

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PEDRO ANTÔNIO DE ÁVILA OLIVEIRA

USO DA INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL NA CARACTERIZAÇÃO
NUCLEAR E CLASSIFICAÇÃO ENTRE LEUCOPLASIA BUCAL E
LEUCOPLASIA VERRUCOSA PROLIFERATIVA

UBERLÂNDIA

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PEDRO ANTÔNIO DE ÁVILA OLIVEIRA

USO DA INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL NA CARACTERIZAÇÃO
NUCLEAR E CLASSIFICAÇÃO ENTRE LEUCOPLASIA BUCAL E
LEUCOPLASIA VERRUCOSA PROLIFERATIVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Dr. Paulo Rogério de Faria

UBERLÂNDIA

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

O48 2020	<p>Oliveira, Pedro Antônio de Avila, 1994- Uso da inteligência artificial na caracterização nuclear e classificação entre leucoplasia bucal e leucoplasia verrucosa proliferativa [recurso eletrônico] / Pedro Antônio de Avila Oliveira. - 2020.</p> <p> Orientador: Paulo Rogério de Faria. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.710 Inclui bibliografia.</p> <p> 1. Citologia. I. Faria, Paulo Rogério de, 1976-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 576.3</p>
-------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
 Aplicadas
 Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 006/2020, do PPGBC				
Data:	28/08/2020	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	12:11
Matrícula do Discente:	11812BCE002				
Nome do Discente:	Pedro Antônio de Ávila Oliveira				
Título do Trabalho:	Uso da inteligência artificial na caracterização nuclear e classificação entre leucoplasia bucal e leucoplasia verrucosa proliferativa				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia Celular Tumoral				
Projeto de Pesquisa de vinculação:					

Reuniu-se de forma VIRTUAL pela Plataforma Zoom, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, da Universidade Federal de Uberlândia, assim composta: Professores Doutores: **Alberto da Silva Moraes – UFU; Marco Túllio Brazão Silva – UNIMONTES e Paulo Rogério de Faria – UFU** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Paulo Rogério de Faria – UFU, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Rogerio de Faria, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/08/2020, às 12:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alberto da Silva Moraes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/08/2020, às 12:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marco Túllio Brazão Silva, Usuário Externo**, em 28/08/2020, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2219798** e o código CRC **A1D86AA1**.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e
estiveram ao meu lado, que me
proporcionaram todas as condições para que eu
pudesse realizar meus sonhos

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça sublime da existência e por me permitir chegar até aqui.

À Universidade Federal de Uberlândia e aos professores da pós-graduação, por acreditarem na ciência e na educação como um dos principais pilares no progresso do país.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos que me permitiu esta conquista (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001).

À minha família, especialmente aos meus pais Rivane e Amarildo por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me dando forças e por sempre acreditarem em mim, me sinto extremamente privilegiado e honrado por ter vocês como meus pais. À minha irmã Marivane pelo companheirismo ao longo dessa jornada. Aos meus avós Lázara e Antônio por não medirem esforços para estarem comigo. À minha namorada Marília, pela companhia nos momentos felizes e por me auxiliar nos momentos difíceis de uma maneira que ninguém conseguiu durante esse período.

Ao meu orientador Dr. Paulo Rogério de Faria pela confiança depositada e pelos valiosos ensinamentos durante a pós-graduação. Não tenho dúvidas que fui orientado por um profissional de excelência, levarei sua competência e profissionalismo como exemplo a ser seguido. Obrigado por me instruir com profunda mestria na arte de fazer ciência, sua força de vontade em buscar constantemente o melhor é realmente inspiradora.

À Faculdade de Computação da UFU, em especial ao Adriano Barbosa Silva que foi crucial no desenvolvimento deste trabalho, me auxiliando e ensinando os métodos computacionais que utilizei nesta pesquisa. Ao Dr. Marcelo Zanchetta do Nascimento por todo o auxílio na execução da metodologia empregada neste estudo que também foi de fundamental importância na realização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Patologia Bucal da UFU e sua equipe de profissionais. Agradeço imensamente ao professor Adriano, às técnicas Débora e Lúbia e ao professor João Paulo. O suporte de vocês foi fundamental no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos do mestrado que fizeram esta jornada mais alegre e menos pesada, os bons momentos com vocês serão para sempre lembrados!

"Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente."

- Isaac Newton

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) de cavidade bucal é uma das neoplasias mais comuns e agressivas de cabeça e pescoço. Usualmente, o CCE é precedido por lesões denominadas desordens bucais potencialmente malignas (DBPMs). Dentre elas, a leucoplasia bucal (LB) é uma das mais prevalentes, caracterizando-se clinicamente por uma lesão branca e histologicamente por apresentar hiperparaqueratose e acantose. Uma variante da LB é a leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), que apesar de incomum, possui uma alta taxa de transformação maligna. Contudo, o diagnóstico diferencial entre elas ainda é um grande desafio, além do fato de ambas poderem apresentar aspectos histopatológicos muito parecidos, especialmente nas fases iniciais. Nos últimos anos, a inteligência artificial (IA) tem se revelado muito útil para fins de diagnóstico e prognóstico de neoplasias malignas e outras doenças. Trabalhos na área mostram que algoritmos computacionais conseguem detectar alterações teciduais imperceptíveis para um patologista, auxiliando no diagnóstico delas. No entanto, para lesões de boca, como o LB e LVP, não há estudos que empregam tal ferramenta para fins de diagnóstico. O objetivo deste estudo foi investigar os núcleos celulares das LBs e das LVPs através de um sistema computacional na tentativa de elucidar se esse compartimento celular se encontra diferente entre elas bem como o emprego de um classificador polinomial capaz de classificar as duas lesões somente com os aspectos nucleares extraídos. Sessenta e um casos de LB e três casos de LVP foram levantados, e as lâminas coradas em hematoxilina e eosina foram recuperadas e fotografadas para o treinamento e análise computacional. Dados clinicopatológicos e sócio-demográficos dos pacientes também foram obtidos a partir dos pedidos de exame e tabulados. Aplicou-se a rede neural *Mask R-CNN* como método de segmentação nuclear e o classificador polinomial para classificação de LB e LVP a partir das seguintes informações nucleares extraídas pela rede: área, perímetro, excentricidade, orientação, solidez, entropias e Índice Moran. Os dados clinicopatológicos e sócio-demográficos das LBs revelaram que a maioria dos pacientes era tabagista e do sexo masculino, enquanto nas LVPs a maioria era do sexo feminino e 1/3 sofreu transformação maligna. A rede neural empregada obteve uma média de acurácia de 92,95% na identificação dos núcleos celulares. Diferenças significantes em 11 das 13 características nucleares estudadas foram observadas entre LB e LVP, com as médias sempre maiores para as LVPs, exceto solidez. O classificador polinomial usado conseguiu classificar as duas lesões com uma média na área sob a curva (AUC) de 97,06%. Esses dados mostram que a análise de informações extraídas dos

núcleos celulares por métodos computacionais pode ser uma importante ferramenta de auxílio no diagnóstico entre essas duas lesões.

Palavras-chave: Leucoplasia bucal. Diagnóstico. Inteligência artificial.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) of the oral cavity is one of the most common and deadliest head and neck neoplasms. Usually, SCC is preceded by lesions known as oral potentially malignant disorders (OPMDs). Among them, oral leukoplakia (OL) is one of the most prevalent and is characterized clinically by a white lesion and histologically by presenting hyperkeratosis and acanthosis. A variant of LB is a lesion known as proliferative verrucous leukoplakia (PVL), which has a higher malignant transformation rate than others OPMDs. However, the differential diagnosis between them is still a great challenge, in addition to the fact that both may present very similar histopathological aspects, especially in their early stages. Recently, artificial intelligence (AI) has proved to be very useful for the diagnosis and prognosis of malignant neoplasms and other diseases. Studies have shown that computational algorithms can detect tissue changes undetectable to a pathologist, hence helping them diagnose. However, for oral lesions, such as OL and PVL, there are no studies that use such a tool for diagnostic purposes. This study aimed to investigate cell nuclei from OL and PVL lesions through a computer system to elucidate whether this cell compartment is altered between them and a polynomial classifier capable of classifying the two lesions only with the extracted nuclear aspects. Sixty-one and three OL and PVL lesions, respectively, were gathered, and their H&E-stained slides were recovered and photographed for training and computational analysis. Clinicopathological and socio-demographic data were also raised from the requested pathological exam and then tabulated. The Mask R-CNN neural network was applied as a nuclear segmentation method and the polynomial classifier for OL and PVL classification based on the following nuclear information extracted by the network: area, perimeter, eccentricity, orientation, solidity, entropy and Moran Index. Clinicopathological and socio-demographic data from the OL-affected patients revealed that most of them were smokers and males, while the PVL-affected patients were female, and 1/3 underwent a malignant transformation. The neural network employed obtained an average accuracy of 92.95% in the identification of cell nuclei. Significant differences in 11 of the 13 nuclear characteristics studied were observed between OL and PVL, with the averages always higher in the LVP lesions, except for solidity. The polynomial classifier classified the two lesions with an average area under the curve of 97.06%. These data showed that the analysis of the nuclei through computational methods could be an essential tool to aid the diagnosis between OL and PVL lesions.

Keywords: Oral leukoplakia. Diagnosis. Artificial intelligence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Exemplo de um neurônio artificial	27
Figura 2- Ilustração exemplificando uma operação de convolução	29
Figura 3- Exemplificação da operação de <i>max-pooling</i> em uma matriz bidimensional de tamanho 4×4	30
Figura 4- Exemplificação da operação de <i>average-pooling</i> em uma matriz bidimensional de tamanho 4×4	30
Figura 5- Ilustração de uma estrutura de uma RNC, exemplificando a extração de características e classificação de uma imagem de célula	31
Figura 6- Exemplo da aplicação de uma operação de erosão onde um elemento estruturante de dimensão 3×3 é empregado sobre uma imagem binária.....	32
Figura 7- Exemplo da aplicação de uma operação de dilatação sobre uma imagem binária. .	32
Figura 8- Arquitetura da rede neural <i>ResNet50</i> usada no processo de segmentação para a aprendizagem dos núcleos celulares.....	44
Figura 9- Ilustração demonstrando a funcionalidade da <i>Mask R-CNN</i> a partir dos mapas de características gerados pela <i>ResNet50</i>	45
Figura 10- Diagrama mostrando a divisão das ROIs no processo de aprendizagem da rede neural.	46
Figura 11- Operação de dilatação.....	47
Figura 12- Função de preenchimento de regiões.....	47
Figura 13- Operação de erosão.....	48
Figura 14- Etapa final: pequenos artefatos (menores que 30 pixels) foram considerados como região de fundo.....	48
Tabela 1- Distribuição dos dados clinicopatológicos de pacientes com LB (n=61) e LVP (n=3) empregados no estudo.	52
Tabela 2- Quantidade de imagens e ROIs obtidas em todo o dataset levantado para cada lesão empregada nessa etapa.....	54
Figura 15- Segmentação de uma imagem de LB pelo padrão-ouro e pela rede neural.....	55
Figura 16- Imagem de CCE apresentando um pequeno ruído que foi classificado como falso-positivo	55
Figura 17- Etapa de pós-processamento em uma imagem de CCE.....	56
Figura 18- Operação de eliminação de pequenos artefatos em uma imagem de CCE.....	57

Tabela 3- Resultado da segmentação da Mask R-CNN nos diferentes tecidos histopatológicos de LB, LVP e CCE.	57
Tabela 4- Valores dos sete níveis de entropia nuclear avaliados entre LB e LVP.	58
Tabela 5- Comparação entre os valores das características extraídas entre LB e LVP para as variáveis Índice de Moran, Área, Perímetro, Excentricidade, Orientação e Solidez.	60
Tabela 6- Resultado do classificador polinomial em separar as amostras entre LB e LVP. ...	62

LISTA DE SIGLAS

A	Área
A _C	Acurácia
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
B1	Bloco 1
B2	Bloco 2
B3	Bloco 3
B4	Bloco 4
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CPN	Complexo de Poro Nuclear
DBPMs	Desordens Bucais Potencialmente Malignas
D _C	Coeficiente Dice
E	Excentricidade
EN	Envelope Nuclear
E _N	Entropia
E _S	Especificidade
FPN	<i>Feature Pyramid Network</i>
IA	Inteligência Artificial
I _M	Índice Moran
LB	Leucoplasia Bucal
LN	Lâmina Nuclear
LVP	Leucoplasia Verrucosa Proliferativa
MN	Matriz Nuclear
MNE	Membrana Nuclear Externa
MNI	Membrana Nuclear Interna
O _R	Orientação
P _E	Perímetro
PNF	Pontuação Nuclear Fenotípica
ReLU	Unidade Linear Retificada

RNA	Rede Neural Artificial
RNC	Rede Neural Convolutcional
ROI	<i>Region of Interest</i>
RPN	<i>Region Proposal Network</i>
S	Solidez
S _E	Sensibilidade
T _C	Taxa De Correspondência
σ	Desvio padrão
μ	Média

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1- Desordens bucais potencialmente malignas	16
2.2 Núcleo.....	19
2.3- Núcleo x Câncer	21
2.4- Machine learning.....	24
2.5- Conceitos e tipos de Machine Learning	25
2.6- Redes Neurais Artificiais.....	26
2.7- Redes Neurais Convolucionais.....	28
2.8- Operações Morfológicas.....	31
2.9- Análises nucleares de tumores através de técnicas computacionais.....	32
2.10- Machine learning e doenças bucais	35
3. OBJETIVOS.....	41
3.1- Objetivo Geral	41
3.2- Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1- Amostra de casos e conjunto de dados de imagens	42
4.2- Análise Computacional	42
4.3 Segmentação	43
4.4- Pós-processamento	46
4.5- Extração de características.....	48
4.6- Classificação.....	49
4.7- Métricas de avaliação e estatística.....	50
5. RESULTADOS	52
5.1- Dados clinicopatológicos.....	52
5.2- Segmentação Nuclear e Rede Neural	54
5.2.1- Pós-processamento.....	56
5.3- Características morfológicas extraídas pela rede neural.....	58
5.4- LB e LVP.....	61
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	85

1. INTRODUÇÃO

O estudo do câncer vem ganhando cada vez mais atenção por parte dos pesquisadores, visto que se trata da segunda maior causa de mortes no mundo juntamente com um impacto econômico da ordem de 1,16 trilhão de dólares em 2010. Câncer, também chamado de neoplasia maligna, é um termo que se refere à um grande grupo de doenças caracterizado pela proliferação de células anormais que invadem os tecidos culminando em metástases. Essa doença pode se desenvolver em qualquer parte do corpo, portanto, há vários tipos de cânceres que exigem estratégias de manejo específicas (WHO, 2018). Entre os diversos tipos de neoplasias malignas, o de cavidade bucal, conhecido como CCE é um dos mais frequentes e um grave problema de saúde pública, com 354.864 novos casos e 177.384 mortes em 2018 em todo o mundo (BRAY et al., 2018). O Brasil é um dos países com mais alta incidência e mortalidade desse tipo de câncer, com estimativa de 15.190 novos casos no sexo masculino e 4.010 novos casos no sexo feminino segundo a última estatística disponível (INCA, 2020). Apesar do progresso na pesquisa e na terapia, não houve uma melhora significativa na sobrevida de pacientes com CCE de cavidade bucal nos últimos anos, além de não haver qualquer biomarcador específico de diagnóstico e prognóstico, o que ainda representa um desafio para os profissionais que tratam esses pacientes (RIVERA, 2015).

O CCE pode ser precedido por lesões precursoras denominadas DBPMs (GOPINATH; THANNIKUNNATH; NEERMUNDA, 2016). Dentre as várias DBPMs, a LB é uma das mais comuns na cavidade bucal (CAMISASCA et al., 2016). Essa doença que usualmente se desenvolve na forma de lesões brancas e que histologicamente é caracterizada pela presença de hiperparaqueratose e acantose com ou sem a presença de displasia epitelial, mas que apresenta um potencial de evolução para o CCE (WARNAKULASURIYA; JOHNSON; WAAL, 2007; VILLA; WOO, 2017).

Atualmente, os aspectos histológicos encontrados na LB não são capazes de predizer de forma independente o seu risco de transformação maligna (BAIK et al., 2014; GALE et al., 2014). Outros fatores como idade, sexo e características clínicas da lesão também são parâmetros clínicos usados para predizer um risco de transformação maligna. Nesse sentido, pode-se aferir que atualmente os critérios clínicos e histopatológicos não são suficientes para predizer com grande acurácia o risco de transformação maligna de uma LB, posando um grande

desafio aos profissionais da saúde que acompanham os pacientes acometidos por essa lesão (WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016; GANESH et al., 2018).

Os avanços tecnológicos na última década, em especial com o advento de imagens digitalizadas de alta resolução e a IA, têm permitido que a patologia adote abordagens computacionais, como *machine learning*, a fim de avaliar aspectos teciduais como a mínima ou ausência de interferência humana através do uso de algoritmos capazes de prever, por exemplo, o risco de transformação maligna de lesões pré-cancerosas (CARLETON et al., 2018; TAKAHASHI; KAJIKAWA, 2017). Assim, vários estudos têm proposto o uso da IA como uma ferramenta que se soma as já existentes para melhor compreender a biologia dessas lesões, mas com a vantagem de eliminar a subjetividade do patologista quanto à interpretação dos achados histopatológicos (SCROBOTÁ et al., 2017; KOUROU et al., 2015).

Considerando a potencialidade dessa ferramenta, este estudo investigou aspectos nucleares das células de LB e LVP com o intuito principal de detectar alterações nucleares bem como a criação de um algoritmo classificador que possa ser usado para fins de diagnóstico diferencial entre as duas lesões. Nossa hipótese foi de que os aspectos nucleares investigados por IA sejam diferentes entre as duas lesões e que essa ferramenta possa ser utilizada para fins de diagnóstico diferencial entre uma LB e LVP, especialmente nas fases iniciais de ambas as lesões quando os aspectos clinicopatológicos se sobrepõem, comprometendo a acurácia do diagnóstico tanto pelo clínico, mas principalmente pelo patologista.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Desordens bucais potencialmente malignas

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o câncer surge da transformação de células normais em células tumorais em um processo de vários estágios. Entre os diversos tipos de tumores, o CCE de cavidade bucal é usualmente precedido por DBPMs, que se desenvolvem a partir de fatores etiológicos como tabaco, álcool, doenças autoimunes e aberrações genéticas idiopáticas ou herdadas (GANESH et al., 2018). Dentre elas, pode-se citar a LB, eritroplasia, fibrose submucosa oral, queratose palatina associada ao fumo invertido, líquen plano, lúpus eritematoso e a disqueratose congênita (CAMISASCA et al., 2016; GANESH et al., 2018). Embora cada uma delas apresente aspectos histológicos específicos, algumas características histológicas como hiperqueratose (aumento de queratina), hiperplasia (aumento do número de células) e até mesmo displasia (distúrbio arquitetural do tecido epitelial acompanhado por atipia citológica) podem ser compartilhadas entre elas (WARNAKULASURIYA et al., 2008).

Para a Organização Mundial de Saúde "o termo leucoplasia deve ser usado para reconhecer placas brancas de risco questionável, excluindo outras doenças ou distúrbios conhecidos que não acarretam risco aumentado de câncer" (WARNAKULASURIYA; JOHNSON; WAAL, 2007). Os fatores etiológicos da LB incluem o tabaco (fumo ou mascado), álcool e, em menor grau, o vírus HPV (AMAGASA; YAMASHIRO; UZAWA, 2011; DIEBOLD; OVERBECK, 2018).

O diagnóstico dessa lesão é feito por exclusão, descartando quaisquer outras possíveis doenças de mucosa bucal de coloração branca (CAMISASCA et al., 2016; LODI et al., 2016). Apesar de aparecerem como lesões brancas e homogêneas, as LBs podem ter aspectos heterogêneos exibindo áreas esbranquiçadas e avermelhadas, quando é chamada de LB salpicada (SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018; NADEAU; KERR, 2018; HOSNI et al., 2009). A LB pode afetar qualquer parte da cavidade bucal, embora seja mais frequente na mucosa jugal, gengiva, assoalho da boca e região ventro-lateral da língua (NAPIER; SPEIGHT, 2008).

Os achados histológicos encontrados nas LBs incluem acantose e hiperqueratose, com presença ou não de displasia, podendo, em alguns casos, ser acompanhada de áreas de transformação maligna (WAAL, 2009; WAAL, 2018). As displasias são um importante fator

histopatológico usado na rotina clínica para avaliar uma maior probabilidade de transformação das LBs bem como acompanhar a sua evolução (CAMISASCA et al., 2016; WARNAKULASURIYA et al., 2008; SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018). Elas se caracterizam histologicamente por apresentarem estratificação epitelial irregular, perda da polaridade basal, aumento no número de figuras mitóticas e disqueratose; já as características citológicas incluem hipercromatismo, aumento do tamanho do núcleo e pleomorfismo nuclear (SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018; WAAL, 2009; WARNAKULASURIYA et al., 2008; VILLA ; SONIS, 2018). As displasias são classificadas histologicamente em três graus, como segue: (1) quando o distúrbio arquitetônico do tecido se limitar ao terço inferior do epitélio acompanhado por atipias citológicas mínimas, é classificada como displasia leve; (2) se os distúrbios arquitetônicos se estenderem até o terço médio do epitélio, ela é classificada como displasia moderada; (3) na presença de atipia acentuada acometendo inclusive a camada superficial, ela é então classificada como displasia grave. No entanto, caso essas alterações envolvam totalmente a espessura do epitélio essa lesão é diagnosticada como carcinoma *in situ* (WARNAKULASURIYA et al., 2008; WAAL, 2009).

Apesar disso, relativamente poucas lesões, de fato, progridem para o CCE, pois a maioria delas pode persistir inalteradas na cavidade bucal, aumentar ou diminuir de tamanho, ou até mesmo desaparecer completamente (SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018). Além das displasias, outros fatores também são relacionados à transformação das LBs: as de aspecto homogêneo, por exemplo, têm baixo risco de transformação maligna comparadas às não homogêneas, enquanto a LVP tem uma alta taxa de transformação maligna (NADEAU; KERR, 2018; VILLA; SONIS, 2018; WAAL, 2009; WAAL, 2010; OKOTURO et al., 2018; SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018; BAGAN et al., 2011). O sítio anatômico também pode indicar uma forte relação com o poder de transformação delas como é observado para as lesões que se desenvolvem na língua, assoalho da boca e palato mole (GALE et al., 2014; RHODUS; KERR; PATEL, 2014; SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018; VILLA; SONIS, 2018). Outros fatores como o sexo, idade, evolução, tamanho da lesão também são levados em conta para avaliar o risco de malignização (WAAL, 2009; VILLA et al., 2019; DONG et al., 2018).

Estudos têm sido realizados a fim de elucidar os mecanismos moleculares que as permitem evoluir para o CCE. O estudo de Wang e outros (2009), por exemplo, avaliou as diferenças de expressão de certas proteínas para identificar potenciais biomarcadores de progressão da LB. Foram encontradas 85 proteínas expressas diferencialmente entre as LBs com displasia e os CCE, incluindo proteínas da família S100, anexina, choque térmico, PA28,

entre outras, auxiliando na elucidação dos mecanismos envolvidos na transformação maligna bem como na busca por novos alvos terapêuticos.

Outros trabalhos também buscaram compreender a natureza progressiva das LBs. Sobre isso, Villa e outros (2019) demonstraram que as LBs exibindo apenas queratose podem carregar alterações moleculares que as tornem mais suscetíveis à transformação maligna. Este estudo identificou alterações similares entre as LBs exibindo apenas queratose das LBs exibindo displasia moderada a grave. Setenta e cinco por cento de ambas as lesões apresentaram mutações nos genes *KMT2C* (mutação encontrada em diversos tipos de cânceres), *TP53* (35%) e *TIAMI* (30%); outros genes que apresentavam alterações maiores ou iguais a 15% entre os dois tipos de lesões também mostraram similaridade na taxa de mutação em ambos os casos.

Um estudo similar foi conduzido por Farah e Fox (2019). Através de uso de sequenciamento de RNA, o estudo avaliou as diferenças moleculares entre LBs com e sem displasia. Eles observaram que 47 genes expressaram diferencialmente entre os dois tipos de lesões, o que permitiu classificá-las em três grupos: com displasia, sem displasia e um grupo intermediário com características similares ao grupo de lesões com displasia, mas classificado como não displásico no estudo, ou seja, lesões que exibiam alterações moleculares incipientes comumente observados nas displasias. O estudo também observou que as LBs com displasia possuíam vias de sinalização desreguladas relacionadas à desorganização da matriz extracelular, sugerindo que essas mudanças podem ser características das lesões displásicas iniciais.

Visioli e outros (2012) analisaram a expressão de duas proteínas reguladoras do ciclo celular, p53 e p21WAF1, em diferentes tipos de LBs com e sem displasia. O estudo não encontrou alterações significativas na expressão dessas proteínas entre as lesões, embora estivessem hiperexpressas. Dessa maneira, uma vez que alteração na expressão de ambas as proteínas está diretamente relacionada a processos carcinogênicos, o estudo sugere que todos os tipos histopatológicos de LBs devem ser considerados como uma DBPM.

Já as LVPs são uma variante rara da LB que se iniciam como placas brancas de hiperqueratose e se tornam multifocais e verrucosas, sendo encontradas principalmente na mucosa bucal e língua (NADEAU; KERR, 2018; OKOTURO et al., 2018; SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018; MUNDE; KARLE, 2016). Se por um lado as LBs possuem uma taxa de transformação maligna relativamente baixa, as LVPs possuem uma alta probabilidade de recorrência e uma taxa de transformação usualmente maior que 70%, além de serem

resistentes à todas as modalidades de tratamento disponíveis (MUNDE; KARLE, 2016; UPADHYAYA et al., 2018). Além disso, nos estágios iniciais, os aspectos histopatológicos das LVPs podem ser indistinguíveis das LBs convencionais, o que dificulta ainda mais o diagnóstico nos estágios iniciais da doença (UPADHYAYA et al., 2018).

Demograficamente, a LVP é mais comum em mulheres com mais de 60 anos de idade (MUNDE; KARLE, 2016). Contudo, a etiologia da LVP ainda não é bem conhecida, podendo surgir e se desenvolver igualmente entre fumantes e não fumantes, e a influência de certos tipos de vírus HPV como fator etiológico ainda é muito discutida na literatura e inconclusiva. Tal condição é reflexo dos poucos estudos feitos a fim de compreender as causas ou o melhor manejo da doença, dessa forma, estudos são necessários para que se possa investigar e criar alvos terapêuticos bem como novas abordagens de diagnósticos, sendo o diagnóstico precoce essencial para se tratar e gerenciar a lesão (MUNDE; KARLE, 2016; UPADHYAYA et al., 2018).

Apesar dos estudos que procuram elucidar o processo de transformação das LBs, a identificação de lesões que irão progredir para CCE ainda é um dos maiores desafios do ponto de vista clínico e patológico (PINTO et al., 2020). Contudo, mesmo ainda com poucos estudos, os trabalhos envolvendo *machine learning* na patologia bucal têm mostrado um novo e promissor campo para o desenvolvimento de novas abordagens de diagnóstico e prognóstico. Espera-se com isso, que trabalhos futuros envolvendo *machine learning* na cavidade bucal possam auxiliar não apenas em um diagnóstico mais preciso e menos subjetivo, mas também na melhora quanto à definição de marcadores de prognóstico que possam ser traduzidos em um real risco de transformação maligna de tais lesões (SULTAN et al., 2020).

2.2- Núcleo

O núcleo celular é constantemente estudado e avaliado quando se trata de câncer. Trata-se de um compartimento intracelular delimitado por uma dupla membrana interrompida por vários poros de proteínas denominados complexo de poro nuclear (CPN), formando o envelope nuclear (EN), onde se encontra a cromatina, matriz nuclear (MN), lâmina nuclear (LN), nucléolo e o nucleoplasma (GUO; FANG, 2014; HETZER; WALTHER; MATTAJ, 2005).

A dupla membrana é constituída pela membrana nuclear interna (MNI) e a membrana nuclear externa (MNE). A MNE é contínua com o retículo endoplasmático rugoso, enquanto a MNI abriga um conjunto único de proteínas de membrana que interagem diretamente ou indiretamente com a LN, conectando o EN à cromatina (GUO; FANG, 2014; HETZER; WENTE, 2009; DE MAGISTRIS; ANTONIN, 2018; DE LEEUW; GRUENBAUM; MEDALIA, 2018). Os CPNs são estruturas complexas formadas por múltiplas cópias de cerca de 30 proteínas diferentes conhecidas como nucleoporinas (GUO; FANG, 2014; GU, 2017; BECK; HURT, 2016). Os CPNs funcionam como portões altamente seletivos que atravessam o envelope nuclear e permitem a troca bidirecional de macromoléculas entre o núcleo e o citoplasma (GU, 2017; HETZER; WALTHER; MATTAJ, 2005). Além da função de transporte de moléculas, as proteínas que constituem os CPNs também exercem funções nucleares, como na organização genômica e regulação da expressão gênica (BORSOS; TORRES-PADILLA, 2016).

A MNI interage com um conjunto de filamentos intermediários que formam a LN (BORSOS; TORRES-PADILLA, 2016; DE MAGISTRIS; ANTONIN, 2018; LEEUW; GRUENBAUM; MEDALIA, 2018). A LN é formada por proteínas chamadas de laminas, as quais são responsáveis por regular diversas funções nucleares como a organização espacial dos cromossomos dentro do espaço nuclear, o formato do núcleo, a estabilidade mecânica, a expressão gênica e modificações epigenéticas das histonas (DECHAT et al., 2010). Estudos apontam que as proteínas que compõem a LN têm um importante papel na organização espacial genômica (regiões chamadas de domínios associados à lamina), mostrando serem unidades arquiteturais dos cromossomos interfásicos (GUELEN et al., 2008; PERIC-HUPKES et al., 2010; SHEVELYOV; ULIANOV, 2018). Além disso, as laminas mostram-se importantes no processo de diferenciação celular. Trabalhos como o de Peric-Hupkes e outros (2010) revelaram a estreita ligação entre a organização genômica e sua interação com a lâmina nuclear durante a diferenciação em células tronco embrionárias de ratos, sendo que cada passo da diferenciação levou a uma reorganização da interação entre a cromatina e a lâmina nuclear e, conseqüentemente, à repressão gênica.

A cromatina é um complexo formado por DNA, histonas e outras proteínas não histônicas formando um complexo que garante a compactação e organização do DNA em diferentes níveis (LI; ZHU, 2015). Esses diferentes graus de empacotamento da cromatina permitem que os eucariotos armazenem grandes volumes de DNA em um pequeno compartimento para proteger a estrutura dessa molécula, controlar a expressão gênica e a sua replicação (THORPE;

CHARPENTIER, 2016). Existem dois tipos de cromatina no núcleo interfásico vistos sob o microscópio óptico: eucromatina e heterocromatina. Essa classificação se baseia no estado de compactação físico e atividade transcricional: a eucromatina é a menos condensada e rica em genes transcricionalmente ativos, enquanto a heterocromatina é mais compactada e ausente e/ou pobre em genes transcricionalmente ativos (OH et al., 2018; MISTELI, 2007).

Outra estrutura é a matriz nuclear (MN). Ela é responsável por regular diversos processos nucleares como a replicação do DNA, transcrição, *splicing*, expressão gênica, sinalização celular, apoptose, além da manutenção do formato do núcleo e organização espacial da cromatina (LEMAN; GETZENBERG, 2008; WASAĞ; LENARTOWSKI, 2016). A MN consiste numa rede de ribonucleoproteínas fibro-granulares que se conecta à MNI (COELHO et al., 2016). A interação entre a cromatina e a MN ocorre através de sequências de DNA ricas em AT chamadas de regiões de fixação de matriz (MARs) (BARBORO et al., 2012). Apesar disso, ainda não há um consenso sobre a real existência da MN *in vivo*, incluindo a impossibilidade de visualizar essa estrutura em células intactas (HANCOCK, 2000). Segundo Razin e colaboradores, diversos estudos falharam em demonstrar a existência *in vivo* da MN, sendo aparentemente desnecessário a presença de uma estrutura filamentosa que auxilia na compartimentalização nuclear.

No interior do núcleo há também estruturas especializadas e compartimentalizadas responsáveis por criarem sítios distintos facilitadores de reações biológicas (MAO; ZHANG; SPECTOR, 2011). Entre essas estruturas, o nucléolo está envolvido na transcrição e processamento do RNAr e na montagem das subunidades ribossomais (MAO; ZHANG; SPECTOR, 2011). O nucléolo também atua na modificação e montagem de outros RNAs nucleares e ribonucleoproteínas, além de regular a progressão do ciclo celular sequestrando e modificando diversas proteínas (MAO; ZHANG; SPECTOR, 2011; BOULON et al., 2010). Outras estruturas como os corpúsculos de Cajal, espículas nucleares e paraespículas também são corpos nucleares encontrados dentro do núcleo celular e que também exercem diferentes funções fisiológicas (MAO; ZHANG; SPECTOR, 2011).

2.3- Núcleo x Câncer

O câncer é definido como uma doença genética que surge como resultado de um acúmulo de mutações no DNA ao longo do tempo (HANAHAN; WEINBERG, 2011; STRATTON;

CAMPBELL; FUTREAL, 2009). Essas mutações incluem substituição de uma base por outra, inserções ou deleções de pequenos ou extensos segmentos de DNA, rearranjos e ampliações (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009). Como consequência, ao analisar sob o microscópio as células cancerígenas, patologistas se deparam com alterações nucleares que são importantes no diagnóstico dessas doenças (CARLETON et al., 2018; DEY, 2009; LEMAN; GETZENBERG, 2008; MADRAZO et al., 2017). No que diz respeito ao núcleo, diversos fatores têm sido relacionados às modificações desse compartimento celular durante o processo de carcinogênese, os quais podem afetar o EN, a cromatina e a MN (DEY, 2009).

A MN é uma importante fonte de potenciais biomarcadores do câncer (LEMAN; GETZENBERG, 2008; WASAG; LENARTOWSKI, 2016). Toumpanaki e outros (2009) mostraram, por eletroforese, que as proteínas extraídas da matriz extracelular de adenocarcinomas de cólon humano podem ser usadas como biomarcadores de detecção inicial da doença, progressão, recorrência e metástase. Já Barboro e colaboradores (2012) observaram que, estudando câncer de próstata, o grau de organização da MN estava na dependência da agressividade tumoral. Este estudo ainda analisou a ligação entre matriz nuclear e MARS (regiões de fixação da matriz) tal que na linhagem menos agressiva (LNCaP) houve uma maior organização da MN em comparação com a linhagem mais agressiva (PC3).

Além dos fatores já mencionados, o EN exerce um papel imprescindível na manutenção da cromatina, pois mudanças na sua morfologia são, provavelmente, acompanhadas de alterações na expressão gênica (CHOW; FACTOR; ULLMAN, 2012). Estudos têm demonstrado uma relação direta entre as alterações no EN e o desenvolvimento tumoral e metástase. Denais e outros (2016) reportaram que a migração de células tumorais de câncer de mama e de fibrossarcoma poderia alterar a integridade do EN e do DNA, promovendo danos ao material genético e alterações cromossômicas como aneuploidias e rearranjos gênicos, além de ocasionar o escape de proteínas para o citoplasma. Além disso, nos experimentos *in vivo*, os autores observaram que células de fibrossarcoma implantadas em ratos sofreram ruptura do EN durante o processo de invasão tecidual, confirmando os achados *in vitro*.

Na carcinogênese, os constituintes nucleares mostram-se alterados com o intuito de facilitar a passagem de células tumorais pelo tecido, como descrito por Ali e outros (2017). Neste estudo, observou-se que o uso de nanopartículas de ouro contra o EN durante a migração de células tumorais aumentou a rigidez nuclear bem como um aumento da expressão de laminas A/C, levando a uma redução da capacidade de migração delas. A expressão e localização aberrante das laminas A/C tem sido observada em células cancerígenas de diferentes tipos de

câncer, tais como carcinomas de cólon, gástrico, mama, próstata, pele e cerebral (IRIANTO et al., 2016; SAKTHIVEL; SEHGAL, 2016). O estudo de Saarinen e outros (2015) com 501 pacientes com câncer de próstata tratados cirurgicamente demonstrou a relação entre expressão de laminas A e B e a sobrevivência de pacientes, indicando que tais proteínas podem ser potenciais marcadores e que atuam em diferentes estágios de progressão tumoral. No estudo, observou-se que a redução de laminas A/C e B2 aumentou o risco de metástase para linfonodos, enquanto a alta expressão de laminas B1 associou-se à recorrência. Nesse sentido, as laminas podem dizer muito sobre os estágios em diferentes cânceres, sugerindo que essas proteínas possuem diferentes papéis no câncer de próstata e podem ser utilizadas como biomarcadores prognósticos.

Embora ainda não haja um grande volume de estudos relacionando CPNs com câncer, alguns trabalhos têm sugerido, por exemplo, que o aumento da expressão da Nup POM121 induz o transporte nuclear mediado por importina de MYC, E2F1, AR e GATA2, que por sua vez promovem uma maior agressividade do câncer de próstata (RODRIGUEZ-BRAVO et al., 2018). Falando um pouco mais sobre as nucleoporinas, a Nup88 tem sido uma das mais estudadas, uma vez que está hiperexpressa em tecidos tumorais em estágios avançados (XU; POWERS, 2009). No estudo de Zhang e outros (2007), por exemplo, a forte expressão de Nup88 foi observada em lesões metastáticas linfonodais comparada com o tumor primário de cólon, o que indica que essa proteína não está relacionada apenas ao desenvolvimento tumoral, mas também à agressividade e maior potencial metastático. Nesse mesmo estudo, observou-se um aumento da expressão de Nup88 de acordo com o grau histológico do tumor, sendo que 48% dos tumores pobremente diferenciados apresentavam alta expressão em detrimento dos tumores bem (21%) e moderadamente diferenciados (42%).

Conclui-se que as mudanças na estrutura e composição do EN e de seus constituintes são eventos que podem estar ligados à tumorigênese, pois podem alterar as propriedades físicas e bioquímicas das células (BELL; LAMMERDING, 2016). Dessa maneira, os pesquisadores viram que o núcleo e seus constituintes podem ser valiosos para compreender a biologia de diversas doenças. Portanto, não apenas estudos moleculares, mas estudos que visam analisar aspectos morfológicos nucleares através de ferramentas computacionais poderão ajudar os pesquisadores bem como os patologistas em estabelecerem, com mais precisão, o diagnóstico de doenças que apresentam similaridades histológicas, mas comportamentos, tratamentos e prognósticos distintos.

2.4- *Machine learning*

Machine learning (ou aprendizado de máquina) é considerado um ramo da IA, pois permite a aprendizagem pela extração de padrões significativos a partir de exemplos dados (*inputs*) (DEO, 2015; ERICKSON et al., 2017). A IA tem sido largamente usada na patologia com o intuito de aprimorar o diagnóstico de uma lesão, pois oferecem modelos computacionais com reconhecimento de imagem que correspondem ou mesmo superam especialistas humanos. Como exemplo, temos o uso do *machine learning* no desenvolvimento de avaliação baseada em modelo de recursos de diagnóstico de rotina patológica e a capacidade de extrair e identificar novos recursos que fornecem informações sobre uma doença (ACS; RANTALAINEN; HARTMAN, 2020).

O processo de *machine learning* na patologia começa com um sistema de algoritmos que identifica e calcula os recursos de imagem que se mostram importantes na predição ou diagnóstico de interesse. Em seguida, o sistema do algoritmo identifica a melhor combinação desses recursos para classificar uma imagem ou calcular alguma métrica para a região de imagem especificada (ERICKSON et al., 2017). Por exemplo, se aplicarmos um algoritmo de *machine learning* a um conjunto de imagens de tumores juntamente com algum conhecimento sobre ele (por exemplo, tumores benignos ou malignos), o algoritmo, através do treinamento pelo conjunto de dados das imagens e das informações recebidas, poderá aprender com essas informações e aplicá-las para realizar alguma tarefa específica, por exemplo, se uma imagem pertence a um tumor benigno ou maligno (ERICKSON et al., 2017).

Através de abordagens computacionais, pesquisas vêm sendo feitas nas últimas duas décadas a fim de desenvolver diagnósticos auxiliado por computador cada vez mais precisos (TAKAHASHI; KAJIKAWA, 2017). Esses diagnósticos realizados por algoritmos dão suporte clínico como uma "segunda opinião", auxiliando na tomada de decisões mais rapidamente e com maior confiança e acurácia (ERICKSON et al., 2017; TAKAHASHI; KAJIKAWA, 2017). Por conta da sua alta eficiência em detectar, diagnosticar e reduzir o tempo de trabalho, sistemas que utilizam diagnósticos auxiliado por computador têm aumentado ao longo dos anos, de modo que essa tecnologia é atualmente um importante assunto debatido nas pesquisas médicas (TAKAHASHI; KAJIKAWA, 2017).

2.5- Conceitos e tipos de *machine learning*

Alguns termos são comumente usados nos estudos envolvendo *machine learning*, cujo entendimento é de fundamental importância para a compreensão das abordagens usadas neste estudo. O primeiro deles é a segmentação. Trata-se de dividir a imagem em partes, sejam elas regiões ou objetos de interesse que serão rotuladas posteriormente (ERICKSON et al., 2017; SOLOMON; BRECKON, 2010). Por exemplo, a segmentação de tumores define a área que o tumor abrange na lâmina (ERICKSON et al., 2017). O objetivo nesta etapa é determinar os limites do objeto de interesse, sejam núcleos celulares ou regiões de tecido (ERICKSON et al., 2017). A segmentação é uma tarefa de extrema importância no processamento de imagens, pois além de anteceder passos subsequentes, deve ser realizado com precisão (SOLOMON; BRECKON, 2010).

Em seguida, tem-se a classificação. A classificação visa rotular um grupo a uma determinada classe separando os diferentes objetos previamente segmentados em categorias específicas (ERICKSON et al., 2017; SOLOMON; BRECKON, 2010). Por exemplo, separar células saudáveis das anormais ou tumores benignos dos malignos (ERICKSON et al., 2017; SOLOMON; BRECKON, 2010). Aqui, a experiência humana é normalmente requisitada em dois momentos: para especificar a tarefa, propondo quais classes serão consideradas e quais parâmetros ou variáveis (como forma, textura, densidade e tamanho) são relevantes para realizar a classificação com êxito; e para rotulagem de classes, onde um humano atribui exemplos a determinadas classes através de suas características e propriedades (SOLOMON; BRECKON, 2010).

O algoritmo é o conjunto de etapas executadas para criar o modelo utilizado para prever as classes com maior precisão através dos recursos usados para treinamento por meio dos exemplos empregados (ERICKSON et al., 2017). O treinamento é a fase onde o sistema de algoritmos de *machine learning* é alimentado com os dados rotulados com as respostas corretas (rótulos/*input*) que vão servir como exemplos para a aprendizagem – esses dados carregam, por exemplo, o tipo de célula ou o tipo de tumor que se deseja que o algoritmo aprenda (ERICKSON et al., 2017; ACS; RANTALAINEN; HARTMAN, 2020). Cada *input* é multiplicado por algum valor ou peso. No treinamento, os pesos são atualizados constantemente até que se alcance o melhor modelo (ERICKSON et al., 2017).

Os recursos são os valores em números que representam o exemplo utilizado pelo algoritmo (ERICKSON et al., 2017). No caso de imagens médicas, como lâminas contendo cortes histológicos de lesões, os recursos podem ser os valores reais de pixel, pontos fortes de borda, diferenças nos valores de pixel em uma dada região ou outros valores (ERICKSON et al., 2017). Por fim, o teste é a etapa em que se avalia a habilidade do algoritmo em separar os casos em suas respectivas classes após o processo de treinamento (ERICKSON et al., 2017; KOUROU et al., 2015). Por exemplo, um algoritmo que visa separar imagens de tumores malignos de benignos, após a etapa de treinamento, o algoritmo será testado em um novo conjunto de imagens desconhecidas para avaliar sua capacidade em classificar as imagens entre tumores malignos e benignos (ERICKSON et al., 2017).

Existem três tipos de *machine learning* comumente usados: aprendizado supervisionado, não supervisionado e por reforço (ERICKSON et al., 2017). No aprendizado supervisionado, um conjunto de dados rotulados é utilizado no treinamento da rede como exemplos para que a máquina aprenda alguma tarefa específica, como reconhecer tumores malignos e benignos e diferenciá-los, sendo esses dados exemplificados e aprendidos na fase de treinamento (ERICKSON et al., 2017; KOUROU et al., 2015; DEO, 2015). No aprendizado não supervisionado não há exemplos para que a máquina possa aprender. Em vez disso, o próprio algoritmo procura padrões e características que possam, por exemplo, separar diferentes classes de tecidos (ERICKSON et al., 2017; DEO, 2015). Com isso, o próprio algoritmo determina quantas classes há e como separá-las (ERICKSON et al., 2017). Já no aprendizado por reforço, assim como no supervisionado, o aprendizado é realizado com dados rotulados como exemplos, porém o sistema recebe dados não rotulados para que o algoritmo tente melhorar ainda mais a classificação através de novas características descobertas, similar ao que ocorre no aprendizado não supervisionado (ERICKSON et al., 2017).

2.6- Redes Neurais Artificiais

Basicamente, uma Rede Neural Artificial (RNA) é um sistema que utiliza neurônios artificiais para modular a maneira de aprendizagem do cérebro dos animais para executar alguma tarefa específica. Assim como os neurônios humanos, os neurônios usados numa RNA possuem fortes interconexões que culminam em algum aprendizado (HAYKIN, 2009). Segundo Haykin (2009), as RNAs se assemelham ao cérebro em dois aspectos: 1) a partir do ambiente, a informação é transmitida pela rede que, por sua vez, passa por um processo de

aprendizagem, resultando em um conhecimento adquirido; 2) as forças de conexão entre neurônios, também chamadas de pesos sinápticos, são utilizadas para armazenar o conhecimento adquirido.

Os neurônios artificiais, por sua vez, são compostos por três elementos básicos: (1) as sinapses, responsáveis por propagar as informações entre neurônios, cada uma possuindo um peso próprio; (2) um somador, que soma as informações de entrada providas das sinapses e geram uma nova informação; (3) uma função de ativação, responsável por restringir a amplitude do sinal produzido pelo neurônio em um valor finito permissível para propagar a informação (sinapse) (HAYKIN, 2009). Na Figura 1 observa-se uma ilustração esquematizando a estrutura de um neurônio artificial.

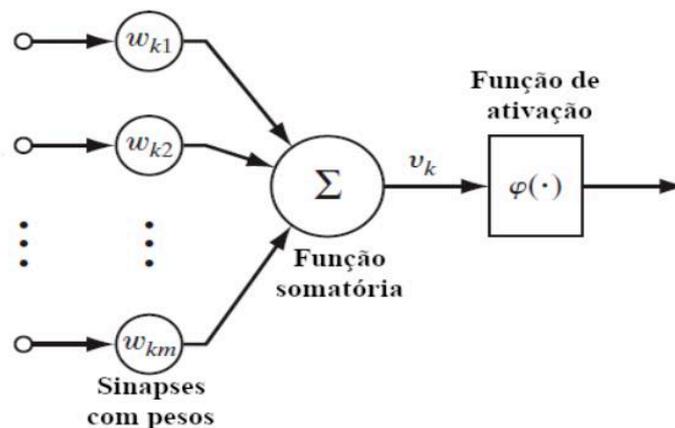


Figura 1- Exemplo de um neurônio artificial (imagem retirada de SILVA, 2019 e adaptada de HAYKIN, 2009).

A RNA passa por uma fase de treinamento que visa aprender os padrões característicos de um conjunto de dados, os quais são enviados a todos os neurônios artificiais para que uma taxa de acertos seja calculada, processo este denominado de *epoch*. A seguir, os dados passam novamente pela rede e os pesos de cada sinapse são atualizados para valores maiores ou menores com o intuito de aumentar a taxa de acerto da rede (SILVA, 2019).

A arquitetura de uma RNA é composta por camadas de neurônios, possuindo, no mínimo, duas camadas: (1) a camada de entrada (*input*) que analisa e processa as informações dos conjuntos de dados; (2) camada de classificação (*output*), que através dos dados processados na(s) camada(s) prévia(s), separa-os em classes com base nos padrões característicos previamente conhecidos (SILVA, 2019). Esses *outputs* são então comparados com os valores

esperados obtidos através dos exemplos de treinamento e a taxa de erro é calculada para então atualizar os pesos das sinapses, visando diminuir a taxa de erro (ERICKSON et al., 2017). RNAs podem contar com outras camadas entre a de entrada e a de classificação, denominadas camadas intermediárias (ERICKSON et al., 2017; SILVA, 2019). Quando essas RNAs possuem várias camadas (normalmente mais de 20), usa-se a expressão *deep learning* para se referir a essas redes (ERICKSON et al., 2017; CHANG et al., 2019). Diversos tipos de RNAs do tipo *deep learning* têm sido desenvolvidas nos últimos anos para os mais diversos fins, incluindo a detecção automática de objetos, segmentação em imagens e classificação de doenças (ERICKSON et al., 2017). Entre elas, a Rede Neural Convolutiva (RNC) tem sido largamente utilizada na patologia (ACS; RANTALAINEN; HARTMAN, 2020; CHANG et al., 2019).

2.7- Redes Neurais Convolucionais

RNCs são redes comumente usadas no estudo e análise de imagens, pois utilizam de convoluções que reduzem e transformam as dimensões de imagens a fim de gerar alguma representação com os dados gerados (ERICKSON et al., 2017; SILVA, 2019; HAYKIN, 2009). Essas redes assumem que os *inputs* têm relações geométricas, como linhas e colunas de imagens e, a partir disso, os neurônios artificiais que compõem as camadas convolucionais realizam o processo de convolução, gerando uma imagem menor (ERICKSON et al., 2017; SILVA, 2019; HAYKIN, 2009).

Basicamente, uma RNC é composta por uma camada de entrada (*input*), uma camada de saída (*output*) e várias camadas ocultas. Cada camada consiste em um número definido de filtros convolucionais que são aplicados nas transformações nas dimensões das imagens (ACS; RANTALAINEN; HARTMAN, 2020). Os filtros se deslocam sobre todas as camadas da imagem realizando o processo de convolução e, como resultado, para cada filtro utilizado na operação, é criado um mapa de características bidimensional (GOODFELLOW; BENGIO; COURVILLE, 2016; SILVA, 2019). Cada filtro incorporado visa calcular diferentes características como detecção de borda, nitidez e desfoque, portanto, quanto mais filtros forem utilizados, mais características e dados são obtidos (GOODFELLOW; BENGIO; COURVILLE, 2016; RIGHETTO, 2016; SILVA, 2019). Um exemplo pode ser observado na Figura 2.

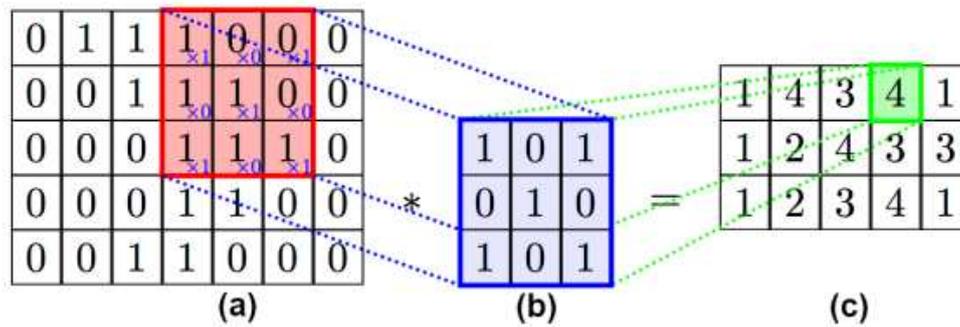


Figura 2 - Ilustração exemplificando uma operação de convolução: (a) uma imagem de tamanho 7×5 ; (b) um filtro convolucional de tamanho 3×3 utilizado na imagem (a); (c) uma matriz de características resultante (imagem retirada de Silva, 2019).

Outro importante componente de muitas RNCs são as camadas de *pooling*, que basicamente simplificam a informação do mapa de características gerado pelas camadas convolucionais (NIELSEN, 2015). O objetivo desta etapa é diminuir as dimensões das imagens e simplificar a informação, mantendo e evidenciando os recursos e informações relevantes, o que auxilia na agilidade do treinamento e na criação de uma invariância espacial melhor (reconhecimento de um mesmo objeto mesmo variando sua aparência) (RIGHETTO, 2016; SILVA, 2019; VARGAS; PAES; VASCONCELOS, 2016).

Basicamente, a camada de *pooling* opera agrupando um conjunto de dados. Por exemplo, a entrada é subdividida em janelas 4×4 e de cada uma dessas janelas é selecionado um valor que as represente através de uma métrica (VARGAS; PAES; VASCONCELOS, 2016; LOPES, 2017; PENHA, 2018). Formas comuns desse tipo de operação são a de *max-pooling*, que tem como métrica o maior valor presente em cada janela como saída, e a de *average-pooling*, que retoma o valor médio de cada janela como resultado (LOPES, 2017; PENHA, 2018; SILVA, 2019). Exemplos dessas operações são vistas nas Figuras 3 e 4.

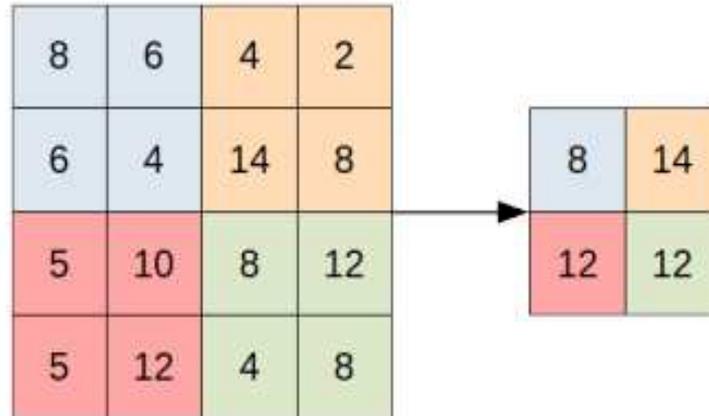


Figura 3- Exemplificação da operação de *max-pooling* em uma matriz bidimensional de tamanho 4×4 (imagem retirada de SILVA, 2019).

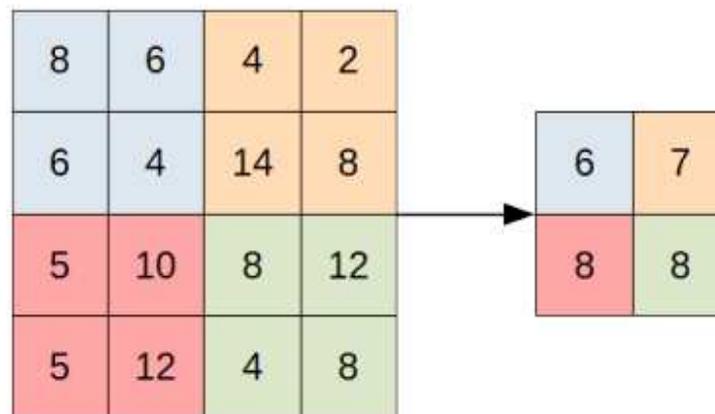


Figura 4- Exemplificação da operação de *average-pooling* em uma matriz bidimensional de tamanho 4×4 (imagem retirada de SILVA, 2019).

Por fim, as RNCs possuem camadas totalmente conectadas usadas no processo de classificação. Nessas camadas, todos os neurônios da camada anterior são conectados aos neurônios de saída, que representam as classes a serem classificadas (ARAÚJO, 2018; PENHA, 2018). Aqui, todas as informações que foram aprendidas nas camadas anteriores são combinadas, gerando descritores de características que, então, são classificados pela camada de saída usando normalmente a função *softmax* (CUTTLE, 2018; LOPES, 2017; PENHA, 2018; RIGHETTO, 2016). Essa função gera um resultado de classificação a partir dos dados de saída de todos os neurônios da camada anterior, que permite inferir a probabilidade de uma imagem pertencer a uma certa classe pré-determinada (ARAÚJO, 2018; PENHA, 2018; RIGHETTO, 2016; CUTTLE, 2018). Na Figura 5 é possível observar a estrutura de uma RNC, apresentando as camadas comumente empregadas na extração de características e na classificação.

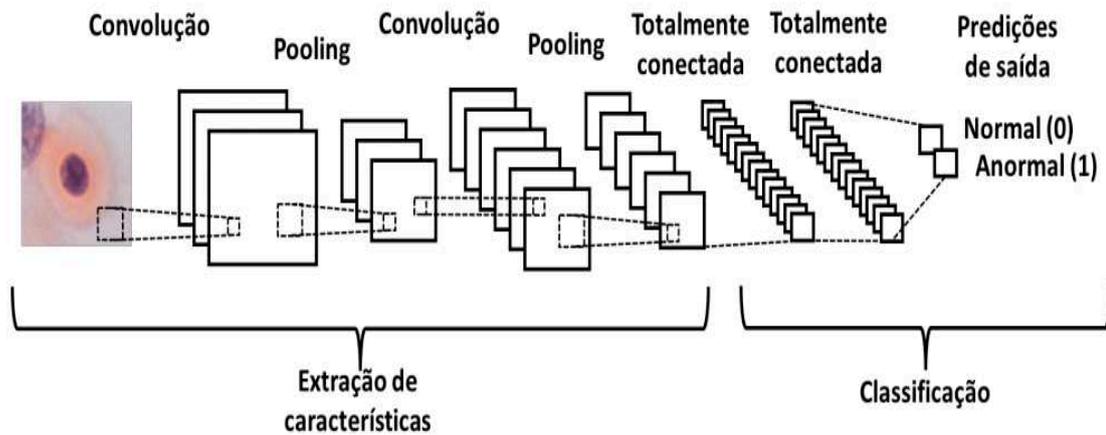


Figura 5– Ilustração de uma estrutura de uma RNC, exemplificando a extração de características e classificação de uma imagem de célula (imagem adaptada de ARAÚJO, 2018).

2.8- Operações Morfológicas

As operações morfológicas podem ser usadas em todos os tipos de imagens, mas seu uso principal se faz em imagens binárias (imagens contendo apenas pixels pretos e brancos) (SOLOMON; BRECKON, 2010). Essas operações consistem em mapear um elemento estruturante em uma imagem específica (SOLOMON; BRECKON, 2010; SILVA, 2019). O elemento estruturante consiste em um arranjo retangular de pixels que possui valor binário (0 e 1) e, nas operações que são aplicados, esses elementos se deslocam na imagem. As principais operações morfológicas são a erosão e a dilatação (GONZALEZ; WOODS, 2009; SOLOMON; BRECKON, 2010).

A operação de erosão visa remover componentes da imagem. Para isso, verifica-se se todos os elementos estruturantes estão contidos na região em primeiro plano (no caso, os objetos) (GONZALEZ; WOODS, 2009; SILVA, 2019). O processo é executado colocando sucessivamente o *pixel* central do elemento estruturador em cada um dos *pixels* dos objetos da imagem. Como resultado, um *pixel* em primeiro plano continuará sendo um *pixel* em primeiro plano se todos os *pixels* de valor 1 do elemento estruturador estiverem totalmente contidos no primeiro plano da imagem, mas caso não esteja, torna-se um *pixel* de fundo (SOLOMON; BRECKON, 2011). Um exemplo dessa operação pode ser visto na Figura 6.

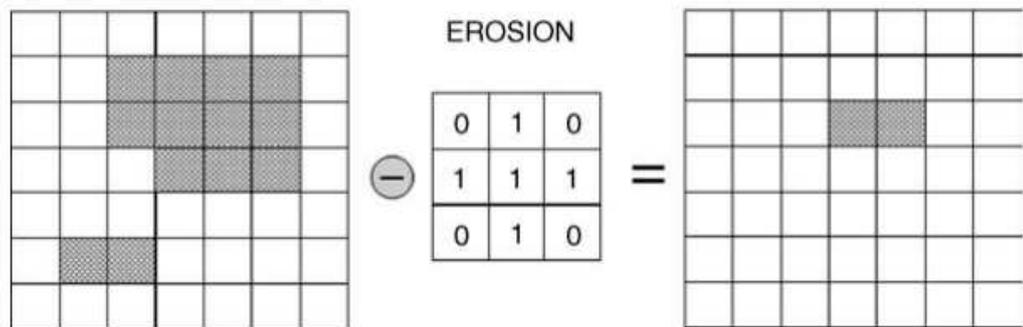


Figura 6- Exemplo da aplicação de uma operação de erosão onde um elemento estruturante de dimensão 3 x 3 é empregado sobre uma imagem binária (imagem retirada de SOLOMON; BRECKON, 2010).

Já a operação de dilatação visa aumentar ou engrossar os objetos contidos em uma imagem (GONZALEZ; WOODS, 2009). Para isso, coloca-se o pixel central do elemento estruturante em cada pixel de fundo. Como resultado, um *pixel* de fundo continuará sendo um *pixel* de fundo se todos os *pixels* de valor 1 do elemento estruturante estiverem totalmente contidos no fundo da imagem (SOLOMON; BRECKON, 2010). Um exemplo dessa operação pode ser visto na Figura 7.

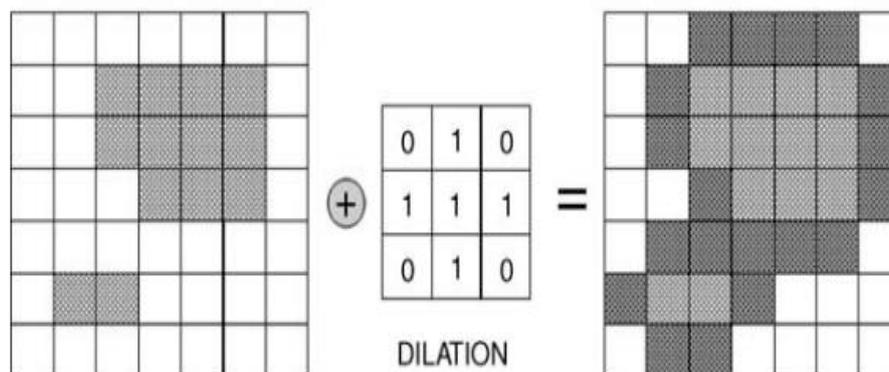


Figura 7- Exemplo da aplicação de uma operação de dilatação sobre uma imagem binária (imagem retirada de SOLOMON; BRECKON, 2010).

2.9- Análises nucleares de tumores através de técnicas computacionais

Nos últimos anos, observou-se um crescimento notório sobre abordagens computacionais e o estudo do núcleo celular através de análise de imagens digitalizadas e desenvolvimento de

algoritmos capazes de classificar uma lesão em classes específicas, como maligna ou benigna, diferentes graus de displasia, além de prever a possibilidade de transformação maligna de uma lesão e oferecer outras informações patológicas, como a possibilidade de recorrência ou mesmo subtipos celulares que indiquem uma maior ou menor agressividade (CARLETON et al., 2018; DEO, 2015; ERICKSON et al., 2017; SILVA, 2019).

Sobre isso, Heindl e outros (2018) ilustraram perfeitamente esse aspecto. Neste estudo, os autores combinaram técnicas de *machine learning*, patologia digital e estatística espacial para desenvolver uma nova maneira de investigar como os nichos microambientais modelam a morfologia nuclear de células de tumor de ovário. Apesar das mudanças na expressão de componentes do envelope nuclear, análise genômica e histologia fornecer dados sobre o tumor, informações sobre o microambiente tumoral e resposta tumoral não foram obtidos (HEINDL et al., 2018). Nesse sentido, descobriu-se que no microambiente tumoral há subpopulações de células com alterações nucleares implicadas na desregulação do reparo do DNA, perda da integridade nuclear, vantagem de escape da resposta imune e menor sobrevida, mostrando que tais subpopulações devem ser investigadas como possíveis alvos terapêuticos.

Ji e colaboradores (2019) ilustraram o poder das informações extraídas no núcleo celular através de técnicas computacionais para prever o prognóstico de doenças. Nele, os pesquisadores avaliaram as características nucleares, como forma, textura, orientação e arquitetura de 160 adenocarcinomas gástricos com o intuito de classificar os casos entre recorrentes e não recorrentes e sobrevida dos pacientes. O algoritmo alcançou uma média de 76% de precisão em prever recorrência, mostrando-se eficaz no auxílio na tomada de decisões bem como em reduzir a subjetividade do diagnóstico. Vale também ressaltar que os algoritmos computacionais conseguem encontrar características imperceptíveis aos olhos humanos, pois avaliar as características morfológicas de atipia celular é uma tarefa subjetiva e trabalhosa, mas que pode ser aprimorada se realizada por um computador (JI et al., 2019).

Wang e outros (2017), utilizando amostras digitalizadas de microarranjos corados com H&E, extraíram características como a arquitetura nuclear, textura e forma do tumor para identificar pacientes diagnosticados com câncer de pulmão de não pequenas células em estágio inicial, mas com alto risco de recorrência após ressecção cirúrgica. Os pesquisadores também utilizaram técnicas de *machine learning* para treinar, testar, segmentar, extrair informações e, finalmente, classificar as amostras em grupos de pacientes com ou sem risco de recorrência. Como resultado, o algoritmo criado foi capaz de prever recorrência com uma acurácia de 82% e 75% nos dois grupos usados como validação. Além disso, as características nucleares

extraídas continuaram preditivas mesmo nas análises multivariadas envolvendo parâmetros clinicopatológicos e diferentes subtipos histológicos (adenocarcinoma e CCE).

Kleppe e outros (2018) testaram uma abordagem mais ampla com vários subtipos de cânceres quanto à análise de padrões de texturas nucleares como possíveis marcadores de prognóstico, em especial sobre a organização da cromatina. Através do uso de entropia, dicotomizou-se a cromatina em homogênea e heterogênea e separou pacientes em alto e baixo risco em relação a seis tipos de tumores: 442 pacientes com câncer colorretal em estágio I ou II, 391 pacientes com câncer colorretal em estágio II, 246 pacientes com câncer de ovário, 354 pacientes com sarcoma uterino, 307 pacientes com câncer de próstata e 791 pacientes com carcinoma endometrial. Em todos os grupos estudados, os pacientes classificados como tendo cromatina heterogênea tiveram uma pior sobrevida em relação aos pacientes com cromatina homogênea, e a nucleotipagem se mostrou de valor prognóstico tanto nas análises univariadas quanto nas multivariadas, com exceção do grupo com câncer de próstata. Vale ressaltar que no grupo com câncer colorretal em estágio II, a nucleotipagem se mostrou mais eficaz que a estabilidade dos microssatélites em prever a sobrevida dos pacientes.

Nesse mesmo estudo, eles também compararam a efetividade do núcleo celular comparado ao uso de microssatélites que são frequentemente usados na prática clínica para identificar subgrupos de pacientes com câncer colorretal em estágio II que não precisam de tratamento adjuvante, uma vez que esses pacientes têm baixas chances de recorrência. Neste trabalho, cerca de 60% dos pacientes deste subgrupo tinham cromatina homogênea enquanto apenas 10-15% dos pacientes foram classificados como sendo de baixo risco. Portanto, um número substancialmente maior de pacientes foi identificado pela nucleotipagem como sendo de baixo risco, mostrando ser desnecessário o uso da quimioterapia.

Novos modelos de *machine learning* são constantemente desenvolvidos na área médica para diferentes tipos de cânceres, e não há dúvidas de que essas ferramentas serão largamente implementadas e farão parte da rotina clínica dos profissionais da saúde em um futuro breve, sendo uma alternativa mais precisa de diagnóstico e prognóstico clínico (HALAMA, 2019; SULTAN et al., 2020; KOMURA; ISHIKAWA, 2019). Nota-se, em diversos modelos computacionais desenvolvidos, que o núcleo celular é um dos principais alvos investigados, pois, como visto acima, ele possui importantes informações que permite inferir nas condições patológicas de um tecido.

2.10- Doenças bucais e abordagens computacionais

Como é possível perceber, o desenvolvimento de algoritmos nucleares na elucidação de processos patológicos envolvendo o câncer parece ser uma ferramenta de diagnóstico e prognóstico confiáveis, o que pode contribuir para melhorar a compreensão dos fenômenos morfológicos que ocorrem durante a tumorigênese. Sobre o CCE, tais ferramentas têm sido empregadas na tentativa de elucidar sua biologia bem como na compreensão de como as DBPMs evoluem para esse tumor.

Krishnan e outros (2010) investigaram a natureza patológica da fibrose submucosa oral através da análise morfológica do núcleo de células da camada basal com o uso de *machine learning* visando diferenciar tecidos normais de tecidos com fibrose submucosa oral com displasia. Como resultado, os núcleos celulares avaliados apresentaram diferenças de tamanho, forma e intensidade entre as duas condições. O classificador desenvolvido por eles conseguiu uma precisão diagnóstica de 99,04%, mostrando-se eficaz para as análises clínicas de maneira rápida, fácil e objetiva, levando a uma redução da subjetividade e auxiliando patologistas nas tomadas de decisões. Em 2012, Krishnan e colaboradores utilizaram técnicas de *machine learning* para estudar uma maneira de discriminar fibrose submucosa oral da mucosa oral normal investigando os núcleos de células da camada basal. O estudo comparou diferentes tipos de classificadores e verificaram que a máquina de vetores de suporte obteve a melhor acurácia (99,66%) em comparação com o classificador Bayesiano (96,56%) e o modelo de mistura de gaussiana (90,37%). Clinicamente, o algoritmo mostrou grande aplicabilidade, auxiliando em um diagnóstico menos subjetivo e mais rápido.

Baik e colaboradores (2014) mostraram o potencial do núcleo celular em fornecer importantes informações que predizem progressão para o CCE a partir das DBPMs. O trabalho utilizou o classificador *Random Forest* para treinar 29 amostras de tecido normal, cinco de carcinomas *in situ* e 28 CCEs quanto às características nucleares. A partir desse treinamento, calculou-se as alterações fenotípicas nucleares encontradas em cada núcleo através do cálculo realizado pelo classificador denominado pontuação nuclear fenotípica em uma escala variando entre 0 e 1, sendo 1 o grau máximo de alteração nuclear (neoplásico). Por fim, calculou-se a pontuação automatizada do fenótipo nuclear do tecido para cada amostra e a média da pontuação nuclear fenotípica (PNF) de todos os núcleos encontrados na amostra variando também de 0 a 1, sendo 0 núcleos normais e 1 núcleos anormais. O teste foi realizado em 71 biópsias com hiperplasia ou displasia leve e moderada, ou seja, grupos diagnosticados como

sendo de baixo risco histologicamente. Como resultado, ele obteve uma taxa de acerto de cerca de 80% em nível celular e 75% em nível histológico em prever a progressão das lesões.

Um estudo semelhante foi conduzido por Guillaud e outros (2008). Neste estudo, avaliou-se quanto o fenótipo quantitativo de tecidos poderia prever transformação maligna em lesões bucais de baixo risco histologicamente (hiperplasia ou displasia leve e moderada de DBPMs). Para isso, utilizou-se a PNF a fim de determinar as características nucleares presentes nas lesões que poderiam ser preditivas de transformação. A PNF foi utilizada a fim de gerar pontuações para cada célula selecionada, correlacionando-a com a classificação patológica e padrões moleculares e capacidade de predição. Na correlação entre PNF e diagnóstico histopatológico, observou-se um aumento expressivo na PNF no grupo de alto risco histológico em relação ao grupo de baixo risco, e uma diferença significativa entre carcinoma *in situ* e o CCE. Os pesquisadores também avaliaram se a PNF conseguiria distinguir as lesões de baixo e alto risco de transformação. Ao comparar a PNF entre as amostras que progrediram das que não progrediram, a PNF das amostras que sofreram transformação se mostrou mais alta. Quando correlacionaram a PNF com a perda de heterozigose, a PNF mostrou alto valor nas amostras que possuíam regiões cromossômicas consideradas essenciais, porém insuficientes na predição de progressão para câncer. Também foram analisadas covariáveis múltiplas considerando a histologia, perda de heterozigose e PNF como poder preditivo de transformação nas lesões com hiperplasia ou displasia leve e moderada. Os resultados claramente mostraram que a perda de heterozigose e a PNF foram significativas em prever transformação, enquanto a histologia não se mostrou preditiva, evidenciando que o núcleo celular pode ser um potencial marcador de progressão em doenças orais. Além disso, o trabalho mostrou que os pacientes com alto valor de PNF teve um aumento de 10 vezes no risco relativo de desenvolver um câncer dentro de cinco anos em comparação com indivíduos com baixo PNF.

Silva (2019) estudou uma maneira de segmentar os núcleos de tecidos epiteliais da cavidade bucal de ratos e, com isso, separar com precisão as amostras entre tecidos saudáveis juntamente com tecidos apresentando displasia leve, moderada e grave. Ele observou que o classificador obteve um valor de área sob a curva (do inglês: Area Under the Curve (AUC)) de 0,92 em diferenciar entre os tecidos saudáveis, tecidos apresentando displasia leve, moderada e grave, mostrando ser uma ferramenta altamente aplicável na rotina histopatológica de auxílio na tomada de decisões.

Dey e outros (2017) analisaram as características celulares e nucleares de células epiteliais orais de pacientes fumantes para instigar as chances de risco de evolução para uma

DBPM. Para isso, eles compararam as anomalias celulares encontradas nos pacientes fumantes e as compararam entre os pacientes não fumantes e os pacientes portadores DBPMs. O estudo detectou diferenças na morfologia e textura entre as células dos três grupos avaliados e utilizou um classificador que obteve uma acurácia de 85,71% em detectar as características pertencentes aos pacientes fumantes. Com base nessas características comparadas entre os três grupos, os indivíduos fumantes puderam ser identificados quanto a um maior ou menor risco de desenvolverem DBPMs.

Quanto às LBs, Liu e colaboradores (2015) desenvolveram um método estatístico de modelagem para estratificação de risco quantitativo de pacientes com LB usando um método de transformação de dados e *machine learning*. Nesse estudo, os pesquisadores geraram um índice quantitativo (índice de risco de CCE) através de dados coletados pela citologia esfoliativa para avaliar o risco de as lesões progredirem para o câncer, distinguindo as LBs com alto e baixo risco de transformação. O estudo coletou dados de citologia esfoliativa, histopatologia e clínicos de amostras de tecidos normais, LB e CCE, e separou as células em três populações: diploides, tetraploides e aneuploides e os dados foram então reconstruídos e usados para calcular o índice de risco de câncer bucal. O modelo estatístico desenvolvido para avaliar o índice de risco de câncer foi o risco através de uma escala que variou de 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1 maiores as chances de a lesão evoluir para o CCE. A maioria das amostras normais (com exceção de duas) teve um índice de risco de câncer menor que 0.5, enquanto a maioria das amostras classificadas como CCE (com exceção de duas) teve índice maior que 0.5. No seguimento clínico de pacientes com LB, um dos pacientes, cujo índice de risco de câncer foi de 0.88, foi diagnosticado com displasia leve, mas evoluiu para CCE.

Smitha, Sharada e Girish (2011) utilizaram técnicas computacionais para detectar variações nos núcleos e nas células de biópsias de mucosa bucal normal, LB e CCE. Os pesquisadores compararam as mudanças nos núcleos e células quanto ao tamanho, forma e razão entre núcleo e citoplasma. Como resultado, verificou-se que o tamanho das células e dos núcleos aumentou gradativamente entre a mucosa bucal normal, LB e CCE. Com isso, os autores sugeriram que o tamanho nuclear e celular é um parâmetro eficaz em separar os três tipos histopatológicos analisados, e que, dessa maneira, o aumento do tamanho celular e nuclear pode ser um importante indicador de transformação maligna.

Além das DBPMs, trabalhos envolvendo *machine learning* e núcleo também foram realizados diretamente nos casos envolvendo CCE a fim de elucidar a agressividade tumoral e respostas a tratamentos. Sobre isso, Lu e outros (2017) estudaram uma maneira de avaliar as

diferentes respostas ao tratamento pelo CCE da cavidade bucal. O estudo utilizou técnicas de *machine learning* para introduzir um novo conjunto de características histomorfológicas quantitativas denominadas de co-ocorrência local de morfologia, uma ferramenta que tenta capturar similaridade de forma, tamanho e textura nuclear dentro de diversos aglomerados celulares encontrados em diferentes amostras. Os resultados mostraram que as amostras com aglomerados mais heterogêneos (com maior variação celular) estavam associadas a um prognóstico ruim em relação às amostras com aglomerados mais homogêneos. O algoritmo se mostrou de prognóstico tanto nas análises univariadas e multivariadas. Como conclusão, este estudo revelou a importância de se investigar o ambiente intratumoral quanto à diversidade celular local em relação aos aspectos morfológicos nucleares, características talvez imperceptíveis aos olhos humanos.

Jabalee e colaboradores (2018) investigaram as características nucleares em casos de cânceres orofaríngeos relacionados ao HPV detectadas nos estágios iniciais da doença que poderiam distinguir pacientes com indicativo ou não de cirurgia robótica transoral sem a necessidade de quimioterapia. Para isso, os pesquisadores dividiram as amostras em três áreas de interesse: tumor, epitélio normal adjacente ao tumor e epitélio normal contralateral. Utilizando o classificador *Random Forest*, os núcleos das amostras de tumor e epitélio normal contralateral foram selecionados e treinados pelo classificador em questão. A partir disso, foi criada a Pontuação em Organização de DNA em Grande Escala, que avalia através do classificador o quão normal ou anormal (cancerígeno) é um núcleo em uma escala que variou de 0 (considerado totalmente normal) a 1 (considerado totalmente anormal). Como resultado, a média de distribuição da pontuação dos núcleos do epitélio normal contralateral foi próxima à zero, enquanto a pontuação dos núcleos dos tumores ficou próximo de 1. É importante ressaltar que se nas amostras de epitélio normal adjacente não tivessem alterações associadas à malignidade (alterações morfológicas nucleares sutis que ocorrem em células histologicamente normais devido à sua proximidade com um tumor), era de se esperar que a pontuação nuclear dada pelo classificador fosse igualmente próxima a zero. Contudo, o classificador mostrou uma pontuação fenotípica intermediária entre as células do tumor e do epitélio normal contralateral em quatro das 10 características mais importantes usadas na classificação, sugerindo que os tecidos próximos à área do tumor em cânceres orofaríngeos relacionados ao HPV podem apresentar alterações associadas à malignidade. Concluiu-se que esses núcleos podem ser detectados em biópsias por raspagem bucal em regiões aparentemente normais do epitélio, antes

do aparecimento do tumor, ajudando no diagnóstico precoce dessa doença e, conseqüentemente, na possibilidade de um tratamento mais efetivo e menos agressivo.

O uso de *machine learning* na patologia bucal é um campo recente, porém promissor, com a possibilidade de compreender e diagnosticar os processos patológicos da cavidade bucal de maneira mais efetiva e precisa (SULTAN et al., 2020). Espera-se que os trabalhos futuros nesse campo auxiliem na elaboração de modelos computacionais que auxiliem na adoção de um diagnóstico mais preciso e menos subjetivo das lesões orais, como melhorar a detecção dos diferentes graus de displasia ou os critérios de diagnóstico das LVPs (SULTAN et al., 2020).

Com isso, apesar dos constantes estudos tentando elucidar a natureza molecular das LBs e LVPs, a morfologia nuclear aliada à computação pode ser uma poderosa ferramenta para a compreensão da patogenia de tais lesões e, também, no diagnóstico diferencial entre elas, especialmente para as LVPs iniciais que mimetizam às LBs. Nesse sentido, até o presente momento, nenhum estudo usando essa abordagem foi realizado na tentativa de construir uma ferramenta capaz de diferenciar, com precisão, uma LB de uma LVP. Como um computador consegue encontrar recursos imperceptíveis aos olhos humanos, os trabalhos envolvendo *machine learning* têm alcançado resultados preditivos e diagnósticos com alta acurácia para vários tipos de lesões, trazendo um novo entendimento e novas possibilidades de investigação na área da patologia bucal. Portanto, um estudo sobre LB e LVP envolvendo morfologia nuclear e *machine learning* será a chance de testar uma abordagem promissora com resultados que podem ir além dos encontrados na literatura até o momento.

Visto, por exemplo, que o trabalho de Califano e outros (2000) mostrou a ocorrência de um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas durante desenvolvimento maligno na mucosa oral, e que isso, por sua vez, é refletido por uma série de alterações clínicas e histológicas, é possível que as alterações encontradas no núcleo celular das LBs e LVPs por um computador possa informar diferentes estágios, condições de progressão e diagnóstico diferencial entre elas. Caso existam diferenças nucleares detectadas entre as LBs e LVPs, essas diferenças podem carregar importantes informações preditivas de transformação para ambas as lesões inclusive, embora isso não será uma questão a ser respondida com esse trabalho. Além disso, pelo fato de a LB ser a DBPM mais comum da cavidade bucal, o impacto que um modelo preditivo que ajude diferenciá-la de uma LVP será de grande importância, pois cada lesão apresenta uma abordagem terapêutica específica e riscos distintos de transformação maligna.

Um outro fator importante desse estudo é diagnóstico mais exato de uma LVP, pois na literatura os critérios de diagnóstico são clinicopatológicos, mas dotados de muita subjetividade e com critérios morfológicos muitas vezes difíceis de serem aplicados dada a natureza evolutiva da lesão clinicamente (MUNDE; KARLE, 2016). Como consequência, uma LVP em estágio inicial pode ser confundida com uma LB histologicamente e sem qualquer alteração histológica indicativa de progressão, fazendo com que essa lesão seja frequentemente diagnosticada apenas no estágio avançado, quando os aspectos clinicopatológicos são mais exuberantes. Dessa maneira, se as LVPs possuem características nucleares próprias, estas podem ser detectadas pelo algoritmo computacional e usadas como critério de diagnóstico. Além disso, se as características nucleares das LVPs puderem ser detectadas nos estágios iniciais da lesão, será possível realizar um diagnóstico mais precoce, resultando em um melhor prognóstico clínico.

Portanto, tal estudo, que numa primeira abordagem versará sobre as alterações nucleares e classificação entre LB e LVP para fins de diagnóstico, poderá, no futuro, ser empregado para o estudo dessas lesões visando a predição de transformação delas, especialmente quando nos seus estágios iniciais. Por fim, o ineditismo desse trabalho é o fato de tentar detectar alterações nucleares e de classificação através da ferramenta de *machine learning*, um novo paradigma para o estudo de doenças.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Desenvolver um protocolo de *machine learning* que possa viabilizar a identificação das características nucleares diferenciais entre LBs e LVPs bem como na distinção entre essas duas condições por meio das diferenças nucleares encontradas entre elas.

3.2- Objetivos específicos

- Por meio do aprendizado supervisionado, treinar e utilizar uma rede neural capaz de identificar os núcleos celulares e extrair as características nucleares das LBs e LVPs;
- Treinar e testar um classificador que possa diagnosticar diferencialmente LB de uma LVP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Federal de Uberlândia (CAAE: 60858016.1.0000.5152), segundo o parecer de número 2.001.481 (ANEXO A).

4.1- Amostra de casos e conjunto de dados de imagens

Sessenta e um casos de LB, três casos de LVP e cinco casos de CCE (todos estes casos estavam ligados à transformação maligna ou de LB ou de LVP) foram levantados do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia no período de 2000 a 2019 para serem usados no estudo nas fases de treinamento da rede neural, segmentação e extração de características. Inicialmente, as lâminas coradas em hematoxilina e eosina utilizadas na rotina clínica foram recuperadas de seus respectivos casos e reavaliadas para a confirmação do diagnóstico de cada uma das lesões. No caso das LBs e LVPs, os graus de displasia também foram checados. Para essa etapa de confirmação de diagnóstico, utilizou-se os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde de 2017. O fato de utilizar as lâminas de rotina coradas por hematoxilina e eosina remete a busca neste trabalho da rede neural em aprender a partir das condições de trabalho encontradas nos laboratórios de patologia bucal, garantindo uma melhor aplicabilidade desta ferramenta. Os dados clinicopatológicos (cor da lesão, localização, tipo de lesão, displasia, transformação maligna e tamanho) e sócio-demográficos (sexo, idade e tabagismo) dos pacientes foram obtidos a partir dos pedidos de exame presentes do laboratório de patologia. Como critério mínimo de inclusão, empregou-se apenas casos de LBs, LVPs e CCEs que continham lâminas coradas e bem preservadas e com seus respectivos diagnósticos. Do contrário, os casos foram excluídos do estudo.

4.2- Análise Computacional

Para que fosse possível estudar os núcleos, as lâminas selecionadas de cada caso foram fotografadas com o uso do microscópio óptico Leica DM500. Em média, obteve-se 10

campos/lesão no aumento de 400x, e todas as imagens foram salvas no formato JPEG e TIFF com resolução de 1600 x 1200. A partir da captura desses campos, extraiu-se as regiões de interesse (do inglês *Region of Interest* (ROIs)) de cada campo para fins de estudo nuclear, sendo cada ROI compreendendo uma região de tamanho 450 x 250 extraída em cada campo. Em seguida, empregou-se as etapas sequencialmente: segmentação, pós-processamento, extração de características e classificação, as quais estão discriminadas abaixo. Todas as etapas pós-extração das ROIs foi realizada em um computador com as seguintes configurações: processador AMD FX-8320, 8GB de memória RAM e GPU Nvidia GTX 1060 com 6GB de VRAM. Na fase de segmentação manual para o treinamento da rede, utilizou-se um Monitor Wacom – Cintiq para contornar os núcleos, o software GIMP foi utilizado tanto nesta etapa quanto para a obtenção das ROIs, sendo obtido através do site <https://www.gimp.org/>. Todos os softwares utilizados neste trabalho estão disponíveis de forma gratuita.

4.3- Segmentação

A primeira etapa da segmentação é a fase de treinamento em que se realiza manualmente a segmentação dos núcleos a partir das ROIs extraídas dos campos obtidos de cada lesão, como explicado acima. Para essa etapa, utilizou-se um total de 481 ROIs, distribuídas da seguinte forma: 74 ROIs de LB sem displasia, 77 ROIs de LB com displasia leve, 114 ROIs de LB com displasia moderada, 43 ROIs de LB com displasia grave, 59 ROIs de LVP e 114 ROIs de CCE. Um total de 15.027 núcleos foram segmentados manualmente e usados no treinamento da rede.

Para o treinamento, utilizou-se a rede neural *Mask R-CNN* juntamente com a rede convolucional *ResNet50* a fim de detectar os núcleos celulares nas imagens. A rede convolucional *ResNet50* foi utilizada primeiramente na etapa de aprendizado das características dos núcleos celulares. A arquitetura dessa rede é mostrada na Figura 8. O modelo da rede é composto por 50 camadas convolucionais distribuídas sobre a camada de entrada (E), quatro blocos de camadas convolucionais denominados Bloco 1 (B1), Bloco 2 (B2), Bloco 3 (B3) e Bloco 4 (B4), e uma etapa de saída. Resumidamente, a camada E possui 64 filtros convolucionais de tamanho 7×7 pixels que realizam o processamento da imagem original através de uma janela deslizante com tamanho de descolamento de 2 pixels. Em seguida, ainda na camada E, um filtro de *max-pooling*, de tamanho 2×2 pixels, é empregado, o qual também possui tamanho de deslocamento igual a 2 pixels.

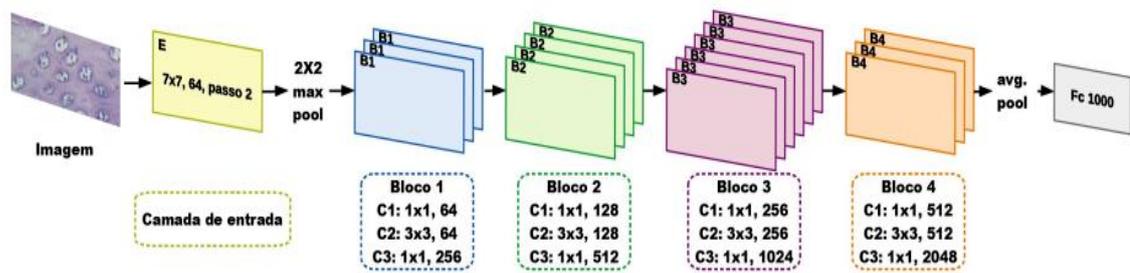


Figura 8- Arquitetura da rede neural *ResNet50* usada no processo de segmentação para a aprendizagem dos núcleos celulares (imagem retirada de SILVA, 2019).

Esse resultado é então aplicado à camada C1 do B1, que possui 64 filtros convolucionais de tamanho 1×1 *pixel*, seguido pela C2, que possui 64 filtros de tamanho 3×3 *pixels*, e C3, que contém 256 filtros de tamanho 1×1 *pixel*. O B1 é repetido três vezes sobre a imagem processada na camada E, totalizando 9 camadas convolucionais nesse bloco. O resultado de B1 é aplicado em B2, passando primeiramente pela camada C1, com 128 filtros de tamanho 1×1 *pixel*, seguido pela C2, com 128 filtros de tamanho 3×3 *pixels*, e C3, com 512 filtros de tamanho 1×1 *pixel*. Esse bloco possui quatro repetições, resultando em 12 camadas convolucionais. O resultado de B2 é então empregado em B3, que possui 256 filtros de tamanho 1×1 *pixel* em C1, 256 filtros de tamanho 3×3 *pixels* em C2, e 1.024 filtros de tamanho 1×1 *pixel* em C3. Esse bloco possui seis repetições, totalizando 18 camadas. O resultado de B3 é empregado em B4, que também possui três camadas: a C1, que possui 512 filtros de tamanho 1×1 *pixel*, C2, com 512 filtros de tamanho 3×3 *pixels*, e C3, com 2048 filtros de tamanho 1×1 *pixel*. O bloco B4 se repete três vezes, apresentando nove camadas no total. Por fim, os dados gerados são transformados em um vetor por um filtro de *average-pooling* enquanto a função *softmax* é utilizada para classificar os objetos entre núcleo ou região de fundo. Para essa etapa, emprega-se uma camada totalmente conectada com 1000 neurônios. Entre cada bloco de camadas convolucionais (B1, B2, B3 e B4), a matriz de características é reduzida de tamanho numa proporcionalidade de 2. Para isso, uma janela deslizante com tamanho de deslocamento de 2 *pixels* é empregada nas convoluções de transição entre cada bloco. Para o modelo de rede empregado neste trabalho, a função de ativação adotada foi a Unidade Linear Retificada (ReLU) (HE et al., 2017; BAYRAMOGLU; HEIKKILÄ, 2016).

Como explicado por He e outros (2017), a *Mask R-CNN* é uma rede neural convolucional que detecta e separa objetos candidatos em classes distintas a partir de regiões. Ela basicamente

consiste em dois estágios: o primeiro estágio é denominado *Region Proposal Network* (RPN) e tem como objetivo gerar conjuntos de objetos candidatos em caixas delimitadoras (o menor quadrado que compreende um objeto); o segundo estágio visa classificar os objetos contidos nas caixas delimitadoras e realizar a regressão dessas caixas. Em paralelo ao segundo estágio, a rede também possui uma ramificação que prevê uma máscara binária para cada ROI (HE et al., 2017).

Essa rede detecta e segmenta núcleos através das características nucleares extraídas pela *ResNet50*. Para isso, a *Mask R-CNN* utiliza os mapas de características gerados pela *ResNet50* e os empilha do maior mapa (mais detalhado) ao menor (menos detalhado) formando uma *Feature Pyramid Network* (FPN), como mostrado na Figura 9. Como a *ResNet50* possui muitas camadas geradoras de mapas, a utilização de todas elas pode gerar uma pirâmide grande de alta complexidade de execução. Para contornar esse problema, utiliza-se apenas a última camada de cada bloco, ou seja, a C3 do último B1, a C3 do último B2, a C3 do último B3 e a C3 do último B4. Em seguida, passam-se as camadas da FPN como *input* para a *Region Proposal Network* (RPN) para identificar os núcleos no sentido *top-down*, ou seja, da menor camada à maior como mostrado na Figura 9. Com isso, tem-se a classificação das regiões entre núcleo e região de fundo juntamente com as caixas delimitadoras na primeira camada de cima (menores e menos detalhadas). Esses resultados, então, são combinados com as camadas abaixo, as quais são maiores e possuem características nucleares mais detalhadas. À medida que esses resultados são passados por essas camadas maiores e mais detalhadas, as regiões identificadas ficam cada vez mais precisas e corretas, ao mesmo tempo em que há a regressão das caixas delimitadoras. Por fim, a *Mask R-CNN* através de uma rede convolucional utilizada em conjunto com mapas de características, produz uma máscara binária para cada núcleo identificado.

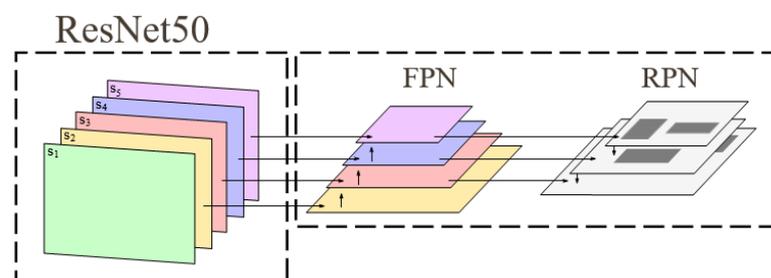


Figura 9- A *Mask R-CNN* utiliza dos mapas de características gerados pela *ResNet50* para formar a FPN, onde a RPN irá identificar os núcleos no sentido *top-down* (imagem adaptada de JADER et al., 2018).

Durante a fase de treinamento da rede, é calculada uma taxa de perda multitarefa para cada região. Essa taxa calcula o percentual de erro do treinamento, ou seja, o quanto o treinamento está diferente do padrão-ouro (as ROIs segmentadas manualmente pelo especialista). Basicamente, ela soma a taxa de perda (erro) da classificação, da regressão das caixas e das máscaras, sendo sua função definida por:

$$L = L_{cls} + L_{box} + L_{mask}.$$

Para o modelo de rede aplicado neste trabalho, utilizou-se 60 ROIs para o treinamento da rede, sendo 48 delas para treinar e 12 para testar, com 40 *epochs* realizados no total. Outras 416 ROIs foram usadas para validar o modelo. A disposição das ROIs segmentadas manualmente no processo de aprendizado da rede pode ser observada na Figura 10. Do total de ROIs usadas, cinco delas foram descartadas durante o processo pois estavam apresentando erros que impediam o funcionamento do programa.

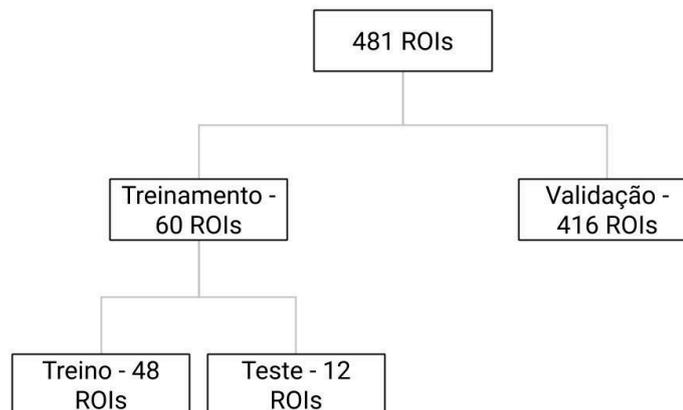


Figura 10- Diagrama mostrando a divisão das ROIs no processo de aprendizagem da rede neural.

4.4- Pós-processamento

Após a rede classificar os objetos entre núcleos e região de fundo, algumas regiões podem ficar incompletamente preenchidas ou mesmo apresentar ruídos ou artefatos que podem prejudicar o processo de segmentação. Para evitar que isso ocorra, a etapa de pós-processamento é realizada através de operações morfológicas para eliminar regiões falso-positivas bem como refinar os núcleos segmentados. Primeiramente, eliminaram-se as regiões que apresentavam falso-negativos. Para isso, empregou-se a operação morfológica de dilatação a fim de preencher os contornos dos núcleos. Aqui, o objetivo foi aumentar os objetos em uma

imagem binária preenchendo os espaços considerados nulos para intensificar as linhas e os contornos de bordas. Um elemento estruturante de tamanho 3×3 pixels foi escolhido empiricamente para realizar o processo. Na Figura 11, é possível observar um exemplo dessa operação, onde o elemento estruturante em forma de cruz foi aplicado em uma imagem contendo núcleos. Em seguida, utilizou-se a função de preenchimento das regiões de contorno fechadas que não foram totalmente preenchidas formando buracos. Essa função visa atribuir o mesmo valor de intensidade a todos os pixels das regiões que possuem contorno fechadas, conforme demonstrado na Figura 12.

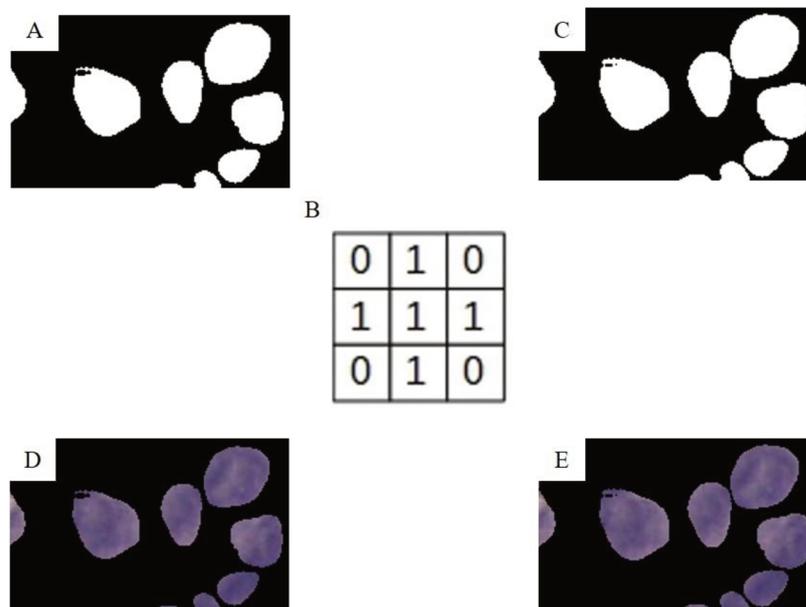


Figura 11- Operação de dilatação: A: máscara de núcleos com ruídos. B: elemento estruturante em forma de cruz de tamanho 3×3 . C: máscara resultante da operação. D: aplicação da máscara em A. E: aplicação da máscara após resultado da operação em C.

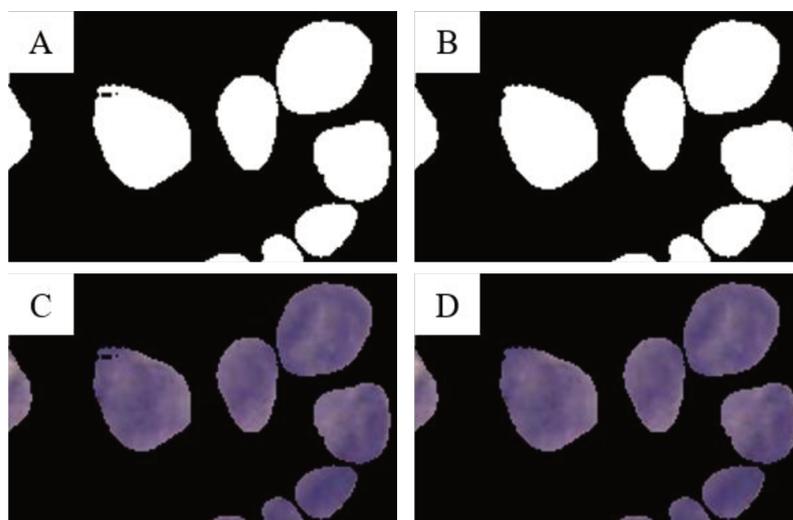


Figura 12- Função de preenchimento de regiões: A: imagem após o processo de dilatação. B: aplicação da função de preenchimento. C: imagem resultante do processo de dilatação. D: imagem resultante da função de preenchimento é mostrada em D, onde os buracos são preenchidos.

Durante o pós-processamento, utilizou-se também um filtro de erosão de tamanho 3×3 em forma de cruz. Esse filtro foi usado para eliminar os ruídos nas imagens e para voltar os núcleos aos seus tamanhos originais, como exemplificado na Figura 13.

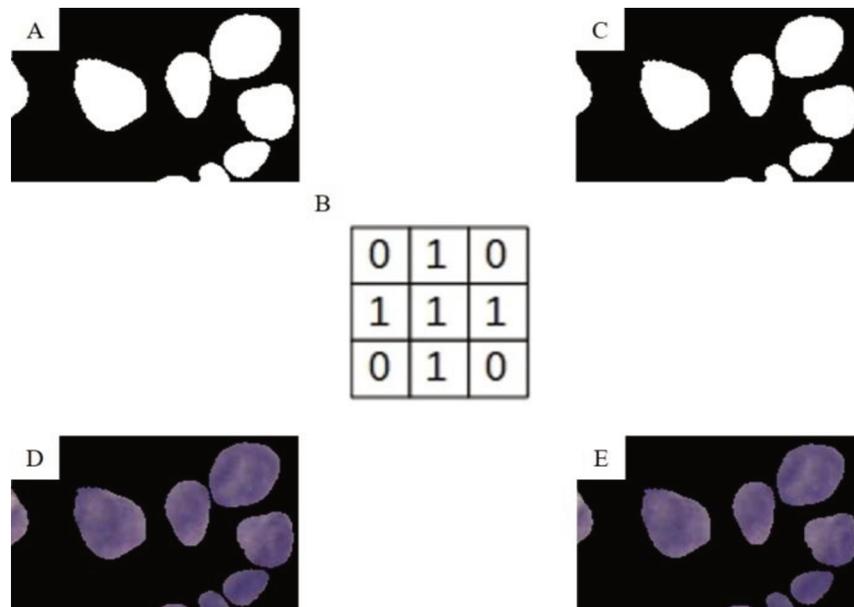


Figura 13- Operação de erosão: A: máscara após a operação de dilatação e preenchimento de buracos. B: elemento estruturante de tamanho 3×3 em forma de cruz. C: máscara resultante após a erosão. D: resultado da máscara em A, E: resultado da máscara em C.

Na etapa final do pós-processamento, todos os objetos presentes com área menor que 30 *pixels* foram considerados como região de fundo. Na imagem 14 é possível observar essa operação.

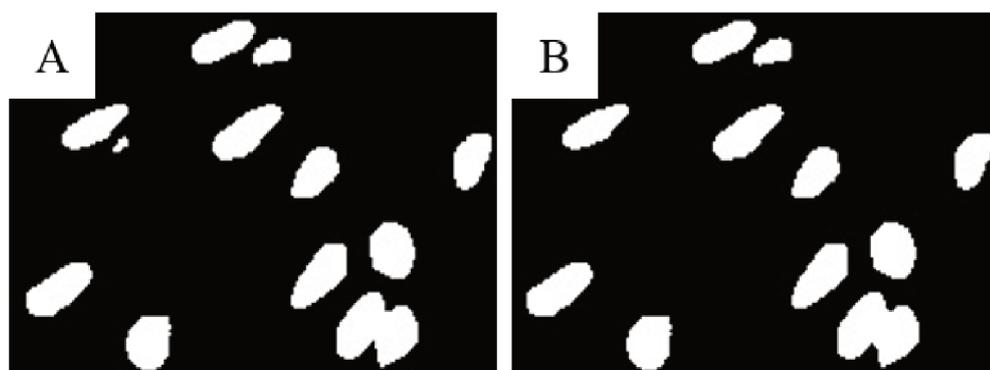


Figura 14- Etapa final: pequenos artefatos (menores que 30 *pixels*) vistos em A foram considerados como região de fundo. O resultado dessa operação é visto em B.

Após o processo de identificação dos núcleos celulares, passou-se a classificar os tecidos a partir da extração de características morfológicas dos objetos classificados como núcleo. As características morfológicas estudadas foram Área (A), Excentricidade (E), Perímetro (P_E), Orientação (O_R), Solidez (S), Entropia (E_N) e Índice Moran (I_M). Essas características selecionadas são baseadas no trabalho de Silva (2019) que por sua vez se baseou nos estudos de Ruusuvoori e outros (2016); Dey e outros (2017); Hameed, Banumathi e Ulaganathan, (2017); Gongas, Moreno e Bravo, (2018).

A área é calculada pelo valor total do número de pixels de um objeto; a excentricidade diz respeito à diferença da circunferência de um objeto em relação a um círculo, ou seja, o cálculo do alongamento dos objetos; a orientação calcula a relação entre o maior eixo de um objeto sobre o eixo x; a solidez analisa a deformidade de um objeto, no caso deste trabalho, o nível de irregularidade do formato circular pela quantidade de invaginações presentes.

A medida de entropia analisa os níveis de intensidade de uma região e calcula a variação de intensidade presente na textura de uma vizinhança de *pixels*. Neste estudo, utilizou-se 7 tamanhos de vizinhança para extrair as medidas de entropia, como segue: 3×3 , 5×5 , 7×7 , 9×9 , 11×11 , 13×13 e 15×15 pixels com base no trabalho de Kleppe e colaboradores (2018). O Índice Moran mede a autocorrelação espacial calculando a média de intensidade dos *pixels* da vizinhança e os comparando com o *pixel* central.

Essas 13 características foram extraídas para cada núcleo n presente em todas as ROIs. Dessa forma, cada ROI possui uma matriz de tamanho $13 \times n$ e, dessas matrizes, extraiu-se a média (μ) e desvio padrão (σ) para cada característica presente na ROI, gerando dois vetores (um para média e outro para desvio padrão), cada um possuindo os descritores dessas características: $M_K = [m_1, m_2 \dots m_{13}]$ e $D_K = [d_1, d_2 \dots d_{13}]$. Ou seja, em M_K tem-se um vetor com a média de todas as 13 características extraídas de uma determinada imagem, enquanto em D_K tem-se um vetor com todo o desvio padrão de cada característica encontrada na imagem em questão. Finalmente, esses vetores foram concatenados (juntados), formando um único vetor que foi empregado na classificação de cada ROI.

4.6- Classificação

Após o processo de extração de características em que a μ e σ das características nucleares extraídas foram transformados em um único vetor para cada ROI, realizou-se a classificação

utilizando esses vetores. O objetivo foi separar as imagens nas duas diferentes classes de lesões (LB e LVP) através do classificador polinomial (POL) (NASCIMENTO et al., 2013). Esse classificador emprega a expansão polinomial sobre o vetor de características extraído para então definir os coeficientes que serão empregados na separação das classes. Para que isso ocorra, emprega-se a seguinte função polinomial discriminante:

$$g(x) = a^T p_n(x)$$

4.7- Métricas de avaliação e estatística

Para avaliar a eficácia do método adotado, realizou-se a comparação pela estimativa sobreposição entre as imagens segmentadas e o padrão-ouro. Com isso, obtém-se as medidas de verdadeiro-positivos, falso-positivos, verdadeiro-negativos e falso-negativos, os quais foram empregadas no contexto da segmentação e da classificação.

Na segmentação, os verdadeiro-positivos referem-se aos *pixels* corretamente classificados como objeto; os falso-positivos referem-se aos *pixels* erroneamente classificados como objetos; já os verdadeiro-negativos correspondem aos *pixels* corretamente classificados como região de fundo; por fim, os falso-negativos são os *pixels* incorretamente marcados como região de fundo (BARATLOO et al., 2015). Por essas medidas, extraiu-se as seguintes métricas para avaliar o desempenho do processo de segmentação: Sensibilidade (S_E), Especificidade (E_S), Acurácia (A_C), Taxa de Correspondência (T_C) e Coeficiente Dice (D_C) (BARATLOO et al., 2015; TRAN, 2016; MA et al., 2018; SILVA, 2019). A S_E avalia a quantidade de *pixels* que foram corretamente identificados como objeto de interesse. A E_S determina a quantidade de objetos que foram corretamente classificados como região de fundo. Enquanto a A_C determina a taxa de *pixels* que foram corretamente classificados em toda a imagem. Já a T_C verifica o quão distante o resultado obtido pelo classificador está do padrão-ouro pela relação entre as duas amostras. Enquanto D_C mede a similaridade entre o resultado obtido e o padrão-ouro. Já na classificação, a S_E diz respeito às ROIs corretamente classificadas como LB, a E_S são as ROIs corretamente classificadas como LVP, enquanto a A_C mede o desempenho do classificador pelo resultado da sensibilidade e especificidade. Finalmente, utiliza-se a AUC ROC (Característica de Operação do Receptor, do inglês: *Receiver Operating Characteristic*) para avaliar o desempenho do classificador em distinguir as classes de tecidos (METZ, 1978; CHEN et al.,

2016; HUYNH; LI; GIGER, 2016). Basicamente, a curva ROC obtém pelo gráfico traçado pela sensibilidade *versus* a taxa de falso-positivos (TFP), definida por:

$$TFP = 1 - S_E$$

Para fins de comparação entre as características morfológicas dos núcleos entre LBs e LVPs, independente do grau de displasia, empregou-se os testes estatísticos *Mann-Whitney* ou *t-test* não pareado de acordo com a distribuição dos dados, como determinado pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Considerou-se estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1- Dados clinicopatológicos

A Tabela 1 mostra as principais características clinicopatológicas dos pacientes empregados neste estudo. Em resumo, a maioria dos pacientes com LB era do sexo masculino enquanto todos os casos de LVP eram do sexo feminino. A idade média dos pacientes foi de 55 anos, sendo 54 nas LBs e 72 nas LVPs. A maioria dos pacientes com LB era fumantes enquanto apenas um paciente com LVP havia a informação de tabagismo. As principais localizações de ambas as lesões foram mucosa jugal, língua, rebordo alveolar e lábio. Tanto LB quanto LVP, a alteração displásica mais frequentemente encontrada foi displasia leve. Dois casos LB e um de LVP sofreram transformação maligna. Sobre as características clínicas de ambas as lesões, a maioria apresentava cor branca e com tamanho médio de 1,5 cm.

Tabela 1- Distribuição dos dados clinicopatológicos de pacientes com LB (n=61) e LVP (n=3) empregados no estudo.

Variáveis	Classificação	LB	LVP
Sexo	Masculino	41 (67,21%)	0 (0%)
	Feminino	20 (32,79%)	3 (100%)
	Não informado	0 (0%)	0 (0%)
Idade	≥ 55	23 (37,70%)	3 (100%)
	< 55	23 (37,70%)	0 (0%)
	Não informado	15 (24,59%)	0 (0%)
Tabagismo	Sim	34 (55,74%)	1 (33,33%)
	Não	1 (1,64%)	0 (0%)
	Não informado	26 (42,62%)	2 (66,66%)
Localização	Mucosa jugal	15 (22,39%)	2 (15,38%)

Localização	Língua	12 (17,91%)	2 (15,38%)
	Rebordo alveolar	4 (5,97%)	1 (7,69%)
	Lábio	4 (5,97%)	1 (7,69%)
	Gengiva	3 (4,48%)	0 (0%)
	Palato mole	3 (4,48%)	1 (7,69%)
	Outras regiões	17 (25,37%)	4 (30,77%)
	Não informada	9 (13,43%)	2 (15,38%)
Displasia	Sem displasia	8 (12,70%)	0 (0%)
	Displasia leve	35 (55,56%)	2 (40%)
	Displasia moderada	18 (28,57%)	1 (20%)
	Displasia grave	2 (3,17%)	1 (20%)
	Não informada	0 (0%)	1 (20%)
Transformação	Casos de transformação	2 (3,28%)	1 (33,33%)
Cor	Branca/esbranquiçada	46 (73,02%)	4 (80%)
	Branca e vermelha	7 (11,11%)	0 (0%)
	Branca e amarela	1 (1,59%)	0 (0%)
	Semelhante à mucosa	1 (1,59%)	1 (20%)
	Não informada	8 (12,17%)	0 (0%)
Tamanho da lesão	≥ 1,5 cm	21 (33,33%)	5 (83,33%)
	< 1,5 cm	32 (50,79%)	1 (16,67%)
	Não informado	10 (15,87%)	0 (0%)

5.2- Segmentação Nuclear e Rede Neural

Para análise de segmentação nuclear das lesões, obteve-se fotomicroscopias das lesões de LB, LVP e CCE, conforme descrito na metodologia. Do total, 568 imagens de LB, 45 imagens de LVP e 58 imagens de CCE foram tiradas. A partir dessas imagens, capturou-se os seguintes números de ROIs de cada imagem, como segue: 1.217 ROIs de LB, 119 ROIs de LVP e 133 ROIs de CCE (Tabela 2). Nessa etapa, utilizou-se amostras de CCE para aumentar o número de núcleos a serem usados para fins de treinamento da rede neural e aumentar a sua acurácia no processo de segmentação nuclear.

Tabela 2- Quantidade de imagens e ROIs obtidas em todo o *dataset* levantado para cada lesão empregada nessa etapa.

Lesão	Quantidade de imagens	Quantidade de ROIs
LB	568	1.217
LVP	45	119
CCE	58	133

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a obtenção das ROIs, realizou-se a segmentação manual dos núcleos celulares pertencentes às 481 ROIs selecionadas para a aprendizagem do algoritmo, o que representou uma fase de treinamento supervisionado. Após isso, deu-se o treinamento da rede *Mask R-CNN*, onde a rede foi alimentada com as informações sobre os núcleos no treino e a segmentação dos núcleos pela rede foi realizada nas ROIs separadas para teste. Para avaliar o desempenho da *Mask R-CNN* em identificar e separar os núcleos das regiões de fundo, tanto no teste quanto na validação, as ROIs segmentadas por ela foram comparadas com o padrão-ouro.

Após o treinamento, a *Mask R-CNN* foi utilizada para segmentar das ROIs extraídas no *dataset*, os resultados do processo de segmentação pela *Mask R-CNN* podem ser vistos nas Figuras 15, 16, 17 e 18. A Figura 15 mostra a segmentação de uma imagem com os núcleos sendo identificação pela rede neural. Após o treinamento, constatou-se que a rede obteve bom êxito em separar os núcleos das regiões de fundo da imagem original (Figura 15A). Contudo, observou-se que a rede neural detectou regiões perinucleares como sendo pertencentes às regiões nucleares e que não foram identificadas no padrão-ouro (segmentação manual) e,

portanto, foram chamadas de regiões nucleares falso-positivas (Figura 15C, seta vermelha). Isso pode ocorrer devido à similaridade de coloração nas regiões próximas aos limites nucleares. Ainda na Figura 15C, percebe-se que a rede neural não identificou algumas regiões nucleares, como observado no padrão-ouro, indicando um resultado falso-negativo (seta verde). Além disso, algumas imagens segmentadas apresentaram ruídos que foram erroneamente classificados como núcleos, as quais foram considerados como falso-positivos (Figura 16A, seta vermelha). Para corrigir essas e outras irregularidades, realizou-se a etapa de pós-processamento.

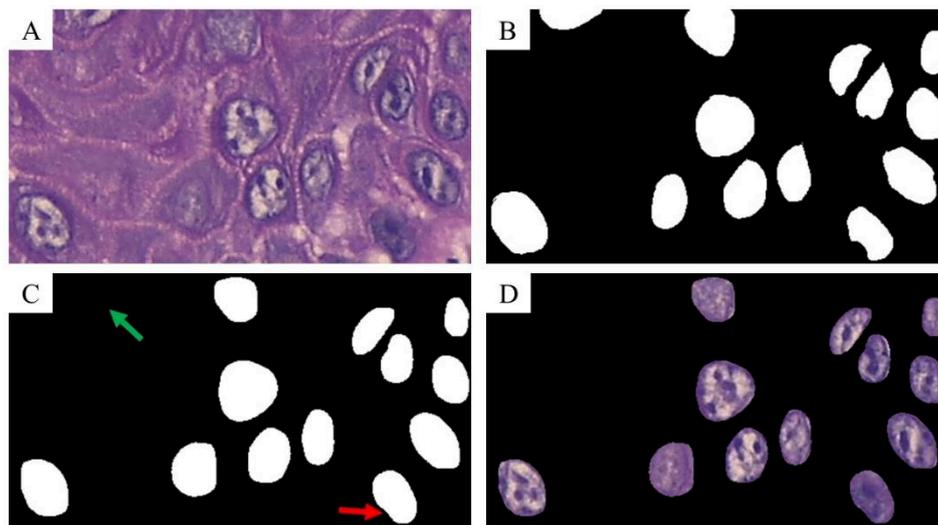


Figura 15- Segmentação de uma imagem de LB pelo padrão-ouro e pela rede neural. A: imagem original. B: máscara resultante do padrão-ouro. C: máscara resultante da rede neural *Mask R-CNN* apresentando regiões falso-positivas (seta vermelha) e falso-negativas (seta verde); D: segmentação resultante de C.

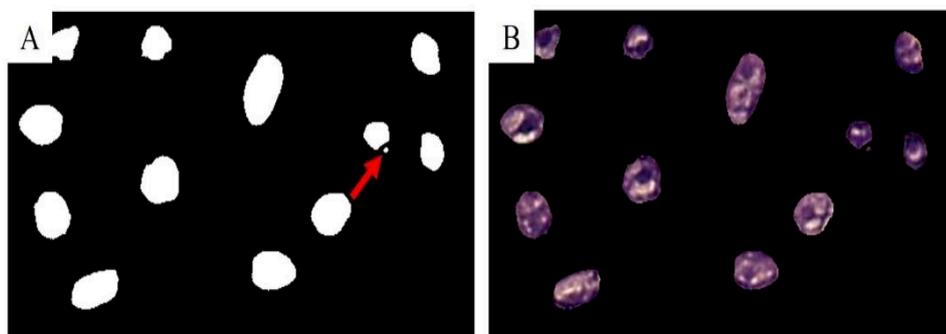


Figura 16- Imagem de CCE apresentando um pequeno ruído que foi classificado como falso-positivo (seta vermelha). A: máscara resultante da *Mask R-CNN*. B: segmentação resultante de A.

5.2.1- Pós-processamento

Após a segmentação pela rede neural, realizou-se o pós-processamento a fim de corrigir algumas irregularidades da segmentação. O resultado pode ser observado na Figura 17. Nessa etapa foram realizadas as operações de dilatação (Figura 17C), preenchimento de buracos (Figura 17D) e erosão (Figura 17E) em uma imagem. Na Figura 17B, a região apontada pela seta verde indica a presença de um buraco no interior do núcleo, onde, após a aplicação da operação de dilatação, o buraco é reduzido de tamanho e, posteriormente, eliminado pela operação de preenchimento de buracos. Ao final, aplicou-se a operação de erosão para que os núcleos voltassem aos seus respectivos tamanhos originais.

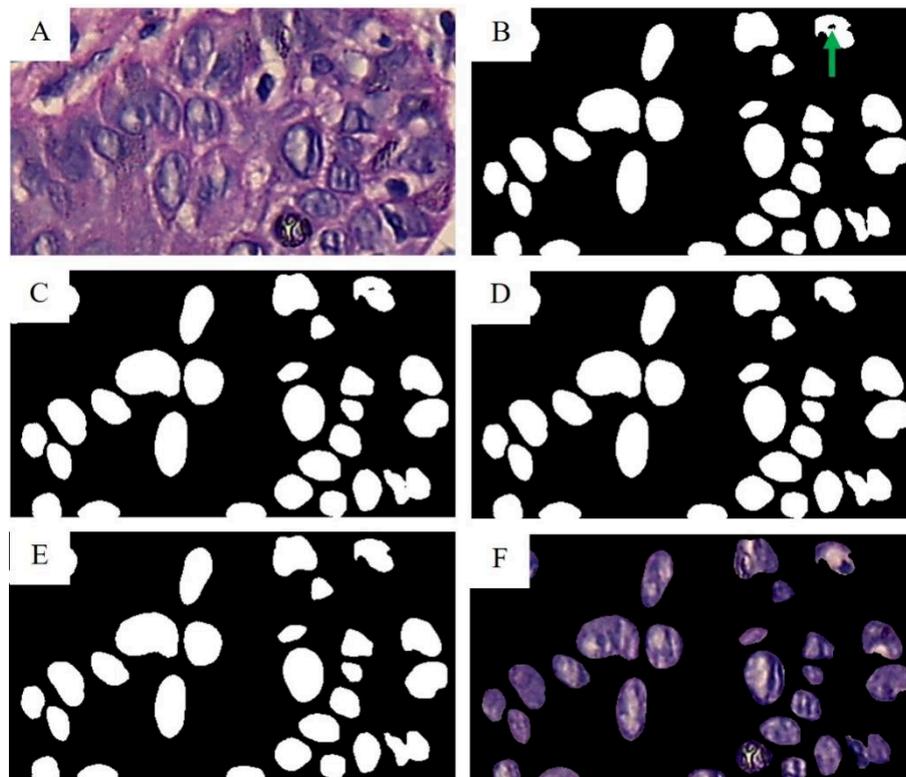


Figura 17- Etapa de pós-processamento em uma imagem de CCE: A: imagem original. B: máscara após a segmentação. C: máscara após a operação de dilatação. D: máscara após a aplicação da operação de preenchimento de buracos. E: máscara após a operação de erosão. F: segmentação resultante.

Realizou-se também a operação de eliminação de pequenos artefatos ou ruídos classificados como falso-positivos. Na Figura 18, observa-se o resultado da operação que visa eliminar objetos segmentados menores que 30 *pixels* em uma imagem, como identificado pela seta vermelha na Figura 18A.

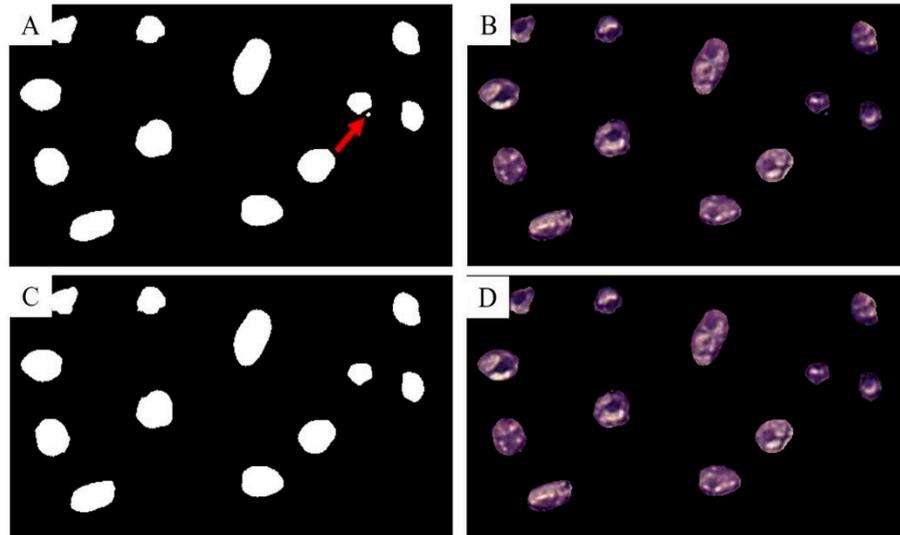


Figura 18- Operação de eliminação de pequenos artefatos em uma imagem de CCE. A: máscara resultante da rede neural. B: segmentação resultante de A. C: máscara resultante do processo de eliminação de objetos menores que 30 pixels. D: segmentação resultante de C.

A segmentação realizada pela rede neural obteve uma performance satisfatória em identificar os núcleos e as regiões de fundo nas imagens histológicas, apresentando uma acurácia média de 92,95%. Na Tabela 3 mostra as médias e os desvios padrão de Sensibilidade (S_E), Especificidade (E_S), Acurácia (A_C), Taxa de Correspondência (T_C) e Coeficiente Dice (D_C) alcançadas pela rede *Mask R-CNN* em segmentar os diferentes tecidos histopatológicos avaliados neste estudo. Como se observa, os valores para cada um dos índices investigados no teste de segmentação pela rede neural foram semelhantes entre as diferentes lesões. Em resumo, esses dados indicam que a rede neural apresentou sensibilidade, especificidade e acurácia similares entre elas, indicando que o algoritmo apresentou um bom desempenho na identificação dos núcleos celulares em todos os casos.

Tabela 3- Resultado da segmentação da *Mask R-CNN* nos diferentes tecidos histopatológicos de LB, LVP e CCE.

Lesão	S_E (%)	E_S (%)	A_C (%)	T_C (%)	D_C (%)
LB	81,89 ± 6,44	96,51 ± 2,28	93,15 ± 2,76	74,95 ± 8,21	83,80 ± 5,60
LVP	80,79 ± 4,58	96,64 ± 1,61	92,93 ± 2,34	74,77 ± 5,71	83,82 ± 3,90
CCE	80,24 ± 9,28	97,67 ± 1,83	94,63 ± 2,85	74,42 ± 8,81	83,47 ± 6,36

Fonte: Elaborada pelo autor

5.3- Características morfológicas extraídas pela rede neural

As características nucleares extraídas pela rede neural foram comparadas entre LB e LVP. Ao todo, as 13 características utilizadas na classificação foram extraídas a partir de todo o *dataset* de ROIs de LVP e de 1.196 das 1.217 ROIs de LB. Em relação às entropias, usou-se sete medidas de entropia, e os dados de cada entropia/lesão podem ser vistos na Tabela 4. As médias para todas as entropias foram sempre maiores nas LVPs quando comparado com as LBs, e com as diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).

Tabela 4- Valores dos sete níveis de entropia nuclear avaliados entre LB e LVP.

Variável	Medidas de tendência central e de dispersão	LB	LVP	<i>p</i>
Entropia 3 x 3	Média	1,968	2,137	<0,0001*
	Mediana	1,983	2,149	
	Mínimo	1,428	1,962	
	Máximo	2,314	2,284	
Entropia 5 x 5	Média	2,769	3,049	<0,0001*
	Mediana	2,784	3,082	
	Mínimo	2,017	2,759	
	Máximo	3,308	3,268	
Entropia 7 x 7	Média	3,243	3,598	< 0,0001*
	Mediana	3,252	3,64	
	Mínimo	2,363	3,232	

Entropia 7 x 7	Máximo	3,913	3,862	
	Média	3,566	3,974	
Entropia 9 x 9	Mediana	3,571	4,024	< 0,0001*
	Mínimo	2,587	3,552	
	Máximo	4,33	4,266	
	Média	3,804	4,249	
Entropia 11 x 11	Mediana	3,805	4,308	< 0,0001*
	Mínimo	2,735	3,785	
	Máximo	4,636	4,574	
	Média	3,986	4,459	
Entropia 13 x 13	Mediana	3,987	4,518	< 0,0001*
	Mínimo	2,836	3,962	
	Máximo	4,872	4,811	
	Média	4,13	4,624	
Entropia 15 x 15	Mediana	4,13	4,687	< 0,0001*
	Mínimo	2,909	4,101	
	Máximo	5,059	5	

* Mann Whitney test; ** Unpaired t test.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Conforme mostrado na Tabela 5, o Índice Moran revelou diferença estatisticamente significativa entre LB e LVP, com as médias de 0,09702 e 0,1022, respectivamente ($p = 0,0103$). Em relação à área, as médias para LB e LVP foram de 836,4 e 1.050, respectivamente, com $p < 0,0001$. De forma similar, as médias de perímetro nuclear para LB e LVP foram de 103,3 e 117,9, respectivamente, com $p < 0,0001$. Quanto à solidez, uma média de 0,9685 e 0,9621 para

LB e LVP foi observada, respectivamente, com $p < 0,0001$. Com relação às características de excentricidade e orientação, as médias para LB e LVP foram muito similares e com $p > 0,05$.

Tabela 5- Comparação entre os valores das características extraídas entre LB e LVP para as variáveis Índice de Moran, Área, Perímetro, Excentricidade, Orientação e Solidez.

Variável	Medidas de tendência central e de dispersão	Leucoplasia	LVP	<i>p</i>
Índice Moran	Média	0,09702	0,1022	
	Mediana	0,09355	0,101	0,0103*
	Mínimo	0,007997	0,0501	
	Máximo	0,2243	0,1607	
Área	Média	836,4	1.050	
	Mediana	800,5	994,2	< 0,0001*
	Mínimo	257,4	532,4	
	Máximo	2176	1.855	
Perímetro	Média	103,3	117,9	
	Mediana	102	115,4	< 0,0001*
	Mínimo	67,98	89,58	
	Máximo	168	158,3	
Excentricidade	Média	0,7142	0,7077	
	Mediana	0,7125	0,7088	0,3238* *
	Mínimo	0,4633	0,5504	
	Máximo	0,9507	0,8125	

Orientação	Média	0,4457	-1,843	
	Mediana	0,9725	-3,563	0,1777*
	Mínimo	-62,57	-40,53	
	Máximo	64,26	48,47	
Solidez	Média	0,9685	0,9621	
	Mediana	0,9755	0,9723	< 0,0001*
	Mínimo	0,8955	0,9125	
	Máximo	0,9836	0,982	

* Mann Whitney test; ** Unpaired t test.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4- LB e LVP

Para a separação entre LB e LVP, empregou-se um classificador polinomial. Para isso, 119 ROIs de LVP juntamente com 120 ROIs de LB escolhidas aleatoriamente foram utilizadas pelo classificador na tentativa avaliar o grau de separabilidade entre elas. O classificador realizou a validação cruzada dividindo as ROIs em cinco grupos (*folds*), onde quatro deles eram utilizados para treinamento e um para teste, e que se alternavam até todos os grupos serem treinados e testados. Como resultado, a média AUC do classificador foi de 97,06%, a média da sensibilidade foi de 95,83%, a média da especificidade foi de 98,29% e a média da acurácia foi de 97,05%. Esses resultados mostram que o classificador foi capaz de distinguir, de forma exitosa, as duas lesões com alto grau de sensibilidade, especificidade e acurácia, indicando que tal ferramenta tem um grande potencial de uso o diagnóstico diferencial entre elas. Na Tabela 6, é possível observar os resultados obtidos em cada grupo bem como a média e desvio padrão das métricas utilizadas para avaliar o desempenho do classificador.

Tabela 6- Resultado do classificador polinomial em separar as amostras entre LB e LVP.

<i>Folds</i>	<i>AUC (%)</i>	<i>S_E (%)</i>	<i>E_S (%)</i>	<i>A_C (%)</i>	Acertos	Erros
<i>Fold 1</i>	97,91	95,83	100	97,91	47	1
<i>Fold 2</i>	97,91	95,83	100	97,91	47	1
<i>Fold 3</i>	93,65	91,66	95,65	93,61	44	3
<i>Fold 4</i>	97,91	95,83	100	97,91	47	1
<i>Fold 5</i>	97,91	100	95,83	97,91	47	1
Média	97,06	95,83	98,29	97,05		
Desv. Padrão	1,9	2,94	2,33	1,92		

Fonte: Elaborada pelo autor

6. DISCUSSÃO

Neste estudo objetivou-se investigar a detecção de alterações nucleares nas LBs e LVPs por meio de auxílio de um computador bem como a separação entre elas através da aplicação de um classificador tendo como base em características nucleares morfológicas. Os resultados deste estudo lançam luz sobre um dos problemas da patologia bucal que é de diagnosticar diferencialmente uma LB de uma LVP, especialmente quando esta se encontra em estágio inicial, o que pode gerar inconsistências, dificuldades, dúvidas e até mesmo erros de diagnóstico, conforme apontado por Lanel (2011) e Munde e Karle (2016). Uma vez que nossos resultados evidenciaram a presença de alterações nucleares detectáveis entre elas, e que essas alterações por sua vez foram capazes de diferenciá-las com alta precisão pelo classificador polinomial, este estudo mostrou a importância de se investigar o núcleo celular através de ferramentas de *machine learning* nas DBPMs para fins de diagnóstico bem como na elucidação das propriedades nucleares características de cada uma delas. Na luz dos avanços da IA, essa ferramenta pode ser mais um alicerce na busca do entendimento dessas lesões juntamente com os estudos que visam encontrar biomarcadores moleculares diferenciais entre elas, o que não existem até o presente momento.

Analisando os dados clinicopatológicos levantados neste trabalho, percebe-se que eles vão de encontro à literatura específica. No geral, a incidência de LB foi maior no sexo masculino do que no feminino, em contrapartida, todos os casos de LVP foram encontrados no sexo feminino, o que é normalmente evidenciado nos estudos envolvendo essas desordens (PETTI, 2003; MUNDE; KARLE, 2016; NADEAU; KERR, 2018; VILLA; SONIS, 2018). O tabagismo, um importante fator etiológico das LBs, também foi observado na maioria dos casos de LB investigado. Quanto ao sítio anatômico, essas lesões podem desenvolver em qualquer lugar da cavidade bucal, porém, a mucosa oral e a língua são as regiões constantemente acometidas por elas (NAPIER; SPEIGHT, 2008; MUNDE; KARLE, 2016; NADEAU; KERR, 2018). Esses aspectos também foram observados em nossos pacientes. As displasias, um achado histopatológico comumente encontrado nessas lesões, também estavam presentes na maioria dos nossos casos, principalmente a displasia leve e, mais raramente, a displasia grave. Apesar da incidência de LB ser bem maior que da LVP, a taxa de transformação das LBs é bem menor. Em nosso estudo, dos 61 casos de LB, apenas dois sofreram transformação maligna, enquanto dos três casos de LVP, um paciente apenas evoluiu para CCE, o que na luz do nosso estudo pode ser considerado alto, inclusive maior que das LBs empregadas (LANEL, 2011; NADEAU;

KERR, 2018). No entanto, há que se ponderar que a nossa amostra de LVP foi pequena, o que compromete um pouco a interpretação desse aspecto biológico patognomônico dessa lesão. Além disso, tem a questão do tempo de acompanhamento desses pacientes, o que pareceu curto a ponto de detectar transformação maligna de suas respectivas lesões, o que nos levou a classificá-los como livres de tumor no presente estudo. Quanto à cor das lesões, a grande maioria dos casos apresentou coloração branca, aspecto clínico comumente encontrado nessas lesões, mas que podem alternar entre lesões brancas e vermelhas em alguns casos (WARNAKULASURIYA; JOHNSON; WAAL, 2007; LANEL, 2011).

O modelo utilizado neste estudo para a aprendizagem e segmentação dos núcleos foi a rede *Mask R-CNN*. A escolha dessa rede veio do trabalho de nosso grupo de estudo na área de IA realizado por Silva (2019), que utilizou esta rede na identificação de núcleos em lesões displásicas de cavidade bucal desenvolvidas em camundongos submetidos à carcinogênese bucal pelo 4NQO. A *Mask R-CNN* acopla a *ResNet50* ou a *ResNet101* para a aprendizagem dos núcleos. Nós optamos pela *ResNet50* com base em um teste empírico realizado no estudo de Silva (2019), que demonstrou que a *ResNet50* obteve melhor performance na segmentação das lesões displásicas investigadas por ele.

Os diversos trabalhos sobre identificação de núcleos adotaram diferentes métodos de segmentação. Sobre isso, a *Mask R-CNN* mostrou-se a mais eficaz em detectar núcleos nos trabalhos que compararam diferentes métodos de identificação nuclear. O estudo de Liu e outros (2018), por exemplo, segmentou núcleos normais e anormais de células cervicais utilizando a *Mask R-CNN*, obtendo uma acurácia média de 96%. Eles também compararam essa rede com outros métodos de segmentação e verificaram que tais métodos apresentaram resultados inferiores aos da *Mask R-CNN*, como o *Multi-scale Watershed + Binary Classifier*, o qual alcançou uma acurácia de 88%, a RGVF de 83% e o *Patch-based FCM* de 85%. O trabalho de Silva (2019) atingiu uma acurácia média de 89,52% com a segmentação de núcleos de células do epitélio de língua sem e com displasias leve, moderada e grave. Ainda nesse estudo, outros métodos foram testados comparativamente ao seu e os resultados foram inferiores, como o método *Otsu*, que apresentou acurácia média de 60,78%, *K-means* de 77,32% e *SegNet* de 73,12%. Esses dados revelam que essa rede neural apresenta uma boa performance quanto à segmentação nuclear, o que foi confirmado pelos nossos resultados de acurácia nas LBs, LVPs e CCEs, correspondendo a 93,15%, 92,93% e 94,63%, respectivamente. Futuros trabalhos poderão aprimorar mais essa rede tal que o seu uso na área de patologia se torne ubíqua, como mostrado por Lv e colaboradores (2019), que desenvolveram uma rede baseada na *Mask R-*

CNN exclusivamente para a detecção de núcleos denominada *Nuclei R-CNN*, com resultados ainda melhores que os da *Mask R-CNN* original.

Quanto às características nucleares extraídas de todo o *dataset* de LB e LVP após o treinamento da rede neural, incluindo entropia, Índice Moran, área, perímetro, excentricidade, orientação e solidez, elas foram comparadas entre as duas lesões. Em nosso estudo, encontrou-se diferenças significativas entre LB e LVP nos setes níveis de entropia avaliados. A entropia é uma medida que avalia a desordem da textura nuclear, que, por sua vez, reflete diretamente a organização da cromatina e, conseqüentemente, as alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem na molécula de DNA durante o processo de tumorigênese (ZINK; FISCHER; NICKERSON, 2004; KLEPPE et al., 2018). Com isso, a entropia nuclear tem sido estudada em diversos tipos de cânceres com foco na determinação de prognóstico clínico e agressividade tumoral (NIELSEN et al., 2014; KLEPPE et al., 2018; JI et al., 2019). No estudo de Kleppe e outros (2018), que investigou diferentes tipos de cânceres incluindo de cólon, ovário, útero, próstata e endométrio, observou-se que pacientes que exibiam padrões de textura mais heterogêneos, ou seja, níveis de entropias maiores, apresentavam pior sobrevida para todos os tumores avaliados. Em nosso estudo, é interessante perceber que todos os níveis médios de entropia analisados foram maiores nas LVPs do que nas LBs, sugerindo uma maior desordem na cromatina daquelas lesões em detrimento destas, o que em parte pode explicar o maior potencial das LVPs de progredirem para CCE. Similarmente, Dey e outros (2017) verificaram um aumento consecutivo de entropia nos núcleos de células epiteliais de pacientes não fumantes, fumantes e portadores de condições pré-cancerígenas. Portanto, esses resultados de entropia parecem ser úteis em distinguir lesões com menor e maior potencial de transformação maligna, no caso LB e LVP, respectivamente, sugerindo a ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas distintas entre elas. Estudos posteriores poderão avaliar se, de fato, índices maiores de entropia nas LBs indicam maior risco de transformação maligna, como parece ser o caso para as LVPs.

Outra característica avaliada em nosso estudo e que também se relaciona com a textura nuclear é o Índice Moran. Não há trabalhos na literatura que utilizem o Índice Moran na avaliação de núcleos celulares, exceto o de Silva (2019). Assim como no nosso estudo, no trabalho de Silva (2019) essa característica se mostrou útil em distinguir as diferentes lesões estudadas, com diferenças significativas entre tecido saudável e com displasia; no presente trabalho, obteve-se uma significância entre LB e LVP. Nesse sentido, pode-se concluir que tanto a entropia quanto o Índice Moran podem ser usados para se detectar alterações na

cromatina em lesões pré-malignas, fato este reforçado pelo estudo de Sabo e outros (2006), que analisou algumas características nucleares e verificou que a textura nuclear é uma variável eficaz em diferenciar os graus de displasia no Esôfago de *Barrett*, além de ter se mostrado eficiente em prever progressão para câncer, o que, juntamente com os nossos resultados, evidencia ainda mais a importância de avaliar as texturas nucleares na tentativa de elucidar as condições patológicas de lesões pré-malignas.

Com relação à área, nossos resultados apontam uma relação direta com alguns estudos sobre DBPMs. O trabalho de Krishnan e outros (2010) mostrou que a área dos núcleos celulares da lesão fibrose submucosa oral com displasia era maior que a dos núcleos normais, sugerindo que essa alteração poderia indicar a ocorrência de tumorigênese, reflexo do aumento da atividade metabólica dessas células. O estudo de Sarkar e colaboradores (2017), por sua vez, revelou um aumento progressivo da área nuclear entre tecidos epiteliais de pacientes não fumantes, fumantes e com DBPMs. Gadiwan e outros (2014) verificaram um aumento da área dos núcleos entre os casos de mucosa bucal normal e de LB com displasia como também entre os níveis de displasia. Smitha, Sharada e Girish (2011) encontraram um aumento gradual da área dos núcleos de mucosa bucal normal, LB e CCE, mostrando ser uma característica muito útil em diferenciá-las. Similar aos estudos mencionados, uma diferença significativa na área dos núcleos entre LB e LVP foi observada. Em conjunto, esses achados revelam uma relação direta entre o surgimento e evolução de condições patológicas das DBPMs e aumento da área nuclear das células dessas lesões. Esses dados sugerem que a área dos núcleos exerce influência direta nos estados patológicos das DBPMs, mostrando ser uma variável útil para caracterizar e distinguir diferentes doenças encontradas na cavidade bucal. É importante ressaltar que pelo fato de a área apresentar um aumento progressivo entre a mucosa bucal normal e LB no estudo de Gadiwane e outros (2014), entre mucosa bucal normal, LB e CCE no estudo de Smitha, Sharada e Girish (2011), e entre LB e LVP no nosso estudo, esses dados parecem indicar que essa variável pode indicar uma maior agressividade à medida que a área nuclear aumenta. Futuros trabalhos podem elucidar o papel da área nuclear na predição de transformação maligna dessas lesões.

Semelhante ao que ocorre na área, o perímetro reflete o tamanho dos núcleos e é algumas vezes usado juntamente com a área para inferir as alterações no tamanho nuclear. O trabalho de Krishnan e outros (2010) mostrou aumento no perímetro dos núcleos entre fibrose submucosa oral com displasia e mucosa bucal normal. O estudo conduzido por Smitha, Sharada e Girish (2011) observou que o perímetro nuclear aumentava gradativamente entre mucosa bucal

normal, LB e CCE. Similarmente, em nosso estudo, observou-se um aumento significativo do perímetro dos núcleos nas LVPs em relação às LBs. Esses achados, juntamente com os encontrados na variável área, permitem concluir que a análise do tamanho nuclear apresenta resultados consistentes em auxiliar na diferenciação, pelo menos em parte, de algumas DBPMs. Estudos posteriores são recomendados para melhor elucidar como tamanho nuclear nas LBs bem como de outras DBPMs podem ser preditivos de malignidade, uma vez que tanto a área quanto o perímetro aumentaram progressivamente à medida que se eleva o risco de transformação maligna, evidenciando o papel crucial do tamanho nuclear no processo de carcinogênese.

A solidez é um descritor usado na avaliação da deformidade nuclear. Em nossos resultados, encontrou-se diferença significativa entre as duas lesões, mostrando também ser uma variável útil na distinção entre LB e LVP. Aqui, a média da solidez nas LVPs foi discretamente menor que nas LBs. Diferentemente do nosso estudo, o trabalho de Krishnan e outros (2012) não encontrou diferenças significativas na solidez dos núcleos na tentativa de discriminar fibrose submucosa oral da mucosa bucal normal. De forma semelhante, o estudo de Dey e colaboradores (2017) também não detectou diferenças substanciais na solidez nuclear entre pacientes não fumantes, fumantes e portadores de DBPMs. Uma hipótese é o fato de as LVPs ter um alto poder de transformação maligna em comparação com outras DBPMs, aumentando as chances de deformidade nuclear e deixando os núcleos menos convexos e mais irregulares, característica encontrada nas células cancerígenas conforme descrito por Zink, Fischer e Nickerson (2004). A solidez é uma variável ainda pouco investigada nos estudos envolvendo a avaliação da morfologia nuclear por algoritmos computacionais, portanto, espera-se que novas pesquisas possam incluí-la na avaliação dos núcleos em diferentes DBPMs como um possível descritor que caracterize diferentes lesões, como observado em nosso estudo.

Não encontramos diferenças significativas para excentricidade e orientação entre LB e LVP. É interessante observar que o estudo de Krishnan e colaboradores (2012) também não encontrou diferenças na excentricidade entre núcleos de fibrose submucosa oral e mucosa bucal, assim como o estudo de Dey e outros (2017). O trabalho de Silva (2019), que avaliou formas de separar diferentes graus de displasia, encontrou diferença significativa na média de excentricidade em todos os núcleos dos tipos de tecidos avaliados, exceto entre displasia moderada e grave. Não encontramos trabalhos anteriores na literatura que relatem o uso da orientação exclusivamente em núcleos celulares além do estudo de Krishnan e colaboradores (2012) que também não observaram diferenças entre mucosa bucal normal e fibrose submucosa

oral com displasia e o trabalho de Silva (2019), que observou diferenças significativas na média da orientação entre tecidos saudáveis e displasia moderada, entre displasia leve e moderada e entre displasia moderada e displasia grave. Dessa maneira, novos estudos devem ser conduzidos a fim de determinar com maior clareza o valor dessas variáveis nas DBPMs.

Dessa maneira, é possível concluir a partir de nossa investigação que ambas as lesões carregam alterações nucleares distintas entre si. Nossos achados sustentam ainda a importância do estudo nuclear a partir de técnicas computacionais avaliadas por uma IA, uma área promissora na medicina e que, sem sombra de dúvidas, moldará o campo da patologia em breve, encontrando novas maneiras de interpretar os processos patológicos que ocorrem em diversas doenças. A partir das evidências encontradas em nosso estudo e nos trabalhos aqui mencionados, esses descritores podem se mostrar úteis na predição de progressão para CCE das DBPMs, como a LB e LVP.

As características nucleares investigadas foram transformadas em vetores para que então o classificador pudesse dicotomizar as amostras entre as duas lesões. O classificador utilizou todas as 119 ROIs de LVP e 120 ROIs de LB para avaliar o grau de separabilidade entre elas. Cabe mencionar que para que a classificação possa executar com boa performance, é importante que se tenha um número equilibrado entre as amostras a serem investigadas, por isso, apenas 120 ROIs de LB foram utilizadas pelo classificador.

O classificador polinomial mostrou-se muito eficaz nos estudos em foi adotado, com um desempenho extremamente satisfatório no trabalho de Nascimento (2013) na classificação entre tecidos normais e anormais de mamografias através da análise da textura, alcançando uma AUC de 98%, um desempenho superior aos classificadores SVM, *Decison Tree* e K-NN, que também foram comparados no estudo. De maneira semelhante, no trabalho de Silva (2019), o classificador polinomial alcançou uma AUC média de 92% na classificação entre os tecidos saudáveis e aqueles com diferentes graus de displasia, ou seja, resultado superior aos classificadores *Multilayer Perceptron*, *Decison Tree* e *Random Forest* comparados em seu estudo. De forma similar, nosso resultado foi excelente, com uma UAC média de 97,06%, indicando esse classificador pode ser uma ferramenta adicional para os patologistas na definição de um diagnóstico histopatológico, uma vez que o diagnóstico das LVPs ainda é um constante desafio na patologia bucal e que pode ser facilmente confundida com as LBs especialmente nos casos iniciais. Com isso, nosso estudo propõe o uso da IA como uma ferramenta que eleve os critérios adotados atualmente na distinção entre essas duas lesões, diminuindo a margem de dúvidas e melhorando a precisão do diagnóstico com menos subjetividade. Novos estudos são

necessários para verificar se esse método pode ser usado nos estágios iniciais das LVPs, quando normalmente são rotuladas como LBs sem qualquer indício de evolução para formas mais agressivas conforme descrito por Lanel (2011), o que seria de grande importância na determinação de um diagnóstico precoce das LVPs, aumentando as chances de sucesso no tratamento.

7. CONCLUSÃO

A partir das investigações conduzidas neste trabalho, o presente estudo mostrou que apesar de histologicamente semelhante, as LBs e LVPs carregam propriedades nucleares distintas e que podem ser usadas para fins de diagnóstico diferencial entre elas e, dessa forma, auxiliando na resolução de um dos grandes desafios da patologia bucal na busca por maneiras mais efetivas e precisas de estabelecer o diagnóstico diferencial entre LB e LVP. O fato de a rede neural ter alcançado uma excelente performance na identificação nuclear através do treinamento supervisionado realizado, revela que tal método pode ser um grande aliado em nossos trabalhos posteriores envolvendo estudos histológicos, incluindo a análise de mais casos de LBs e LVPs em um primeiro momento. Além disso, as características encontradas nos núcleos das duas lesões podem fornecer importantes informações na construção de um modelo visando avaliar o risco de transformação maligna dessas desordens, sendo de extrema importância na tomada de decisões terapêuticas para cada caso. Somado a isso, o uso de um classificador também poderá ser usado no futuro como uma ferramenta adicional para os casos de difícil diagnóstico. Por fim, nossas investigações somam-se aos diversos trabalhos que mostram o *machine learning* como uma nova possibilidade de estudos na patologia, sendo um método eficaz, de baixo custo e que possivelmente será utilizado em larga escala em um futuro próximo nas rotinas clínicas, agregando rapidez, precisão e predição nos diagnósticos.

REFERÊNCIAS

A VILLA,.; SONIS, S. Oral leukoplakia remains a challenging condition. **Oral Diseases**, [S.L.], v. 24, n. 1-2, p. 179-183, 26 fev. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/odi.12781>.

ACS, B.; RANTALAINEN, M.; HARTMAN, J.. Artificial intelligence as the next step towards precision pathology. **Journal Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 288, n. 1, p. 62-81, 3 mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/joim.13030>.

ALI, Moustafa R. K.; WU, Yue; GHOSH, Deepraj; DO, Brian H.; CHEN, Kuangcai; DAWSON, Michelle R.; FANG, Ning; SULCHEK, Todd A.; EL-SAYED, Mostafa A.. Nuclear Membrane-Targeted Gold Nanoparticles Inhibit Cancer Cell Migration and Invasion. **Acs Nano**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 3716-3726, 27 mar. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.6b08345>.

AMAGASA, Teruo; YAMASHIRO, Masashi; UZAWA, Narikazu. Oral premalignant lesions: from a clinical perspective. **International Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 5-14, 12 jan. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10147-010-0157-3>.

ARAÚJO, Flávio Henrique Duarte de. **Convnets na caracterização, recuperação e ranqueamento de células**. 2018. 107 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Engenharia de Teleinformática, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

BAGAN, Jose V.; JIMÉNEZ-SORIANO, Yolanda; DIAZ-FERNANDEZ, Jose M.; MURILLO-CORTÉS, Judith; SANCHIS-BIELSA, José M.; POVEDA-RODA, Rafael; BAGAN, Leticia. Malignant transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral squamous cell carcinoma: a series of 55 cases. **Oral Oncology**, [S.L.], v. 47, n. 8, p. 732-735, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.05.008>.

BAIK, Jonathan; YE, Qian; ZHANG, Lewei; POH, Catherine; ROSIN, Miriam; MACAULAY, Calum; GUILLAUD, Martial. Automated classification of oral premalignant lesions using image cytometry and Random Forests-based algorithms. **Cellular Oncology**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 193-202, 10 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13402-014-0172-x>.

BARATLOO, Alireza; HOSSEINI, Mostafa; NEGIDA, Ahmed; EL ASHAL, Gehad. Part 1: Simple Definition and Calculation of Accuracy, Sensitivity and Specificity. **Emerg**, Tehran, v. 3, n. 2, p. 48-9. 2015. Spring. PMID: 26495380, PMCID: PMC4614595.

BARBORO, Paola; REPACI, Erica; D'ARRIGO, Cristina; BALBI, Cecilia. The Role of Nuclear Matrix Proteins Binding to Matrix Attachment Regions (MARs) in Prostate Cancer Cell Differentiation. **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 40617-40617, 11 jul. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040617>.

BAYRAMOGLU, Nelihan; HEIKKILÄ, Janne. Transfer Learning for Cell Nuclei Classification in Histopathology Images. **Computer Vision – ECCV 2016 Workshops**. ECCV 2016. Lecture Notes in Computer Science, v. 9915. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49409-8_46

BECK, Martin; HURT, Ed. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 73-89, 21 dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2016.147>.

BELL, Emily S.; LAMMERDING, Jan. Causes and consequences of nuclear envelope alterations in tumour progression. **European Journal Of Cell Biology**, [S.L.], v. 95, n. 11, p. 449-464, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.06.007>.

BORSOS, Máté; TORRES-PADILLA, Maria-Elena. Building up the nucleus: nuclear organization in the establishment of totipotency and pluripotency during mammalian development. **Genes & Development**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 611-621, 15 mar. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.273805.115>.

BOULON, Séverine; WESTMAN, Belinda J.; HUTTEN, Saskia; BOISVERT, François-Michel; LAMOND, Angus I.. The Nucleolus under Stress. **Molecular Cell**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 216-227, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.024>.

BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; SIEGEL, Rebecca L.; TORRE, Lindsey A.; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 68, n. 6, p. 394-424, 12 set. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21492>.

CALIFANO, Joseph; ; WESTRA, William H; MEININGER, Glenn; CORIO, Russel; KOCH, Wayne M; SIDRANSKY, David. Genetic Progression and Clonal Relationship of Recurrent Premalignant Head and Neck Lesions. **Clin Cancer Res** v.6, n. 2, p. 347-352, 1 fev. 2000. PMID: 10690509

CAMISASCA, Danielle Resende; GONÇALVES, Lorena da Rós; SOARES, Márcia Regina; SANDIM, Vanessa; NOGUEIRA, Fábio César Sousa; GARCIA, Carlos Henrique Saraiva; SANTANA, Rodrigo; OLIVEIRA, Silvia Paula de; BUEXM, Luisa Aguirre; FARIA, Paulo Antônio Silvestre de. A proteomic approach to compare saliva from individuals with and without oral leukoplakia. **Journal Of Proteomics**, [S.L.], v. 151, p. 43-52, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.07.029>.

CARLETON, Neil M.; LEE, George; MADABHUSHI, Anant; VELTRI, Robert W.. Advances in the computational and molecular understanding of the prostate cancer cell nucleus. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 119, n. 9, p. 7127-7142, 20 jun. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.27156>.

CHANG, Hye Yoon; JUNG, Chan Kwon; WOO, Junwoo Isaac; LEE, Sanghun; CHO, Joonyoung; KIM, Sun Woo; KWAK, Tae-Yeong. Artificial Intelligence in Pathology. **Journal Of Pathology And Translational Medicine**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 1-12,

15 jan. 2019. The Korean Society of Pathologists and The Korean Society for Cytopathology. <http://dx.doi.org/10.4132/jptm.2018.12.16>.

CHEN, Claire Lifan; MAHJOUBFAR, Ata; TAI, Li-Chia; BLABY, Ian K.; HUANG, Allen; NIAZI, Kayvan Reza; JALALI, Bahram. Deep Learning in Label-free Cell Classification. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 21471-21471, mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep21471>.

CHOW, Kin-Hoe; FACTOR, Rachel E.; ULLMAN, Katharine S.. The nuclear envelope environment and its cancer connections. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 196-209, 16 fev. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3219>.

COELHO, Miguel B.; ATTIG, Jan; ULE, Jernej; SMITH, Christopher W.J.. Matrin3: connecting gene expression with the nuclear matrix. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 303-315, 26 jan. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wrna.1336>.

CUTTLE, Juan Alejandro Terenzi. **Utilização de redes convolucionais profundas para estimativa de ângulos de pose de fâcies obtidas através do Kinect®**. 2018. 108 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciência da Computação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

DECHAT, T.; ADAM, S. A.; TAIMEN, P.; SHIMI, T.; GOLDMAN, R. D.. Nuclear Lamins. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 2, n. 11, p. 000547-000547, 8 set. 2010. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a000547>.

DENAI, C. M.; GILBERT, R. M.; ISERMANN, P.; MCGREGOR, A. L.; LINDERT, M. Te; WEIGELIN, B.; DAVIDSON, P. M.; FRIEDL, P.; WOLF, K.; LAMMERDING, J.. Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. **Science**, [S.L.], v. 352, n. 6283, p. 353-358, 24 mar. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad7297>.

DEO, Rahul C.. Machine Learning in Medicine. **Circulation**, [S.L.], v. 132, n. 20, p. 1920-1930, 17 nov. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.115.001593>.

DEY, Pranab. Cancer nucleus: morphology and beyond. **Diagnostic Cytopathology**, [S.L.], v. 5, n. 38, p. 382-390, 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/dc.21234>.

DEY, Susmita; SARKAR, Ripon; CHATTERJEE, Kabita; DATTA, Pallab; BARUI, Ananya; MAITY, Santi P.. Pre-cancer risk assessment in habitual smokers from DIC images of oral exfoliative cells using active contour and SVM analysis. **Tissue And Cell**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 296-306, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2017.01.009>.

DIEBOLD, Stephanie; OVERBECK, Michael. Soft Tissue Disorders of the Mouth. **Emergency Medicine Clinics Of North America**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 55-68, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.emc.2018.09.006>.

DONG, Yunmei; CHEN, Yuxin; TAO, Yan; HAO, Yilong; JIANG, Lu; DAN, Hongxia; ZENG, Xin; CHEN, Qianming; ZHOU, Yu. Malignant transformation of oral leukoplakia

- treated with carbon dioxide laser: a meta-analysis. **Lasers In Medical Science**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 209-221, 15 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-018-2674-7>.
- ERICKSON, Bradley J.; KORFIATIS, Panagiotis; AKKUS, Zeynettin; KLINE, Timothy L.. Machine Learning for Medical Imaging. **Radiographics**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 505-515, mar. 2017. Radiological Society of North America (RSNA). <http://dx.doi.org/10.1148/rg.2017160130>.
- FARAH, Camile S.; FOX, Simon A.. Dysplastic oral leukoplakia is molecularly distinct from leukoplakia without dysplasia. **Oral Diseases**, [S.L.], v. 25, n. 7, p. 1715-1723, 26 jul. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/odi.13156>.
- GADIWAN, Mohsin; MADHUSHANKARI, Gs; MANDANA, Dd; PRADEEP, Ds; PRAVEEN, Sb; SELVAMANI, Ms. Nuclear features in different grades of epithelial dysplasia in leukoplakia: a computer assisted microscopic study. **Journal Of Oral And Maxillofacial Pathology**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 194-194, 2014. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-029x.140747>.
- GALE, Nina; ZIDAR, Nina; POLJAK, Mario; CARDESA, Antonio. Current Views and Perspectives on Classification of Squamous Intraepithelial Lesions of the Head and Neck. **Head And Neck Pathology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 16-23, mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12105-014-0530-z>.
- GANESH, Divya; SREENIVASAN, Prathima; ÖHMAN, Jenny; WALLSTRÖM, Mats; BRAZ-SILVA, Paulo Henrique; GIGLIO, Daniel; KJELLER, Göran; HASSÉUS, Bengt. Potentially Malignant Oral Disorders and Cancer Transformation. **Anticancer Research**, [S.L.], v. 38, n. 6, p. 3223-3229, 30 maio 2018. International Institute of Anticancer Research. <http://dx.doi.org/10.21873/anticanres.12587>.
- GONGAS, Laura; MORENO, Ana Maria; BRAVO, Laura Maria. Automated Diagnosis of Breast Cancer based on Histological Images. **2018 IX International Seminar of Biomedical Engineering (SIB)**, Bogotá, pp. 1-6, 2018. <http://dx.doi.org/10.1109/SIB.2018.8467730>.
- GONZALES, Rafael C; WOODS, Richard e. **Processamento digital de imagens**. 3. ed. São Paulo: Pearson, 2009.
- GOODFELLOW, Ian; BENGIO, Yoshua; COURVILLE, Aaron. Deep learning. **MIT press**, 2016. Disponível em <<http://www.deeplearningbook.org/>>. Acesso em: 05 jun. 2020.
- GOPINATH, Divya. Prevalence of Carcinomatous Foci in Oral Leukoplakia: a clinicopathologic study of 546 indian samples. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 78-83, 2016. JCDR Research and Publications. <http://dx.doi.org/10.7860/jcdr/2016/16815.8305>.
- GU, Yangnan. The nuclear pore complex: a strategic platform for regulating cell signaling. **New Phytologist**, [S.L.], v. 219, n. 1, p. 25-30, 31 ago. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.14756>.

GUELEN, Lars; PAGIE, Ludo; BRASSET, Emilie; MEULEMAN, Wouter; FAZA, Marius B.; TALHOUT, Wendy; EUSSEN, Bert H.; KLEIN, Annelies de; WESSELS, Lodewyk; LAAT, Wouter de. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. **Nature**, [S.L.], v. 453, n. 7197, p. 948-951, 7 maio 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06947>.

GUILLAUD, M.; ZHANG, L.; POH, C.; ROSIN, M. P.; MACAULAY, C.. Potential Use of Quantitative Tissue Phenotype to Predict Malignant Risk for Oral Premalignant Lesions. **Cancer Research**, [S.L.], v. 68, n. 9, p. 3099-3107, 1 maio 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-2113>.

GUO, Tongtong; FANG, Yuda. Functional organization and dynamics of the cell nucleus. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 5, p. 362-378, 12 ago. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00378>.

HALAMA, Niels. Machine learning for tissue diagnostics in oncology: brave new world. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 121, n. 6, p. 431-433, 9 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-019-0535-1>.

HAMEED, K. A. Shahul; BANUMATHI, A.; ULAGANATHAN, G.. P53immunostained cell nuclei segmentation in tissue images of oral squamous cell carcinoma. **Signal, Image And Video Processing**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 363-370, 22 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11760-016-0953-y>.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A.. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, [S.L.], v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANCOCK, Ronald. A new look at the nuclear matrix. **Chromosoma**, [S.L.], v. 109, n. 4, p. 219-225, 5 jul. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s004120000077>.

HAYKIN, Simon. **Neural networks and learning machines**. 3. ed. Upper Saddle River: Pearson Education, 2009. 938 p.

HE, Kaiming; GKIOXARI, Georgia; DOLLÁR, Piotr; GIRSHICK, Ross. Mask R-CNN. **2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV)**, pp. 2980-2988, Venice, 2017. <http://dx.doi.org/10.1109/ICCV.2017.322>.

HEINDL, Andreas; KHAN, Adnan Mujahid; RODRIGUES, Daniel Nava; EASON, Katherine; SADANANDAM, Anguraj; ORBEGOSO, Cecilia; PUNTA, Marco; SOTTORIVA, Andrea; LISE, Stefano; BANERJEE, Susana. Microenvironmental niche divergence shapes BRCA1-dysregulated ovarian cancer morphological plasticity. **Nature Communications**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 3917-3917, 25 set. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-06130-3>.

HETZER, Martin W.; WALTHER, Tobias C.; MATTAJ, Iain W.. PUSHING THE ENVELOPE: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. **Annual Review Of Cell And Developmental Biology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 347-380, nov. 2005. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151152>.

HETZER, Martin W.; WENTE, Susan R.. Border Control at the Nucleus: biogenesis and organization of the nuclear membrane and pore complexes. **Developmental Cell**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 606-616, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.007>.

HOSNI, Elaini Sickert; SALUM, Fernanda Gonçalves; CHERUBINI, Karen; YURGEL, Liliane Soares; FIGUEIREDO, Maria Antonia Zancanaro. Oral Erythroplakia and Speckled Leukoplakia: retrospective analysis of 13 cases. **Brazilian Journal Of Otorhinolaryngology**, [S.L.], v. 75, n. 2, p. 295-299, mar. 2009. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1808-8694\(15\)30793-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1808-8694(15)30793-x).

HUYNH, Benjamin Q.; LI, Hui; GIGER, Maryellen L. Digital mammographic tumor classification using transfer learning from deep convolutional neural networks. **Journal Of Medical Imaging**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 034501-034501, 22 ago. 2016. SPIE-Intl Soc Optical Eng. <http://dx.doi.org/10.1117/1.jmi.3.3.034501>.

IRIANTO, Jerome; PFEIFER, Charlotte R.; IVANOVSKA, Irena L.; SWIFT, Joe; DISCHER, Dennis E.. Nuclear Lamins in Cancer. **Cellular And Molecular Bioengineering**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 258-267, 18 abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12195-016-0437-8>.

JABALEE, James; CARRARO, Anita; NG, Tony; PRISMAN, Eitan; GARNIS, Cathie; GUILLAUD, Martial. Identification of Malignancy-Associated Changes in Histologically Normal Tumor-Adjacent Epithelium of Patients with HPV-Positive Oropharyngeal Cancer. **Analytical Cellular Pathology**, [S.L.], v. 2018, p. 1-9, 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/1607814>.

JABARIN, Basel; PITARO, Jacob; MARON, Tal; MUALLEM-KALMOVICH, Limor. Dysplastic Changes in Patients with Recurrent Laryngeal Leukoplakia: Importance of Long-Term Follow-Up. **The Israel Medical Association journal: IMAJ**, v. 20, n. 10, p. 623, 2018. PMID: 30324779

JADER, Gil; FONTINELE, Jefferson; RUIZ, Marco; ABDALLA, Kalyf; PITHON, Matheus; OLIVEIRA, Luciano. Deep instance segmentation of teeth in panoramic X-ray images. **31st SIBGRAPI Conference on Graphics, Patterns and Images (SIBGRAPI)**. IEEE, p. 400-407, 2018. Disponível em http://sibgrapi.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/sibgrapi/2018/08.29.19.07/doc/tooth_segmentation.pdf> Acesso em 09 ago. 2020.

JI, Meng-Yao; YUAN, Lei; JIANG, Xiao-Da; ZENG, Zhi; ZHAN, Na; HUANG, Ping-Xiao; LU, Cheng; DONG, Wei-Guo. Nuclear shape, architecture and orientation features from H&E images are able to predict recurrence in node-negative gastric adenocarcinoma. **Journal Of Translational Medicine**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 92-92, 18 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-019-1839-x>.

KLEPPE, Andreas; ALBREGTSEN, Fritz; VLATKOVIC, Ljiljana; PRADHAN, Manohar; NIELSEN, Birgitte; HVEEM, Tarjei s; A ASKAUTRUD, Hanne; KRISTENSEN, Gunnar B; NESBAKKEN, Arild; TROVIK, Jone. Chromatin organisation and cancer prognosis: a pan-cancer study. **The Lancet Oncology**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 356-369, mar. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(17\)30899-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30899-9).

KOMURA, Daisuke; ISHIKAWA, Shumpei. Machine learning approaches for pathologic diagnosis. **VirchowsArchiv**, [S.L.], v. 475, n. 2, p. 131-138, 20 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-019-02594-w>.

KOUROU, Konstantina; EXARCHOS, Themis P.; EXARCHOS, Konstantinos P.; KARAMOUZIS, Michalis V.; FOTIADIS, Dimitrios I. Machine learning applications in cancer prognosis and prediction. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 13, p. 8-17, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2014.11.005>.

KRISHNAN, M. Muthu Rama; CHAKRABORTY, Chandan; PAUL, Ranjan Rashmi; RAY, Ajoy K.. Hybrid segmentation, characterization and classification of basal cell nuclei from histopathological images of normal oral mucosa and oral submucous fibrosis. **Expert Systems With Applications**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 1062-1077, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eswa.2011.07.107>.

KRISHNAN, M. Muthu Rama; PAL, Mousumi; PAUL, Ranjan Rashmi; CHAKRABORTY, Chandan; CHATTERJEE, Jyotirmoy; RAY, Ajoy K. Computer Vision Approach to Morphometric Feature Analysis of Basal Cell Nuclei for Evaluating Malignant Potentiality of Oral Submucous Fibrosis. **Journal Of Medical Systems**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 1745-1756, 9 dez. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10916-010-9634-5>.

LANEL, Viviana. **Verrucosa proliferativa X leucoplasias oral: um estudo clínico comparativo e análise crítica dos critérios de diagnóstico**. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Diagnóstico Bucal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LEEUEW, Rebecca de; GRUENBAUM, Yosef; MEDALIA, Ohad. Nuclear Lamins: thin filaments with major functions. **Trends In Cell Biology**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 34-45, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.004>.

LEMAN, Eddy S.; GETZENBERG, Robert H.. Nuclear structure as a source of cancer specific biomarkers. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 104, n. 6, p. 1988-1993, 23 abr. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.21363>.

LI, Guohong; ZHU, Ping. Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. **Febs Letters**, [S.L.], v. 589, n. 20, p. 2893-2904, 22 abr. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.023>.

LIU, Yao; LI, Jianying; LIU, Xiaoyong; LIU, Xudong; KHAWAR, Waqar; ZHANG, Xinyan; WANG, Fan; CHEN, Xiaoxin; SUN, Zheng. Quantitative Risk Stratification of Oral Leukoplakia with Exfoliative Cytology. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 0126760-0126760, 15 maio 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126760>.

LODI, Giovanni; FRANCHINI, Roberto; WARNAKULASURIYA, Saman; VARONI, Elena Maria; SARDELLA, Andrea; KERR, Alexander R; CARRASSI, Antonio; MACDONALD, L Ci; WORTHINGTON, Helen V. Interventions for treating oral leukoplakia to prevent oral cancer. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 1465-1858, 29 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd001829.pub4>.

- LOPES, UilianKenedi. **Redes neurais convolucionais aplicadas ao diagnóstico de tuberculose por meio de imagens radiológicas**. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Computação Aplicada, Unisinos, São Leopoldo, 2017.
- LU, Cheng; LEWIS, James s; DUPONT, William D; PLUMMER, W Dale; JANOWCZYK, Andrew; MADABHUSHI, Anant. An oral cavity squamous cell carcinoma quantitative histomorphometric-based image classifier of nuclear morphology can risk stratify patients for disease-specific survival. **Modern Pathology**, [S.L.], v. 30, n. 12, p. 1655-1665, 4 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2017.98>.
- LV, Guofeng; WEN, Ke; WU, Zheng; JIN, Xu; AN, Hong; HE, Jie. Nuclei R-CNN: Improve Mask R-CNN for Nuclei Segmentation. **2019 IEEE 2nd International Conference on Information Communication and Signal Processing (ICICSP)**. Weihai, China, pp. 357-362, 2019. [http:// dx.doi.org/ 10.1109/ICICSP48821.2019.8958541](http://dx.doi.org/10.1109/ICICSP48821.2019.8958541).
- MA, Zongqing; WU, XI; SONG, Qi; LUO, Yong; WANG, Yan; ZHOU, Jiliu. Automated nasopharyngeal carcinoma segmentation in magnetic resonance images by combination of convolutional neural networks and graph cut. **Experimental And Therapeutic Medicine**, [S.L.], v. 3, n. 16, p. 2511-2521, 18 jul. 2018. SpandidosPublications. <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2018.6478>.
- MADRAZO, Elena; CONDE, Andrea Cordero; REDONDO-MUÑOZ, Javier. Inside the Cell: integrins as new governors of nuclear alterations?. **Cancers**, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 82-82, 6 jul. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers9070082>.
- MAGISTRIS, Paola de; ANTONIN, Wolfram. The Dynamic Nature of the Nuclear Envelope. **Current Biology**, [S.L.], v. 28, n. 8, p. 487-497, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.073>.
- MAO, Yuntao S.; ZHANG, Bin; SPECTOR, David L. Biogenesis and function of nuclear bodies. **Trends In Genetics**, [S.L.], v. 27, n. 8, p. 295-306, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.006>.
- MAO, Yuntao S.; ZHANG, Bin; SPECTOR, David L. Biogenesis and function of nuclear bodies. **Trends In Genetics**, [S.L.], v. 27, n. 8, p. 295-306, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.006>.
- METZ, Charles E. Basic principles of ROC analysis. **Seminars In Nuclear Medicine**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 283-298, out. 1978. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0001-2998\(78\)80014-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0001-2998(78)80014-2).
- MISTELI, Tom. Beyond the Sequence: cellular organization of genome function. **Cell**, [S.L.], v. 128, n. 4, p. 787-800, fev. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.028>.
- MUNDE, Anita; KARLE, Ravindra. Proliferativeverrucousleukoplakia: an update. **Journal Of Cancer Research And Therapeutics**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 469, 2016. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1482.151443>.

- NADEAU, Christine; KERR, Alexander Ross. Evaluation and Management of Oral Potentially Malignant Disorders. **Dental Clinics Of North America**, [S.L.], v. 62, n. 1, p. 1-27, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cden.2017.08.001>.
- NAPIER, Séamus S.; SPEIGHT, Paul M.. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. **Journal Of Oral Pathology & Medicine**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 1-10, 5 jul. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00579.x>.
- NASCIMENTO, Marcelo Zanchetta do; MARTINS, Alessandro Santana; NEVES, Leandro Alves; RAMOS, Rodrigo Pereira; FLORES, Edna Lúcia; CARRIJO, Gilberto Arantes. Classification of masses in mammographic image using wavelet domain features and polynomial classifier. **Expert Systems With Applications**, [S.L.], v. 40, n. 15, p. 6213-6221, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eswa.2013.04.036>.
- NIELSEN, Michael A. Neural Networks and Deep Learning. Determination Press, 2015. Disponível em <<http://neuralnetworksanddeeplearning.com/chap6.html>>. Acesso em: 05 jun. 2020
- NIELSEN, Birgitte; HVEEM, Tarjei Sveinsgjerd; KILDAL, Wanja; ABELER, Vera M.; KRISTENSEN, Gunnar B.; ALBREGTSEN, Fritz; DANIELSEN, Håvard E.. Entropy-based adaptive nuclear texture features are independent prognostic markers in a total population of uterine sarcomas. **Cytometry Part A**, [S.L.], v. 87, n. 4, p. 315-325, 5 dez. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22601>.
- OH, Inrok *et al.* Entropic effect of macromolecular crowding enhances binding between nucleosome clutches in heterochromatin, but not in euchromatin. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 5469-5469, 3 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23753-0>.
- OKOTURO, E.M.; RISK, J.M.; SCHACHE, A.G.; SHAW, R.J.; BOYD, M.T.. Molecular pathogenesis of proliferative verrucous leukoplakia: a systematic review. **British Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [S.L.], v. 56, n. 9, p. 780-785, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2018.08.010>.
- PENHA, Deyvison de Paiva. **Rede neural convolucional aplicada à identificação de equipamentos residenciais para sistemas de monitoramento não-intrusivo de carga**. 2018. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Belém, 2018. Disponível em <http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/10063>. Acesso em 09 ago. 2020.
- PERIC-HUPKES, Daan; MEULEMAN, Wouter; PAGIE, Ludo; BRUGGEMAN, Sophia W.M.; SOLOVEI, Irina; BRUGMAN, Wim; GRÄF, Stefan; FLICEK, Paul; KERKHOVEN, Ron M.; VAN LOHUIZEN, Maarten. Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation. **Molecular Cell**, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 603-613, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.016>.
- PETTI, Stefano. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. **Oral Oncology**, [S.L.], v. 39, n. 8, p. 770-780, dez. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1368-8375\(03\)00102-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1368-8375(03)00102-7).

PINTO, Ana Catarina; CARAMÊS, João; FRANCISCO, Helena; CHEN, André; AZUL, António Mano; MARQUES, Duarte. Malignant transformation rate of oral leukoplakia—systematic review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology And Oral Radiology**, [S.L.], v. 129, n. 6, p. 600-611, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2020.02.017>.

RAZIN, S. V.; BORUNOVA, V. V.; IAROVAIA, O. V.; VASSETZKY, Y. S.. Nuclear matrix and structural and functional compartmentalization of the eucaryotic cell nucleus. *Biochemistry (Moscow)*, [S.L.], v. 79, n. 7, p. 608-618, jul. 2014. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s0006297914070037>.

RHODUS, Nelson L.; KERR, A. Ross; PATEL, Ketan. Oral Cancer. **Dental Clinics Of North America**, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 315-340, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cden.2013.12.004>.

RIGHETTO, Guilherme. **O uso da rede neural convolucional como extrator de características aplicado ao problema de identificação de escritores**. 2016. 51 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciência da Computação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2016.

RIVERA, César. Essentials of oral cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 9, p. 11884, 2015. PMID: [PMC4637760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2637760/)

RODRIGUEZ-BRAVO, Veronica; PIPPA, Raffaella; SONG, Won-Min; CARCELES-CORDON, Marc; DOMINGUEZ-ANDRES, Ana; FUJIWARA, Naoto; WOO, Jungreem; KOH, Anna P.; ERTEL, Adam; LOKAREDDY, Ravi K. Nuclear Pores Promote Lethal Prostate Cancer by Increasing POM121-Driven E2F1, MYC, and AR Nuclear Import. **Cell**, [S.L.], v. 174, n. 5, p. 1200-1215, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.015>.

RODRIGUEZ-BRAVO, Veronica; PIPPA, Raffaella; SONG, Won-Min; CARCELES-CORDON, Marc; DOMINGUEZ-ANDRES, Ana; FUJIWARA, Naoto; WOO, Jungreem; KOH, Anna P.; ERTEL, Adam; LOKAREDDY, Ravi K..Nuclear Pores Promote Lethal Prostate Cancer by Increasing POM121-Driven E2F1, MYC, and AR Nuclear Import. **Cell**, [S.L.], v. 174, n. 5, p. 1200-1215, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.015>.

RUUSUVUORI, Pekka; VALKONEN, Mira; NYKTER, Matti; VISAKORPI, Tapio; LATONEN, Leena. Feature-based analysis of mouse prostatic intraepithelial neoplasia in histological tissue sections. **Journal of Pathology Informatics**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 5-5, 2016. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/2153-3539.175378>.

SAARINEN, Irena; MIRTTI, Tuomas; SEIKKULA, Heikki; BOSTRÖM, Peter J.; TAIMEN, Pekka. Differential Predictive Roles of A- and B-Type Nuclear Lamins in Prostate Cancer Progression. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 0140671-0140671, 15 out. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140671>.

SABO, Edmond; BECK, Andrew H; A MONTGOMERY, Elizabeth; BHATTACHARYA, Baishali; MEITNER, Patricia; WANG, Ji Yi; RESNICK, Murray B. Computerized morphometry as an aid in determining the grade of dysplasia and progression to

adenocarcinoma in Barrett's esophagus. **Laboratory Investigation**, [S.L.], v. 86, n. 12, p. 1261-1271, 30 out. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.3700481>.

SABO, Edmond; BECK, Andrew H; A MONTGOMERY, Elizabeth; BHATTACHARYA, Baishali; MEITNER, Patricia; WANG, Ji Yi; RESNICK, Murray B. Computerized morphometry as an aid in determining the grade of dysplasia and progression to adenocarcinoma in Barrett's esophagus. **Laboratory Investigation**, [S.L.], v. 86, n. 12, p. 1261-1271, 30 out. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.3700481>.

SAKTHIVEL, Kunnathur Murugesan; SEHGAL, Poonam. A novel role of lamins from genetic disease to cancer biomarkers. **Oncology Reviews**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 309-309, 14 nov. 2016. PAGEPress Publications. <http://dx.doi.org/10.4081/oncol.2016.309>.

SAKTHIVEL, Kunnathur Murugesan; SEHGAL, Poonam. A novel role of lamins from genetic disease to cancer biomarkers. **Oncology Reviews**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 309-309, 14 nov. 2016. PAGEPress Publications. <http://dx.doi.org/10.4081/oncol.2016.309>.

SARKAR, Ripon; DEY, Susmita; PAL, Mousumi; PAUL, RanjanRashmi; CHATTERJEE, Jyotirmoy; ROYCHAUDHURI, Chirasree; BARUI, Ananya. Risk prediction for oral potentially malignant disorders using fuzzy analysis of cytomorphological and autofluorescence alterations in habitual smokers. **Future Oncology**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 499-511, mar. 2017. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fon-2016-0382>.

SCROBOTĂ, Ioana; BĂCIUȚ, Grigore; FILIP, Adriana Gabriela; TODOR, Bianca; BLAGA, Florin; BĂCIUȚ, Mihaela Felicia. Application of Fuzzy Logic in Oral Cancer Risk Assessment. **Iran J Public Health**.; v. 46, n. 5, pp. 612-619, maio 2017. PMID: 28560191; PMCID: PMC5442273.

SHEVELYOV, Y. Y.; ULIANOV, S. V. Role of Nuclear Lamina in Gene Repression and Maintenance of Chromosome Architecture in the Nucleus. **Biochemistry (Moscow)**, [S.L.], v. 83, n. 4, p. 359-369, abr. 2018. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s0006297918040077>.

SILVA, Adriano Barbosa. **Métodos Computacionais para Análise e Classificação de Displasias em Imagens da Cavidade Bucal**. 2019. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência da Computação, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/27114?locale=pt_BR. Acesso em: 09 ago. 2020.

SMITHA, T; SHARADA, P; GIRISH, Hc. Morphometry of the basal cell layer of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma using computer-aided image analysis. **Journal Of Oral And Maxillofacial Pathology**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 26-26, 2011. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-029x.80034>.

SOLOMON, Chris; BRECKON, Toby. **Fundamentals of Digital Image Processing: A practical approach with examples in Matlab**. Canterbury: Wiley-Blackwell, 2010. 344 p.

SPEIGHT, Paul M.; KHURRAM, Syed Ali; KUJAN, Omar. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology And Oral Radiology**, [S.L.], v. 125, n. 6, p. 612-627, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2017.12.011>.

STRATTON, Michael R.; CAMPBELL, Peter J.; FUTREAL, P. Andrew. The cancer genome. **Nature**, [S.L.], v. 458, n. 7239, p. 719-724, abr. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07943>.

SULTAN, Ahmed S.; ELGHARIB, Mohamed A.; TAVARES, Tiffany; JESSRI, Maryam; BASILE, John R.. The use of artificial intelligence, machine learning and deep learning in oncologic histopathology. **Journal Of Oral Pathology & Medicine**, [S.L.], v. 00, n. 00, p. 1-8, 15 jun. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jop.13042>.

TAKAHASHI, Ryohei; KAJIKAWA, Yuya. Computer-aided diagnosis: a survey with bibliometric analysis. **International Journal Of Medical Informatics**, [S.L.], v. 101, p. 58-67, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmedinf.2017.02.004>.

THORPE, Stephen D.; CHARPENTIER, Myriam. Highlight on the dynamic organization of the nucleus. **Nucleus**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 2-10, 7 out. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19491034.2016.1243634>.

TOUMPANAKI, A.; BALTATZIS, G. E.; GAITANAROU, E.; SERETIS, E.; TOUMPANAKIS, C.; ARONI, K.; KITTAS, Christos; VOLOUDAKIS-BALTATZIS, I. E..Two-Dimensional Electrophoretic Analysis of Nuclear Matrix Proteins in Human Colon Adenocarcinoma. **Ultrastructural Pathology**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 83-91, jan. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01913120802454355>.

TRAN, Phi Vu. A fully convolutional neural network for cardiac segmentation in short-axis MRI. **arXiv preprint arXiv:1604.00494**, 2016.
Disponível em <<https://arxiv.org/abs/1604.00494>>. Acesso em 09 ago. 2020.

UPADHYAYA, Jasbir D.; FITZPATRICK, Sarah G.; ISLAM, Mohammed N.; BHATTACHARYYA, Indraneel; COHEN, Donald M.. A Retrospective 20-Year Analysis of Proliferative Verrucous Leukoplakia and Its Progression to Malignancy and Association with High-risk Human Papillomavirus. **Head And Neck Pathology**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 500-510, 9 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12105-018-0893-7>.

VILLA, Alessandro; HANNA, Glenn J.; KACEW, Alec; FRUSTINO, Jennifer; HAMMERMAN, Peter S.; WOO, Sook Bin. Oral keratosis of unknown significance shares genomic overlap with oral dysplasia. **Oral Diseases**, [S.L.], v. 25, n. 7, p. 1707-1714, 23 jul. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/odi.13155>.

VILLA, Alessandro; WOO, Sook Bin. Leukoplakia—A Diagnostic and Management Algorithm. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, [S.L.], v. 75, n. 4, p. 723-734, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2016.10.012>.

VISIOLI, Fernanda; LAUXEN, Isabel Silva; SANT'ANA FILHO, Manoel; RADOS, Pantelis Varvaki. Expression of the cell cycle regulation proteins p53 and p21WAF1 in

different types of non-dysplastic leukoplakias. **Journal Of Applied Oral Science**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 369-375, jun. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-77572012000300013>.

WAAL, Isaïc van Der. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. **Oral Oncology**, [S.L.], v. 46, n. 6, p. 423-425, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.02.016>.

WAAL, Isaïc van Der. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**, [S.L.], v. 45, n. 4-5, p. 317-323, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.05.016>.

WAAL, Isaïc. Oral leukoplakia: a diagnostic challenge for clinicians and pathologists. **Oral Diseases**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 348-349, 27 set. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/odi.12976>.

WANG, Xiangxue; JANOWCZYK, Andrew; ZHOU, Yu; THAWANI, Rajat; FU, Pingfu; SCHALPER, Kurt; VELCHETI, Vamsidhar; MADABHUSHI, Anant. Prediction of recurrence in early stage non-small cell lung cancer using computer extracted nuclear features from digital H&E images. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 13543-13543, 19 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13773-7>.

WANG, Zhi; FENG, Xiaodong; LIU, Xinyu; JIANG, Lu; ZENG, Xin; JI, Ning; LI, Jing; LI, Longjiang; CHEN, Qianming. Involvement of potential pathways in malignant transformation from Oral Leukoplakia to Oral Squamous Cell Carcinoma revealed by proteomic analysis. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 383, 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-383>.

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A.. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. **Journal Of Oral Pathology & Medicine**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 155-166, 20 jul. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jop.12339>.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, Newell. W.; WAAL, I. van Der. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **Journal Of Oral Pathology & Medicine**, [S.L.], v. 36, n. 10, p. 575-580, 26 jul. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x>.

WARNAKULASURIYA, S.; REIBEL, J.; BOUQUOT, J.; DABELSTEEN, E.. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **Journal Of Oral Pathology & Medicine**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 127-133, 3 fev. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00584.x>.

WASAĞ, Piotr.; LENARTOWSKI, Robert. Nuclear matrix-structure, function and pathogenesis. **Postepyhigienyimedycynydoswiadczalnej (Online)**, v. 70, p. 1206-1219, 2016. PMID: 28026824

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 5 jun. 2020.

XU, Songli; POWERS, Maureen A.. Nuclear pore proteins and cancer. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 620-630, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.03.003>.

ZHANG, Zhi-Yong; ZHAO, Zeng-Ren; JIANG, Li; LI, Jia-Chen; GAO, Yan-Min; CUI, Dong-Sheng; WANG, Che-Jiang; SCHNEIDER, Jose; WANG, Ming-Wei; SUN, Xiao-Feng. Nup88 Expression in Normal Mucosa, Adenoma, Primary Adenocarcinoma and Lymph Node Metastasis in the Colorectum. **Tumor Biology**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 93-99, 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1159/000099154>.

ZINK, Daniele; FISCHER, Andrew H.; NICKERSON, Jeffrey A.. Nuclear structure in cancer cells. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 4, n. 9, p. 677-687, set. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1430>.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de alterações epigenéticas em doenças da região bucomaxilofacial.

Pesquisador: ADRIANO MOTA LOYOLA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60858016.1.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.001.481

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo: As modificações epigenéticas têm ganhado atenção no estudo da carcinogênese juntamente com as alterações genéticas. Evidências recentes sugerem a participação de componentes epigenéticos também em lesões cancerizáveis. Esse estudo foi desenvolvido para analisar as alterações epigenéticas associadas à carcinogênese humana na região bucomaxilofacial. Padrões dessas alterações têm sido observados em amostras dessas neoplasias. A identificação e caracterização desses distintos padrões se faz essencial para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes e efetivas, além de proporcionar a tentativa de explicar a etiopatogenia, e detectar possíveis influências das mesmas no comportamento desses tumores. Até recentemente, o sequenciamento de DNA para identificar mutações genéticas em neoplasias era impraticável e caro. Os recentes avanços tecnológicos nesse processo, como a criação do método de sequenciamento de última geração, baseada no uso de semicondutores Ion Proton, otimizou o custo e o tempo do sequenciamento, além de oferecer resultados mais confiáveis.

Usando o Ion Proton, os pesquisadores sequenciarão genes mais comumente relacionados às alterações em histonas, buscando identificar o papel dessas alterações epigenéticas em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.001.461

(leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica). Serão considerados na composição da amostra tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica). Todos os casos incluídos nesse estudo serão coletados prospectivamente, a partir da aprovação do presente projeto, e retrospectivamente, a partir de 1978 (início do arquivamento das amostras cirúrgicas do Laboratório de patologia bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia). A coleta dos casos em ambas as situações se fará até 2021 período limite do desenvolvimento do estudo, perfazendo um número provável de 320 amostras ao final, baseado na frequência de seus diagnósticos registrados no Laboratório de Patologia do Curso de Odontologia. Todos os casos eletivos serão incluídos no estudo a partir da aceitação do paciente, mediante a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Objetivo da Pesquisa:

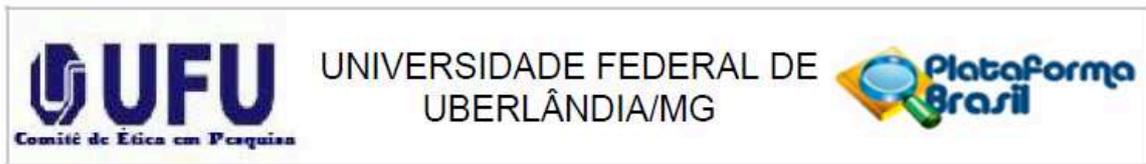
Objetivo Primário:

Identificar e analisar alterações epigenéticas, em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica) e sua relação com comportamento biológico e parâmetros clinicopatológicos das lesões supracitadas.

Objetivo Secundário:

- A) Descrever as características clinicopatológicas das lesões estudadas, considerando, quando pertinente, a possibilidade de estudar casos isolados ou pequenas serie de casos, especialmente quando os casos trouxerem informações inusitadas em relação ao que é conhecido pela literatura;
- B) Descrever e semiquantificar os padrões de reatividade imunoistoquímica de vários antígenos representativos das modificações de histonas, nas lesões supracitadas;
- C) Analisar os padrões de reatividade imunoistoquímica com os dados clínico-patológicos nas diferentes lesões a busca de associações entre os padrões e comportamento biológico das lesões e sobrevida dos pacientes.
- D) Quantificar por Western Blotting, a presença de proteínas histonas modificadas, em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica);

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.001.481

E) Mapear as mutações gênicas de histonas em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica;F) Avaliar a presença de miRNA relacionados as proteínas histonas em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos: Os participantes incluídos na pesquisa serão submetidos a riscos considerados mínimos, que consistem em incômodo ou desconforto no momento da coleta do material. Os mesmos serão coletados após a retirada cirúrgica, que acontecerá, independentemente da realização desta pesquisa. Essa coleta será realizada por profissional experiente das clínicas de estomatologia e cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. O risco de identificação do participante da pesquisa será minimizado através da aplicação das seguintes medidas: a privacidade do participante da pesquisa será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o identificar, será mantido em sigilo. Não serão utilizadas identificações como as iniciais do nome do participante, cada participante será identificado por um número no instrumento de coleta de dados e nos tubos que serão coletadas as amostras, garantindo assim o sigilo da sua identidade em todas as etapas da pesquisa.

Benefícios: Quanto aos benefícios, o projeto pretende proporcionar um melhor entendimento acerca da patogenia dessas lesões. Entendemos que, a depender dos resultados obtidos, o conhecimento gerado por este estudo poderá somar-se a outros já presentes na literatura ou motivar sua expansão para que, oportunamente, possamos vislumbrar o surgimento de técnicas terapêuticas no combate a essas neoplasias, de forma menos invasiva e mais eficiente, proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes tratados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa esta descrito de maneira detalhada, permitindo adequada interpretação para a elaboração do parecer ético deste comitê.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.001.481

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer consubstanciado número 1.864.897, de 05 de Dezembro de 2016, foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2018.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2019.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2020.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Setembro de 2021.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.001.481

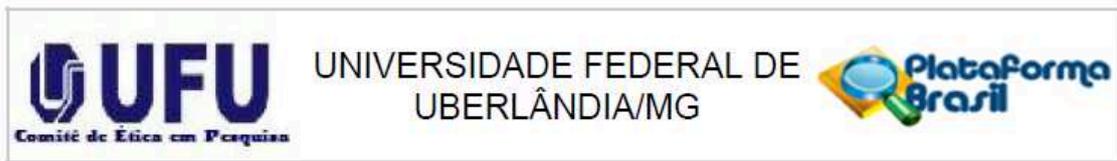
466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_804983.pdf	14/12/2016 20:23:48		Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1864897.pdf	14/12/2016 20:23:12	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Respostas_pendencias_CEP.pdf	14/12/2016 20:22:32	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	14/12/2016 20:18:20	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/12/2016 20:17:07	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	07/10/2016 11:31:04	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Questionario.pdf	06/10/2016 13:03:59	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.001.481

Outros	Declaracao_Instituicao_Co_Participante.pdf	05/10/2016 10:03:35	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_compromisso_da_equipe_executora.pdf	05/10/2016 10:01:55	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento_de_protocolo.pdf	05/10/2016 10:00:30	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Diretor_HO.pdf	05/10/2016 09:58:04	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Diretor_FOUFU.pdf	05/10/2016 09:57:24	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Lattes.pdf	05/10/2016 09:53:57	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 05 de Abril de 2017

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLANDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br