

Análise fractal como ferramenta complementar no diagnóstico de carcinoma mucoepidermóide (CME) e carcinoma espinocelular oral (CEC)

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

El análisis fractal como herramienta complementaria en el diagnóstico del carcinoma mucoepidermoide (MEC) y el carcinoma oral de células escamosas (COCE)

Recebido: 24/08/2022 | Revisado: 04/09/2022 | Aceito: 06/09/2022 | Publicado: 14/09/2022

Bruno Eduardo Arruda Alves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9031-5625>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: brunoalvesodontologia24@gmail.com

Anna Beatriz de Oliveira Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2525-1020>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: anna.obarbosa@ufpe.br

Rodrigo Reges dos Santos Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0141-5649>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: rodrigoregesufpe@gmail.com

Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8255-356X>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: fernanda.angelo@ufpe.br

Carina Scanoni Maia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8192-5018>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: carina.maia@ufpe.br

Danyel Elias da Cruz Perez

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4591-4645>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: danyel.perez@ufpe.br

Eduardo Eudes Nóbrega de Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5020-0313>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: eudesnobrega.eduardo@gmail.com

Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0996-7122>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: isvania@gmail.com

Thiago de Salazar e Fernandes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1053-1943>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: thiago.fernandes@ufpe.br

Juliana Pinto de Medeiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9400-8067>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: juliana.pintomedeiros@ufpe.br

Resumo

O carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna que mais acomete a cavidade oral e, quando não diagnosticada precocemente, muitas vezes resulta em prognóstico comprometido. Da mesma maneira, carcinoma mucoepidermóide, o tipo mais comum de glândula salivar maligna tumor de etiologia desconhecida, também é diagnosticado com base em observações anatomopatológicas, sem a implementação de métodos de análise de imagem. O objetivo deste trabalho é determinar a dimensões fractais histopatológicas dos cânceres acima mencionados. Slides de oralidade foram utilizados carcinoma de células escamosas, carcinoma mucoepidermóide e tecido saudável. As dimensões fractais foram adquiridas usando o método de contagem de caixas. Análise de fractais dimensões dos núcleos de carcinoma de células escamosas (grau baixo e intermediário) revelaram nenhuma diferença significativa entre os grupos. Em relação às dimensões fractais médias de os núcleos das amostras de carcinoma mucoepidermóide

(controle, moderado e bem diferenciado), a análise mostrou que havia uma diferença significativa entre os grupos controle e o carcinoma espinocelular 40x moderadamente diferenciado, com $p < 0,05$. Uma diferença significativa também foi identificada entre o controle e 40x carcinoma mucoepidermóide bem diferenciado, com $p < 0,001$. Sem estatística foi observada significância entre os 40x bem diferenciados 40x moderadamente grupos diferenciados de carcinoma mucoepidermóide. Portanto, podemos sugerir que análise de dimensão fractal nuclear é uma ferramenta útil para diagnosticar rapidamente essas condições.

Palavras-chave: Carcinoma mucoepidermóide; Carcinoma espinocelular oral; Dimensão fractal; Morfometria.

Abstract

Squamous cell carcinoma is the malignant neoplasm that most affects the oral cavity and, when not diagnosed early, often results in a compromised prognosis. Likewise, mucoepidermoid carcinoma, the most common type of malignant salivary gland tumor of unknown etiology, is also diagnosed based on subjective anatomopathological observations, without the implementation of mathematical image analysis methods. The objective of this work is to determine the histopathological fractal dimensions of the aforementioned cancers. Slides of oral squamous cell carcinoma, mucoepidermoid carcinoma and healthy tissue were used. Fractal dimensions were acquired using the box counting method. Analysis of fractal dimensions of squamous cell carcinoma nuclei (low and intermediate grade) revealed no significant difference between groups. Regarding the mean fractal dimensions of the cores of the mucoepidermoid carcinoma samples (control, moderate and well differentiated), the analysis showed that there was a significant difference between the control groups and the moderately differentiated 40x squamous cell carcinoma, with $p < 0.05$. A significant difference was also identified between the control and 40x well-differentiated mucoepidermoid carcinoma, with $p < 0.001$. No statistical significance was observed between the 40x well-differentiated 40x moderately differentiated mucoepidermoid carcinoma groups. Therefore, we can suggest that nuclear fractal dimension analysis is a useful tool for quickly diagnosing these conditions.

Keywords: Mucoepidermoid carcinoma; Oral squamous cell carcinoma; Fractal dimension; Morphometry.

Resumen

El carcinoma de células escamosas es la neoplasia maligna que más afecta a la cavidad oral y, cuando no se diagnostica a tiempo, suele comprometer el pronóstico. Asimismo, el carcinoma mucoepidermoide, el tipo más común de tumor maligno de glándulas salivales de etiología desconocida, también se diagnostica con base en observaciones anatomopatológicas subjetivas, sin la implementación de métodos matemáticos de análisis de imágenes. El objetivo de este trabajo es determinar las dimensiones fractales histopatológicas de los cánceres mencionados. Se utilizaron láminas de carcinoma oral de células escamosas, carcinoma mucoepidermoide y tejido sano. Las dimensiones fractales se adquirieron utilizando el método de conteo de cajas. El análisis de las dimensiones fractales de los núcleos de carcinoma de células escamosas (grado bajo e intermedio) no reveló diferencias significativas entre los grupos. En cuanto a las dimensiones fractales medias de los núcleos de las muestras de carcinoma mucoepidermoide (control, moderado y bien diferenciado), el análisis mostró que había una diferencia significativa entre los grupos de control y el carcinoma de células escamosas 40x moderadamente diferenciado, con $p < 0,05$. También se identificó una diferencia significativa entre el control y el carcinoma mucoepidermoide bien diferenciado 40x, con $p < 0,001$. No se observó significación estadística entre los grupos de carcinoma mucoepidermoide 40x bien diferenciados y 40x moderadamente diferenciados. Por lo tanto, podemos sugerir que el análisis de la dimensión fractal nuclear es una herramienta útil para diagnosticar rápidamente estas condiciones.

Palabras clave: Carcinoma mucoepidermoide; Carcinoma oral de células escamosas; Dimensión fractal; Morfometría.

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 tipo de câncer mais frequente em homens e o 13º em mulheres no ano de 2008, causando 36 milhões dos óbitos (63%). Em 2018, foram estimados 354.864 novos casos de cânceres de lábio e cavidade oral em âmbito mundial, responsáveis por 177.384 óbitos no mesmo período (Bray F et al, 2018; INCA, 2019). O câncer de boca atinge uma faixa etária jovem, com 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 oral (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, em pacientes cada vez mais 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 feito 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 idiopático maligno de glândulas salivares mais comum, 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). Este tipo de carcinoma é caracterizado pelo crescimento intra ósseo dos maxilares, sendo mais comum em mulheres de meia idade, tendo 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 como na geometria euclidiana, e sim em dimensões fracionárias que podem ser medidas por técnicas especiais, como o método de *box-counting* (contagem de 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 se mostra uma ferramenta com potencial para auxiliar o profissional da saúde no diagnóstico de CEC e CME.

2. Metodologia

2.1 Comitê de Ética

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

2.2 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 (totalizando 30 imagens) para cálculo da DF (dimensão fractal) 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, (30 imagens ao total);
 - **GCECII (moderadamente diferenciado):** foram analisadas 30 imagens de 1 paciente, (30 imagens ao total);
- **Grupo CME (GCME):** este grupo foi subdividido em 2 subgrupos (CMEI, CMEII), conforme abaixo:
 - **GCMEI (baixo grau):** foram analisadas 30 imagens de 1 paciente, (30 imagens ao total);
 - **GCMEII (grau intermediário):** foram analisadas 30 imagens de 1 paciente, (30 imagens ao total);

2.3 Obtenção de imagens

(Vê se as informações aqui estão corretas)

Para o presente estudo, foram selecionadas duas lâminas de cada caso de CEC e CME disponibilizadas pelo Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva, através do laboratório de Patologia Oral da UFPE, onde foram caracterizadas 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 dois casos de CEC e CME provenientes de ressecções cirúrgicas (que pertencem ao banco de lâminas do laboratório).

2.4 Análise de Dimensão Fractal

Utilizou-se a técnica morfométrica de dimensão fractal através do método de “*Box-Counting*” (Contagem de Caixas) para analisar imagens de pacientes com Carcinoma Espinocelular Oral (CEC) e Carcinoma Mucoepidêmico (CME) 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, no qual, a partir do uso de quadrantes que cobrem a imagem, 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 é traçado 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:

$$D = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} [\log N(\varepsilon) / \log(1 / \varepsilon)]$$

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

2.5 Análises de Estatísticas

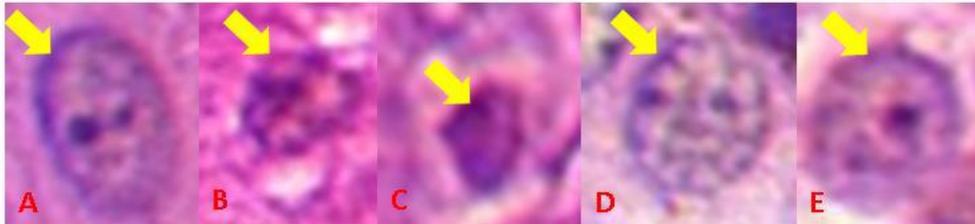
Os resultados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk, com isso foi realizado o teste ANOVA, com o Post-Hoc de Tukey, que é paramétrico, realizado no GraphPad Prim 7.0, adotando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3. Resultados

3.1 Obtenção de imagens

As lâminas do grupo controle e dos grupos com as lesões foram analisadas e as imagens de núcleos capturadas, conforme a Figura 1 a seguir.

Figura 1: Fotomicrografias do núcleo dos casos de CEC e CME provenientes de ressecções cirúrgicas (que pertencem ao banco de lâminas do laboratório). A: grupo controle; B: grupo CEC bem diferenciado; C: grupo CEC moderadamente diferenciado; D: grupo CME baixo grau; E: grupo CME grau intermediário.

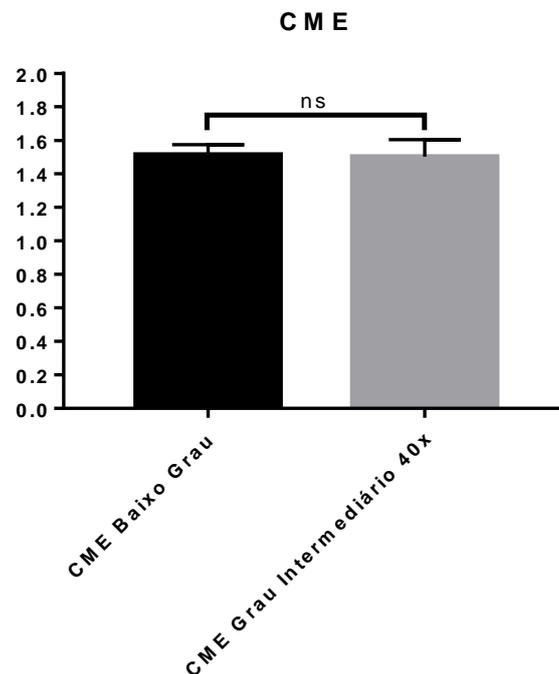


Fonte: Autores (2022).

3.2 Análise de Dimensão Fractal do núcleo

As imagens microscópicas de cada núcleo foram analisadas no software ImageJ quanto a dimensão fractal (Figuras 2 e 3), seguindo a metodologia citada acima.

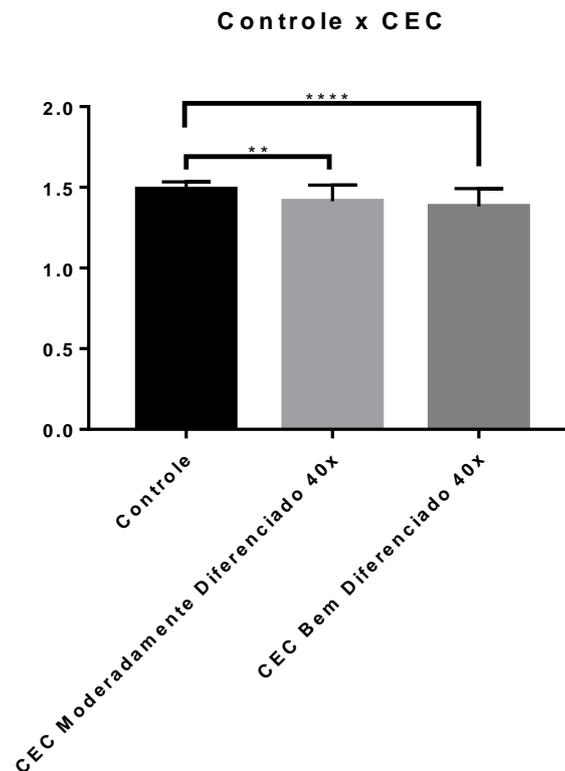
Figura 2: Média das dimensões fractais dos núcleos entre os grupos CME de baixo grau e grau intermediário.



Fonte: Autores (2022).

Na Figura 2, verifica-se que não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

Figura 3: Média das dimensões fractais dos núcleos entre os grupos controle e CEC moderadamente e bem diferenciado.



Fonte: Autores (2022).

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 vista significância estatística entre os grupos CEC moderadamente diferenciados 40x e o CEC bem diferenciado 40x.

4. Discussão

O DNA genômico em células eucarióticas é basicamente dividido em cromossomos, cada um consistindo de uma única fibra nucleossômica. A estrutura e dinâmica da cromatina desempenha um papel crítico em todos os processos envolvidos no metabolismo do DNA, como: replicação, transcrição, reparo e recombinação (Lavelle, et al., 2014). Territórios cromossômicos (TCs) constituem uma característica importante da arquitetura nuclear (Cremer, Thomas; Cremer, Marion., 2010).

Yakirevich, Evgeny *et al.* (2010) ao analisar a forma dos núcleos por dimensão fractal de CME, observaram que os núcleos dos CME possuíam tamanho pequeno e menos cromatina aglomerada ($p < 0,05$). O atual trabalho evidenciou que não houve diferença significativa entre os grupos CME de baixo e grau intermediário. A análise morfológica mostrou alta sensibilidade e especificidade quanto ao perímetro e dimensão fractal na discriminação entre hepatócitos neoplásicos e não neoplásicos, apresentando capacidade de replicação inter-observadores (Santos, Jordan Boeira dos. 2021). Indicando assim, que a dimensão fractal pode ser uma ferramenta essencial como método alternativo ou complementar para o diagnóstico.

Goutzanis, L. *et al.*, (2008) utilizaram a DF para avaliação dos núcleos de carcinoma de células escamosas diferenciado de boca: normal, bem – moderadamente, moderadamente, moderadamente pobre e pobre. Descobriu que há uma

diferença considerável no valor médio de DF nuclear entre os quatro estágios da doença e o grupo de controle. Geralmente, não foram observadas diferenças entre o grupo controle e o estágio I, nem entre os estágios II e III, II e IV, III e IV (todos $p > 0,05$). Corroborando com o presente estudo o qual foi observado que a presente 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 em diferenciado 40x.

Goutzanis, L. *et al.*, (2008) comprovaram que existe diferença estatisticamente significativa no valor médio de DF nuclear entre os diferentes graus de diferenciação tumoral e o grupo controle. Mincione, Gabriella *et al.*, (2015) também observaram diferenças significativas na DF de CECs assim como D'Addazio, G. *et al.*, (2018). Além disso, diferentes graus de diferenciação tumoral mostraram uma diferença significativa nos valores médios de DF nuclear ($p = 0,001$). Estes resultados estão de acordo com o presente estudo, visto que foi encontrado que houve diferença significativa entre os grupos controle e o CEC moderadamente diferenciado.

De maneira geral, entretanto, os valores de DF mostraram-se menores no grupo controle e nas neoplasias bem diferenciadas, ao passo que se mostraram maiores nos tumores menos diferenciados (Goutzanis, L. *et al.*, (2008), resultado este que não corrobora com o presente estudo, o qual pode ser visto na Figura 3, que a DF encontra-se maior no grupo controle e menor nos grupos CEC moderadamente diferenciado e o CEC bem diferenciado, indicando uma perda de complexidade dessas estruturas com a diferenciação do tumor. Entretanto, outro estudo analisou que entre as covariáveis clínicas avaliadas, o estágio alto foi significativamente associado a escores de DF baixos (Bose, Pinaki *et al.*, 2015), corroborando com o resultado do presente estudo.

Ao investigar as qualidades fractais de células hematológicas normais e malignas e seu potencial como uma ferramenta para caracterizar o fenótipo celular e o comportamento clínico, foi encontrado que, diferente das células estudadas do presente estudo, as células sanguíneas apresentaram um aumento da dimensão fractal nuclear (Mashiah, Adi *et al.*, 2008). Na busca para saber se a dimensão fractal da cromatina nuclear medida em preparações histológicas de rotina de melanomas malignos poderia ser um fator prognóstico para a sobrevivência, Bedin, Valcinir *et al.* (2010) encontrou que a dimensão fractal da cromatina nuclear foi incluída como fator prognóstico independentes no modelo final de regressão. O aumento da DF nuclear encontrada nos melanomas mais agressivos é o equivalente matemático de uma maior complexidade da arquitetura da cromatina. Dessa forma, há fortes evidências de que a DF da textura da cromatina nuclear é uma variável nova e promissora em modelos prognósticos de melanomas malignos (Bedin, Valcinir *et al.* 2010).

Em contrapartida, células de câncer de mama quando entram em apoptose ocorre uma redução geral da dimensão fractal. A maioria dos componentes nucleares sofre mudanças ultraestruturais, incluindo marginalização e condensação da cromatina, reduzindo significativamente suas dimensões fractais, principalmente em células abertamente apoptóticas tratadas com calcimicina 1 μM por 72 h. Portanto, as análises fractal e GLCM confirmam que a reorganização morfológica dos núcleos, atribuível a uma perda de complexidade estrutural, ocorre no início da apoptose (Einstein, Andrew J.; *et al.*, 1998; Losa, Gabriele A.; Castelli, Christian., 2005).

Algoritmos de diagnóstico auxiliados por computador podem se beneficiar do uso de dados; valores de corte específicos podem produzir ~ 99% de especificidade no diagnóstico de câncer de mama. Além disso, por permitir avaliar a complexidade tecidual, esta ferramenta pode ser utilizada para compreender a progressão das alterações histológicas no câncer (Da Silva, Lucas Glaucio *et al.*, 2021).

Ao quantificar essa anormalidade estrutural no tumor aplicando análise fractal à imagem de tomografia computadorizada com contraste (CE-CT) e avaliar seu valor de biomarcador para prever a sobrevivência de pacientes com câncer gástrico tratados, foi visto que a análise fractal por TC pode ser um biomarcador útil para pacientes com câncer gástrico,

refletindo sobrevida e características clínico-patológicas (Watanabe, Hiroki et al., 2021).

Outro estudo aponta que o DF seria um recurso adicional para discriminar nódulos benignos de malignos. Uma amostragem maior é agora necessária para confirmar a possível utilização do DF no diagnóstico de câncer de tireoide na prática clínica (Lothaire, Philippe et al. 2021). A análise da geometria fractal da ressonância magnética cerebral identificou pacientes em risco de aumentar sua incapacidade nos próximos cinco anos. Houve uma diminuição significativa na dimensão fractal e aumento da lacunaridade em diferentes regiões do cérebro ao longo dos 5 anos de acompanhamento. A dimensão fractal cortical mais baixa aumentou o risco de acúmulo de incapacidade para a Escala Expandida de Status de Incapacidade (Roura, Eloy et al., 2021).

Qualquer método de imagem clínica não pode refletir totalmente as microestruturas histológicas do osso. Avaliar a análise fractal juntamente com os resultados clínicos pode demonstrar adequada cicatrização óssea e qualidade antes da colocação do implante. A análise fractal é um método não invasivo e reprodutível, mas estudos clínicos prospectivos, randomizados e controlados adicionais são necessários para estimar a qualidade óssea antes da colocação do implante (Kaba, Yusuf Nuri et al., 2022).

5. Considerações Finais

Baseado nos nossos resultados, podemos sugerir que a utilização da dimensão fractal nuclear pode ser usada como ferramenta auxiliar no diagnóstico rápido de Carcinoma Mucoepidermóide (CME) e Carcinoma Espinocelular Oral (CEC). Esta pesquisa aponta a necessidade de aprofundarmos outros estudos com um grupo ainda maior de carcinomas orais.

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, Q. (2018). Carcinoma mucoepidermoide-revisão de literatura. *Revista Brasileira de Odontologia*, 75, 32.
- Bedin, V., Adam, R. L., de Sa, B., Landman, G., & Metze, K. (2010). Fractal dimension of chromatin is an independent prognostic factor for survival in melanoma. *BMC cancer*, 10 (1), 1-6.
- Bell, D., & El-Naggar, A. K. (2013). Molecular heterogeneity in mucoepidermoid carcinoma: conceptual and practical implications. *Head and neck pathology*, 7(1), 23-27.
- 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. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 68: 394-424.
- Brigham, E. O. (1998). *The Fast Fourier Transform*. (2º.ed.): Prentice Hall
- Bryne, M., Koppang, H. S., Lilleng, R., & Kjærheim, Å. (1992). Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *The Journal of pathology*, 166(4), 375-381.
- Campos, P. S. D. (2020). Modulação do comportamento de células do carcinoma espinocelular oral: influência de fatores químicos e físicos.
- Cremer, T., & Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3), a003889.
- Coca-Pelaz, A., Rodrigo, J. P., Triantafyllou, A., Hunt, J. L., Rinaldo, A., Strojjan, P., & Ferlito, A. (2015). Salivary mucoepidermoid carcinoma revisited. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 272(4), 799-819.
- D'Addazio, G., Artese, L., Traini, T., Rubini, C., Caputi, S., & Sinjari, B. (2018). Immunohistochemical study of osteopontin in oral squamous cell carcinoma allied to fractal dimension. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 32(4), 1033-1038.
- Dedivitis, R. A., França, C. M., Mafra, A. C. B., Guimarães, F. T., & Guimarães, A. V. (2004). Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 70, 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, A. J., Wu, H. S., & Gil, J. (1998). Self-affinity and lacunarity of chromatin texture in benign and malignant breast epithelial cell nuclei. *Physical Review Letters*, 80(2), 397.
- 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., Papadogeorgakis, N., Pavlopoulos, P. M., Katti, K., Petsinis, V., Plochoras, I., & Alexandridis, C. (2008). Nuclear fractal dimension as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 44(4), 345-353.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA, 2019.
- 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, S. (2006). Technical factors in fractal analysis of periapical radiographs. *Dentomaxillofacial Radiology*, 35(6), 393-397.
- Joseph, T. P., Joseph, C. P., Jayalakshmy, P. S., & Poothode, 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.
- 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, C., & Foray, N. (2014). Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to radiobiology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 49, 84-97.
- 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, G. A., & Castelli, C. (2005). Nuclear patterns of human breast cancer cells during apoptosis: characterisation by fractal dimension and co-occurrence matrix statistics. *Cell and tissue research*, 322(2), 257-267.
- 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, L. C. (2021). Prevalência de carcinomas espinocelulares de boca diagnosticados no laboratório de anatomopatologia bucal da Unifal-MG no período de 1998 a 2019.
- Mashiah, A., Wolach, O., Sandbank, J., Uziel, O., Raanani, P., & Lahav, M. (2008). Lymphoma and leukemia cells possess fractal dimensions that correlate with their biological features. *Acta haematologica*, 119(3), 142-150.
- 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, B. A. D. C., Vilar, L. G., Oliveira, N. R. D., Lima, P. O. D., Pinheiro, M. D. B., Domingueti, C. P., & Pereira, M. C. (2021). Infecção por papilomavírus humano e carcinoma espinocelular oral-Uma revisão sistemática. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 87, 346-352.
- Menezes, P. H., Fischer, L. V., Favero, E., & Hamid, M. J. A. A. (2020). Tratamento Cirúrgico Do Carcinoma Mucoepidermóide Em Glândula Sublingual: Uma Revisão De Literatura. *Fórum de Iniciação Científica de Odontologia da UNISC*, 1(1).
- Metze, K. (2013). Fractal dimension of chromatin: potential molecular diagnostic applications for cancer prognosis. *Expert review of molecular diagnostics*, 13(7), 719-735.
- Mincione, G., Di Nicola, M., Di Marcantonio, M. C., Muraro, R., Piattelli, A., Rubini, C., & Artese, L. (2015). Nuclear fractal dimension in oral squamous cell carcinoma: a novel method for the evaluation of grading, staging, and survival. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 44(9), 680-684.
- Murer, K., Huber, G. F., Haile, S. R., & Stoekli, 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., & Kiminezhadmalae, M. (2015). Diagnosis of lung cancer by fractal analysis of damaged DNA. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2015.
- Oliveira, J. A., Klug, R. J., & Siqueira, V. S. (2021). Metástase a distância em paciente com histórico de carcinoma espinocelular bucal. *Facit Business and Technology Journal*, 1(27).
- 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., Marigliò, 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., Alves, F. D. A., Almeida, O. P. D., & Kowalski, L. P. (2002). Carcinoma mucoepidermóide de cabeça e pescoço: estudo clínico-patológico de 173 casos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 68, 679-684.
- 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., Prieto, S., Posso, H., Cifuentes, R., Correa, C., Soracipa, Y., & Salamanca, A. (2016). Fractales: ayuda diagnóstica para células preneoplásicas y cancerígenas del epitelio escamoso cervical confirmación de aplicabilidad clínica. *Revista Med*, 24(1), 79-88.
- Sánchez, I., & Uzcátegui, G. (2011). Fractals in dentistry. *Journal of dentistry*, 39(4), 273-292.
- Santos, J. B. D. (2021). Análise da morfometria nuclear e textura da cromatina de amostras de carcinoma hepatocelular de pacientes transplantados hepáticos.
- Santos, T. S., Melo, D. G., Andrade, E. S., Silva, E. D., & Gomes, A. C. (2012). Carcinoma mucoepidermóide no palato: relato de caso. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 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, H. A. (2020). Caracterização imunistoquímica comparativa de subgrupos de células dendríticas e oncogênese viral no carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo.
- Dantas da Silveira, E. J., Pina Godoy, G., AlvesUchôa Lins, R. D., Silva Arruda, M. D. L., Formiga Ramos, C. C., de Almeida Freitas, R., & Guedes Queiroz, L. M. (2007). Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *International Journal of Surgical Pathology*, 15(4), 376-383.
- Stehlík, M., Wartner, F., & Minářová, 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., de Almeida, M. E. L., Holanda, M. E., Sousa, F. B., & de Almeida, P. C. (2009). Carcinoma espinocelular da cavidade bucal: um estudo epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 55(3), 229-236.
- 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., Passos, R. M. M., Gonçalves, J. T. C. L., Gomes, C., Bastos, A. M. T. N., & Guedes, V. R. (2016). Carcinoma espinocelular oral: um panorama atual. *Revista de Patologia do Tocantins*, 3(4), 82-102.
- Xavier, A. I. S. F., Cavalcanti, M. B., da Silva, E. B., de Jesus Amaral, A., & de Salazar, T. (2018). Fractal analysis of chromatin as a potential indicator of human exposures to ionizing radiation. *Scientia Plena*, 14(2).
- Yakirevich, E., Sabo, E., Klorin, G., Alos, L., Cardesa, A., Ellis, G. L., & Gnepp, D. R. (2010). Primary mucin-producing tumours of the salivary glands: a clinicopathological and morphometric study. *Histopathology*, 57(3), 395-409.