in these structures, helping to diagnose alterations such as melanomas, breast cancers and lymphomas (Metze, 2013).

Fractal analysis is based on the irregularity of structures that do not have integer dimensions, as in Euclidean geometry, but on fractional dimensions that can be measured by special techniques, such as the box-counting method.

Thus, the fractal dimension of the cell nucleus would provide a numerical value that would be associated with the lesion or even the tumor staging (Metze, 2013). In this sense, the calculation of fractal dimensions proves to be a tool with the potential to assist professionals in the diagnosis of OSCC and MSC.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Ethics Committee

This research was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco under the registration number 41082620.8.0000.5208. The procedures for collecting and researching the material were carried out in partnership with the Department of Clinical and Preventive Dentistry, through the Laboratory of Oral Pathology and the Department of Biophysics and Radiobiology of the university. Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), Mucoepidermoid Carcinoma (MEC) and healthy tissue slides were used.

2.2 Experimental Outline

150 cell images were captured. The groups were divided as follows:

- **Control Group (CG):** 30 images of 1 patient were analyzed (totaling 30 images) to calculate the FD (fractal dimension) of the cell nucleus.
- **Group OSCC (OSCCG):** This group was subdivided into 2 subgroups (OSCCI, OSCCII), as follows:
 - **OSCCI (well differentiated):** 30 images of 1 patient were analyzed (30 images in total);
 - **OSCCII (moderately differentiated):** 30 images of 1 patient were analyzed (30 images in total);
- **Group MEC (MECG):** This group was subdivided into 2 subgroup (MECI, MECII), as follows:
 - **MECI (low grade):** 30 images of 1 patient were analyzed (30 images in total);
 - **MECII (intermediate grade):** 30 images of 1 patient were analyzed (30 images in total);

2.3 Image Acquisition

For the present study, two slides were selected from each case of OSCC and MEC, treated with surgical resections, provided by the Department of Clinical and Preventive Dentistry, through the Oral Pathology Laboratory located in Federal University of Pernambuco. They were characterized by determination of the histopathological degree of malignancy in a series of cases of OSCC and MEC, obtained from the archives of the aforementioned laboratory.

2.4 Fractal Dimension Analysis

The fractal dimension morphometric technique was used through the “*Box-Counting*” method to analyze images of patients with Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) and Mucoepidermoid Carcinoma (MEC) to estimate the complexity of cellular structures, identify the degree of roughness and texture of normal and altered cells, allow the diagnosis and possible identify the degree of severity in the lesion (well differentiated and moderately differentiated. These degrees of injury may be related to the prognosis of patients).

The fractal dimension is obtained by the box counting method, in which, using quadrants that cover the image, the number of boxes that cover at least one pixel of the image are counted ($N(r)$), as described in (Xavier *et al.*, 2018). The procedure is repeated with boxes of different sizes, and then a double log graph of $N(r)$ in function of r (side of the boxes). The slope of the line with the inverted sign is the dimension of the structure, obtained by the expression below:

$$FD = \left(\frac{\log \log Nr}{\log \log \left(\frac{1}{r} \right)} \right)$$

Whereas $N(r)$ is the minimum number of elementary cubes to cover the scanned image, and r is the linear dimension of the elementary cube (Nussenzveig, 1990; Timbó, 2009).

2.5 Statistical analysis

The results were evaluated by the Shapiro-Wilk test, then the ANOVA test was performed, with Tukey's Post-Hoc, which is parametric, performed in GraphPad Prim 7.0, adopting a significance level of 5% ($p \leq 0.05$).

3. RESULTS

3.1 Image Obtention

The slides from the control group and from the groups with lesions were analyzed and the nuclei images captured, as shown in the figure below.

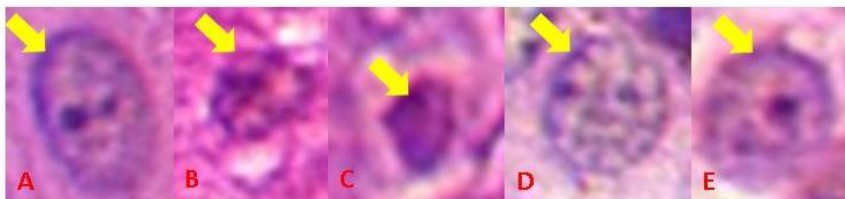


Figure 1: Photomicrographs of the nucleus of OSCC and MEC cases from surgical resections. **A:** Control group; **B:** Well-differentiated OSCC group; **C:** Moderately differentiated OSCC group; **D:** Low grade MEC group; **E:** Intermediate grade MEC group.

3.2 Fractal dimension analysis of the nucleus

The microscopic images of each nucleus were analyzed in ImageJ software for fractal dimension following the methodology mentioned above.

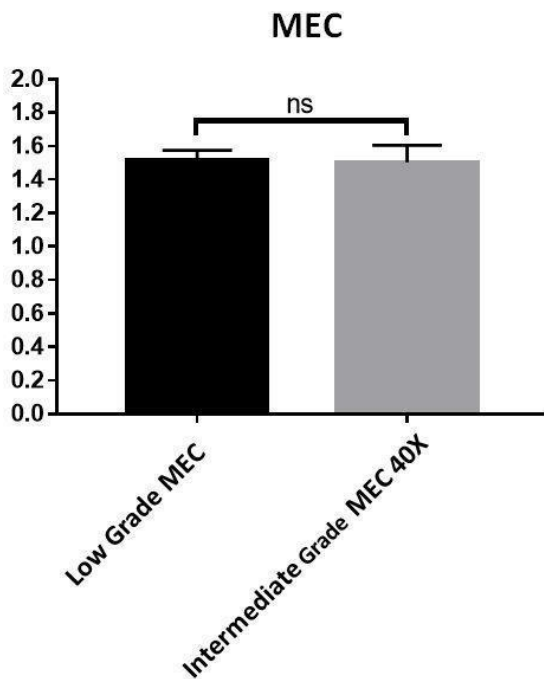


Figure 2: Mean fractal dimensions of nuclei between low-grade and intermediate-grade MEC groups. There was no significant difference between the groups analyzed.

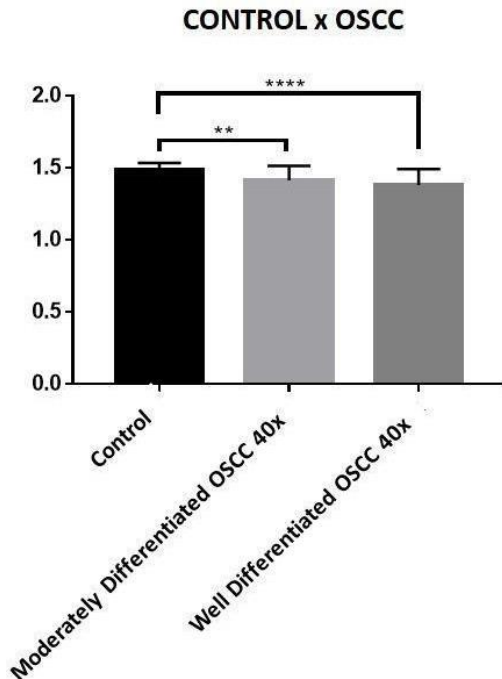


Figure 3: Mean of the fractal dimensions of the nuclei between the control and moderately and well-differentiated OSCC groups. The analysis showed that there was a significant difference between the control groups and the moderately differentiated OSCC 40x, with $p < 0.05$. It was also identified that there was a significant difference between the control and the well-differentiated OSCC 40x, with $p < 0.001$. No statistical significance was seen between the moderately differentiated 40x OSCC and the well differentiated 40x OSCC groups.

4. DISCUSSION

Genomic DNA in eukaryotic cells is basically divided into chromosomes, each consisting of a single nucleosomal fiber.

The structure and dynamics of chromatin plays a critical role in all processes involved in DNA metabolism, such as: replication, transcription, repair and recombination (Lavelle, Christophe; Foray, Nicolas., 2014). Chromosomal territories (CTs) constitute an important feature of nuclear architecture (Cremer, Thomas; Cremer, Marion., 2010).

Yakirevich, Evgeny *et al.*, (2010) when analyzing the shape of the nuclei by fractal dimension, observed that the MEC nuclei had a smaller sized and less clustered chromatin ($p < 0.05$).

This study showed that there was no significant difference between the low and intermediate MEC groups. The morphometric analysis showed high sensitivity and specificity regarding the perimeter and fractal dimension in the discrimination between neoplastic and non-neoplastic hepatocytes, showing inter-observer replication capability (Santos, Jordan Boeira dos. 2021). Thus indicating that the fractal dimension can be an essential tool as an alternative or complementary method for diagnosis.

Goutzanis, L. *et al.*, (2008) used the FD to evaluate the nuclei of differentiated squamous cell carcinoma of the mouth: normal, well – moderately, moderately, moderately poor and poor. It was found that there is a considerable difference in the mean value of nuclear FD between the four stages of the disease and the control group.

Generally, no differences were observed between the control group and stage I, nor between stages II and III, II and IV, III and IV (all $p > 0.05$).

The information corroborates with the present study, in which was observed in the analysis a significant difference between the control groups and the moderately differentiated OSCC 40x, with $p < 0.05$.

It was also identified that there was a significant difference between the control and the well-differentiated OSCC 40x, with $p < 0.001$. No statistical significance was identified between the 40x moderately differentiated OSCC and the 40x differentiated OSCC groups.

Goutzanis, L. *et al.*, (2008) proved that there is a statistically significant difference in the mean value of nuclear FD between the different degrees of tumor differentiation and the control group.

Mincione, Gabriella *et al.*, (2015) also observed significant differences in OSCC FD as well as D'Addazio, G. *et al.*, (2018). Furthermore, different degrees of tumor differentiation showed a significant difference in mean nuclear FD values ($p = 0.001$). These results are in

agreement with the present study, since it was found that there was a significant difference between the control groups and the moderately differentiated OSCC.

In general, however, FD values were lower in the control group and in well-differentiated neoplasms, whereas they were higher in less differentiated tumors. (Goutzanis, L. et al., (2008), this result does not corroborate the present study, which can be seen in Figure 3, that the FD is higher in the control group and lower in the moderately differentiated OSCC and well-differentiated OSCC groups, indicating a loss of complexity of these structures with tumor differentiation.

However, another study analyzed that among the clinical covariates evaluated, high stage was significantly associated with low FD scores (Bose, Pinakiet *al.*, 2015), corroborating the results of the present study.

By investigating the fractal qualities of normal and malignant hematologic cells and their potential as a tool to characterize cell phenotype and clinical behavior, it was found that, unlike the cells studied in this work, the blood cells showed an increase in the nuclear fractal dimension (Mashiah, Adi et al., 2008). In the quest to know whether the fractal dimension of nuclear chromatin measured in routine histological preparations of malignant melanomas could be a prognostic factor for survival, Bedin, Valciniret *al.* (2010) found that the fractal dimension of nuclear chromatin was included as an independent prognostic factor in the final regression model. The increase in nuclear FD found in more aggressive melanomas is the mathematical equivalent of a greater complexity of the chromatin architecture. Thus, there is strong evidence that nuclear chromatin texture FD is a new and promising variable in prognostic models of malignant melanomas (Bedin, Valciniret *al.* 2010).

In contrast, when breast cancer cells undergo apoptosis, a general reduction in fractal dimension occurs. Most nuclear components undergo ultrastructural changes, including chromatin marginalization and condensation, significantly reducing their fractal dimensions, especially in openly apoptotic cells treated with calcimycin 1 μ M for 72 h. Therefore, fractal and GLCM analyzes confirm that morphological reorganization of nuclei, attributable to a loss of structural complexity, occurs at the beginning of apoptosis (Einstein, Andrew J.; WU, Hai-Shan; GIL, Joan., 1998; Losa, Gabriele A.; Castelli, Christian., 2005).

Computer-aided diagnostic algorithms can benefit from using data; Specific cut-off values can yield ~99% specificity in diagnosing breast cancer. In addition, as it allows the assessment of tissue complexity, this tool can be used to understand the progression of histological changes in cancer. (Da Silva, Lucas Glaucio et al., 2021).

By quantifying this structural abnormality in the tumor by applying fractal analysis to contrast-enhanced computed tomography (CE-CT) imaging and evaluating its biomarker value for predicting survival in treated gastric cancer patients, it was seen that fractal analysis may be a useful biomarker for gastric cancer patients, reflecting survival and clinicopathological features. (Watanabe, Hiroki et al., 2021).

Another study points out that the FD would be an additional resource to discriminate between benign and malignant nodules. A larger sample size is now needed to confirm the possible use of FD in the diagnosis of thyroid cancer in clinical practice (Lothaire, Philippe et al., 2021).

Brain MRI fractal geometry analysis identified patients at risk of increasing their disability over the next five years. There was a significant decrease in fractal dimension and increase in lacunarity in different brain regions over the 5 years of follow-up. The lower cortical fractal dimension increased the risk of disability accumulation for the Expanded Disability Status Scale (ROURA, Eloy et al., 2021).

Any clinical imaging method cannot fully reflect the histological microstructures of bone. Applying fractal analysis along with clinical results can demonstrate adequate bone healing and quality prior to implant placement. Fractal analysis is a non-invasive and reproducible method, but additional prospective, randomized, controlled clinical studies are needed to estimate bone quality before implant placement (KABA, Yusuf Nuri et al., 2022).

7 CONCLUSÕES

- Observou-se diferença significativa na dimensão fractal nuclear entre os grupos controle eo CEC moderadamente diferenciado.
- Foi identificada diferença significativaentre o controle e o CEC bem diferenciado.
- Não foi identificada significância estatística entre osgrupos CEC moderadamente diferenciado e bem diferenciado. Sendo necessário assimilação juntamente com outro diagnóstico neste caso.
- CME de baixo e grauintermediário não apresentaram diferençassignificativas entre os grupos analisados.
- Sugere-se a utilização da Dimensão fractal nuclearcomo ferramenta auxiliar nodiagnósticorápido de Carcinoma Mucoepidermpóide (CME) e Carcinoma Espinocelular Oral(CEC).

REFERÊNCIAS

- Ali, J., Sabiha, B., Jan, H. U., Haider, S. A., Khan, A. A., & Ali, S. S. (2017). Genetic etiology of oral cancer. *Oral oncology*, 70, 23-28.
- Bagan, J., Sarrion, G., & Jimenez, Y. (2010). Oral cancer: clinical features. *Oral oncology*, 46(6), 414-417.
- Barradas, Queila. Carcinoma mucoepidermoide-revisão de literatura. *Revista Brasileira de Odontologia*, v. 75, p. 32, 2018.
- Bedin, Valcinir et al. Fractal dimension of chromatin is an independent prognostic factor for survival in melanoma. *BMC cancer*, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2010.
- Bell, D., & El-Naggar, A. K. (2013). Molecular heterogeneity in mucoepidermoid carcinoma: conceptual and practical implications. *Head and neck pathology*, 7(1), 23-27.
- BORGES, Danielle Muniz de Lira et al. Mortalidade por câncer de boca e condição sócio-econômica no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 25, p. 321-327, 2009.
- Bose, P., Brockton, N. T., Guggisberg, K., Nakoneshny, S. C., Kornaga, E., Klimowicz, A. C., ... & Dort, J. C. (2015). Fractal analysis of nuclear histology integrates tumor and stromal features into a single prognostic factor of the oral cancer microenvironment. *BMC cancer*, 15(1), 1-9.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394-424.
- Brigham EO. The Fast Fourier Transform. 2^o.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998.
- Bryne, M. *et al*. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J. Pathol.*, v. 166, n. 4, p. 375-381, 1992.
- Campos, Paloma Santos de. Modulação do comportamento de células do carcinoma espinocelular oral: influência de fatores químicos e físicos. 2020.
- Cremer, Thomas; Cremer, Marion. Chromosome territories. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 2, n. 3, p. a003889, 2010.
- Coca-Pelaz, A., Rodrigo, J. P., Triantafyllou, A., Hunt, J. L., Rinaldo, A., Strojan, P., ... & Ferlito, A. (2015). Salivary mucoepidermoid carcinoma revisited. *European Archives of Oto-Rhino- Laryngology*, 272(4), 799-819.
- DA SILVA, Lucas Glaucio et al. Fractal dimension analysis as an easy computational approach to improve breast cancer histopathological diagnosis. *Applied Microscopy*, v. 51, n. 1, p. 1-9, 2021.
- D'Addazio, G. et al. Immunohistochemical study of osteopontin in oral squamous cell carcinoma allied to fractal dimension. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, v. 32, n. 4, p. 1033-1038, 2018.
- Dedivitis, RA. *et al*. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2004 jan/fev. 70(1): 35-40.

- Devaraju, R., Gantala, R., Aitha, H., & Gotoor, S. G. (2014). Mucoepidermoid carcinoma. *Case Reports*, 2014, bcr2013202776.
- Dissanayaka, W. L., Pitiyage, G., Kumarasiri, P. V. R., Liyanage, R. L. P. R., Dias, K. D., & Tilakaratne, W. M. (2012). Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 113(4), 518-525.
- Dokukin, M. E., Guz, N. V., Gaikwad, R. M., Woodworth, C. D., & Sokolov, I. (2011). Cell surface as a fractal: normal and cancerous cervical cells demonstrate different fractal behavior of surface adhesion maps at the nanoscale. *Physical review letters*, 107(2), 028101.
- Einstein, Andrew J.; Wu, Hai-Shan; Gil, Joan. Self-affinity and lacunarity of chromatin texture in benign and malignant breast epithelial cell nuclei. *Physical Review Letters*, v. 80, n. 2, p. 397, 1998.
- Ettl, T., Schwarz-Furlan, S., Gosau, M., & Reichert, T. E. (2012). Salivary gland carcinomas. *Oral and maxillofacial surgery*, 16(3), 267-283.
- Feller, L., Altini, M., & Lemmer, J. (2013). Inflammation in the context of oral cancer. *Oral oncology*, 49(9), 887-892.
- Feller, L. L., Khammissa, R. R., Kramer, B. B., & Lemmer, J. J. (2013). Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer cell international*, 13(1), 1-8.
- Goutzanis, L. et al. Nuclear fractal dimension as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, v. 44, n. 4, p. 345-353, 2008.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA, 2021.
- Jadhav, K. B., & Gupta, N. (2013). Clinicopathological prognostic implicators of oral squamous cell carcinoma: need to understand and revise. *North American journal of medical sciences*, 5(12), 671.
- Jolley, L.; Majumdar, S.; Kapila, Sunil. Technical factors in fractal analysis of periapical radiographs. *Dentomaxillofacial Radiology*, v. 35, n. 6, p. 393-397, 2006.
- Joseph, T. P., Joseph, C. P., Jayalakshmy, P. S., & Poothiade, U. (2015). Diagnostic challenges in cytology of mucoepidermoid carcinoma: report of 6 cases with histopathological correlation. *Journal of Cytology/Indian Academy of Cytologists*, 32(1), 21.
- Jurczyszyn, Kamil et al. Fractal Dimension and Texture Analysis of Lesion Autofluorescence in the Evaluation of Oral Lichen Planus Treatment Effectiveness. **Materials**, v. 14, n. 18, p. 5448, 2021
- Kaba, Yusuf Nuri et al. Evaluation of trabecular bone healing using fractal dimension analysis after augmentation of alveolar crests with autogenous bone grafts: a preliminary study. *Oral Radiology*, v. 38, n. 1, p. 139-146, 2022.
- Kang, H., Tan, M., Bishop, J. A., Jones, S., Sausen, M., Ha, P. K., & Agrawal, N. (2017). Whole- exome sequencing of salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 23(1), 283-288.

Khurshid, Z., Zafar, M. S., Khan, R. S., Najeeb, S., Slowey, P. D., & Rehman, I. U. (2018). Role of salivary biomarkers in oral cancer detection. *Advances in clinical chemistry*, 86, 23-70.

Lavelle, Christophe; Foray, Nicolas. Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to radiobiology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 49, p. 84-97, 2014.

Lennon, F. E., Cianci, G. C., Cipriani, N. A., Hensing, T. A., Zhang, H. J., Chen, C. T., ... & Salgia,

R. (2015). Lung cancer—a fractal viewpoint. *Nature reviews Clinical oncology*, 12(11), 664.

Lombardi, D., McGurk, M., Vander Poorten, V., Guzzo, M., Accorona, R., Rampinelli, V., & Nicolai, P. (2017). Surgical treatment of salivary malignant tumors. *Oral oncology*, 65, 102-113.

Lorthois, S., & Cassot, F. (2010). Fractal analysis of vascular networks: insights from morphogenesis. *Journal of theoretical biology*, 262(4), 614-633.

Losa, Gabriele A.; Castelli, Christian. Nuclear patterns of human breast cancer cells during apoptosis: characterisation by fractal dimension and co-occurrence matrix statistics. *Cell and tissue research*, v. 322, n. 2, p. 257-267, 2005.

LOTHAIRE, Philippe et al. Estimation of The Fractal Dimension of Thyroid Nodules As A Complementary Diagnostic Tool For Predicting Malignancy. 2021.

Malik, U. U., Zarina, S., & Pennington, S. R. (2016). Oral squamous cell carcinoma: Key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. *Archives of oral biology*, 63, 53-65.

Mamani, Laura Cruz et al. Prevalência de carcinomas espinocelulares de boca diagnosticados no laboratório de anatomopatologia bucal da Unifal-MG no período de 1998 a 2019. 2021.

Mashiah, Adi et al. Lymphoma and leukemia cells possess fractal dimensions that correlate with their biological features. *Acta haematologica*, v. 119, n. 3, p. 142-150, 2008.

McHugh, C. H., Roberts, D. B., El-Naggar, A. K., Hanna, E. Y., Garden, A. S., Kies, M. S., ... & Kupferman, M. E. (2012). Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Cancer*, 118(16), 3928-3936.

Melo, Bernardo Augusto de Carvalho et al. Infecção por papilomavírus humano e carcinoma espinocelular oral-Uma revisão sistemática. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 87, p. 346-352, 2021.

Menezes, Pedro Henrique et al. TRATAMENTO CIRÚRGICO DO CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE EM GLÂNDULA SUBLINGUAL: UMA REVISÃO DE LITERATURA.

Fórum de Iniciação Científica de Odontologia da UNISC, v. 1, n. 1, 2020

Metze, K. (2013). Fractal dimension of chromatin: potential molecular diagnostic applications for cancer prognosis. *Expert review of molecular diagnostics*, 13(7), 719-735.

- Mincione, Gabriella et al. Nuclear fractal dimension in oral squamous cell carcinoma: a novel method for the evaluation of grading, staging, and survival. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 44, n. 9, p. 680-684, 2015.
- Murer, K., Huber, G. F., Haile, S. R., & Stoeckli, S. J. (2011). Comparison of morbidity between sentinel node biopsy and elective neck dissection for treatment of the n0 neck in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head & neck*, 33(9), 1260-1264.
- Namazi, H., & Kiminezhadmalaie, M. (2015). Diagnosis of lung cancer by fractal analysis of damaged DNA. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2015.
- Oliveira, Jailce Alves et al. Metástase a distância em paciente com histórico de carcinoma espinocelular bucal. *Facit Business and Technology Journal*, v. 1, n. 27, 2021.
- Omura, K. (2014). Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *International journal of clinical oncology*, 19(3), 423-430.
- Pasqualato, A., Palombo, A., Cucina, A., Mariggiò, M. A., Galli, L., Passaro, D., ... & Bizzarri, M. (2012). Quantitative shape analysis of chemoresistant colon cancer cells: correlation between morphotype and phenotype. *Experimental cell research*, 318(7), 835-846.
- Pérez-de-Oliveira, M. E., Wagner, V. P., Araújo, A. L. D., Martins, M. D., Santos-Silva, A. R., Bingle, L., & Vargas, P. A. (2020). Prognostic value of CRTC1-MAML2 translocation in salivary mucoepidermoid carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 49(5), 386-394.
- Pires, F. R. et al. Carcinoma mucoepidermóide de cabeça e pescoço: estudo clínico-patológico de 173 casos. *Rev Bras Otorrinolaringol*. V.68, n.5, 679-84, set./out. 2002.
- Qureshi, S. M., Janjua, O. S., & Janjua, S. M. (2012). Mucoepidermoid carcinoma: a clinico- pathological review of 75 cases. *Int J Oral Maxillofac Pathol*, 3, 5-9.
- Rodríguez, J. et al. Fractales: ayuda diagnóstica para células preneoplásicas y cancerígenas del epitelio escamoso cervical confirmación de aplicabilidad clínica. *Rev Med* 24(1):79-88, 2016.
- ROURA, Eloy et al. Cortical fractal dimension predicts disability worsening in Multiple Sclerosis patients. *NeuroImage: Clinical*, v. 30, p. 102653, 2021.
- Sánchez, I.; Uzcátegui, G. Fractals in dentistry. *Journal of Dentistry*, v. 39, p. 273-2929, 2011.
- Santos, Jordan Boeira dos. Análise da morfometria nuclear e textura da cromatina de amostras de carcinoma hepatocelular de pacientes transplantados hepáticos. 2021
- Santos, T. S. et al. Carcinoma mucoepidermóide no palato: relato de caso. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*. 2012;53(1):29-33.

Schwarz, S., Stiegler, C., Müller, M., Ettl, T., Brockhoff, G., Zenk, J., & Agaimy, A. (2011). Salivary gland mucoepidermoid carcinoma is a clinically, morphologically and genetically heterogeneous entity: a clinicopathological study of 40 cases with emphasis on grading, histological variants and presence of the t (11; 19) translocation. *Histopathology*, 58(4), 557-570.

Shenoi, R., Devrukhkar, V., Sharma, B. K., Sapre, S. B., & Chikhale, A. (2012). Demographic and clinical profile of oral squamous cell carcinoma patients: A retrospective study. *Indian journal of cancer*, 49(1), 21.

Silveira, Heitor Albergoni. Caracterização imunoistoquímica comparativa de subgrupos de células dendríticas e oncogênese viral no carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo. 2020.

Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, *et al.* Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of the squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol* 2007; 15: 376.

Stehlík, M., Wartner, F., & Minárová, M. (2013). Fractal analysis for cancer research: case study and simulation of fractals. *Pliska Studia Mathematica Bulgarica*, 22(1), 195p-206p.

Sullivan, A. C., Hunt, J. P., & Oldenburg, A. L. (2011). Fractal analysis for classification of breast carcinoma in optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics*, 16(6), 066010.

Techavichit, P., Hicks, M. J., López-Terrada, D. H., Quintanilla, N. M., Guillerman, R. P., Sarabia,

S. F., ... & Chintagumpala, M. (2016). Mucoepidermoid carcinoma in children: a single institutional experience. *Pediatric blood & cancer*, 63(1), 27-31.

Teixeira, A. K. M. et al. Carcinoma Espinocelular da Cavidade Bucal: um Estudo Epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Ceará, v. 3, n. 55, p.229-236, maio, 2009.26.

Trafalski, Mateusz; Kozakiewicz, Marcin; Jurczyszyn, Kamil. Application of Fractal Dimension and Texture Analysis to Evaluate the Effectiveness of Treatment of a Venous Lake in the Oral Mucosa Using a 980 nm Diode Laser—A Preliminary Study. *Materials*, v. 14, n. 15, p. 4140, 2021

Uppal, S. O., Voronine, D. V., Wendt, E., & Heckman, C. A. (2010). Morphological fractal analysis of shape in cancer cells treated with combinations of microtubule-polymerizing and-depolymerizing agents. *Microscopy and Microanalysis*, 16(4), 472.

Vander Poorten, V., Triantafyllou, A., Thompson, L. D. R., Bishop, J., Hauben, E., Hunt, J., ... & Ferlito, A. (2016). Salivary acinic cell carcinoma: reappraisal and update. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 273(11), 3511-3531.

Vargas-Ferreira, F., Nedel, F., Etges, A., Gomes, A. P. N., Furuse, C., & Tarquinio, S. B. C. (2012). Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. *Brazilian dental journal*, 23(5), 586-590.

Valle, C. N. *et al.* Carcinoma espinocelular oral: um panorama atual. Rev Pat Tocantins. V. 3, n. 04, 2016.

WATANABE, Hiroki et al. Quantification of structural heterogeneity using fractal analysis of contrast-enhanced CT image to predict survival in gastric cancer patients. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 66, n. 6, p. 2069-2074, 2021.

Xavier, A. I. S. F.; Cavalcanti, M. B.; Silva, E. B.; Amaral, A.; Fernandes, T. S. Fractal analysis of chromatin as a potential indicator of human exposure to ionizing radiation. Scientia Plena, v. 14, n. 2, p. 1-8, 2018.

YAKIREVICH, Evgeny et al. Primary mucin-producing tumours of the salivary glands: a clinicopathological and morphometric study. Histopathology, v. 57, n. 3, p. 395-409, 2010.