

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**MODELO MULTICATEGÓRICO E USO DE FERRAMENTA
COMPUTADORIZADA PARA AVALIAÇÃO DE
INDIVÍDUOS DE RISCO PARA O CÂNCER BUCAL.**

**Aluna: Tatiana Wannmacher Lepper
Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados**

Porto Alegre, 2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**MODELO MULTICATEGÓRICO E USO DE FERRAMENTA
COMPUTADORIZADA PARA AVALIAÇÃO DE
INDIVÍDUOS DE RISCO PARA O CÂNCER BUCAL.**

Tese apresentada como requisito
para obtenção do grau de Doutora em
Estomatologia, da Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

**Aluna: Tatiana Wannmacher Lepper
Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados**

Porto Alegre, 2023

Dedicatória

*Dedico em especial à minha família, filhos Júlia, Arthur e Miguel,
e à todos que contribuíram para o desenvolvimento destes estudos,
pacientes, professores, alunos e funcionários.*

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, aos meus filhos Júlia, Arthur e Miguel, base de toda minha força de fazer este processo acontecer. Graças às suas habilidades naturais de tornar a vida mais fácil, me ensinam todos os dias o real motivo de tudo isso. O acolhimento e motivação destes pequenos durante toda nossa rotina “não convencional”, em todas as manhãs, tardes e noites, fez com que eu conseguisse realizar e concluir mais esta etapa de formação acadêmica.

Agradeço aos meus pais, Cláudia e Sérgio, pelas suas inspirações. De minha mãe, como educadora, a disciplina e a coerência. De meu pai, como autônomo brasileiro, a força e a persistência.

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Pantelis, pelo “estado da arte” de educar, auxiliando-me no processo de formação acadêmica e de ser humano. Agradeço por apresentar-me verdadeiramente a Patologia e Estomatologia, em especial a Citopatologia. Agradeço o cuidado que teve conosco durante esta longa e nem sempre tão fácil jornada.

Agradeço às professoras, Márcia, Laura e Fernanda pelo imenso carinho ao me acolherem de volta à UFRGS desde o Mestrado. Agradeço aos colegas e muitos amigos que fiz ao decorrer deste caminho, uns no Mestrado, outros entraram no Doutorado. Em especial as minhas duplas atuais de vida: Diego minha dupla acadêmica-cirúrgica; Luara minha dupla de labuta de bloco cirúrgico de longos sábados; Natália minha dupla acadêmica-patológica.

Agradeço às alunas de IC e hoje colegas Renata, Ana Laura e Ewelyn, que contribuíram imensamente para que as atividades de bancada pudessem ser realizadas. Agradeço aos alunos da pós-graduação, Igor e Paiva, por todo empenho, tempo e dedicação nas atividades de análises laboratoriais deste estudo. Foi com a união destas forças de equipe que tudo pode ser construído.

Agradeço ao Professor Manuel e ao colega de pós-graduação Maikel do Departamento de Informática desta Instituição, por acreditarem neste projeto, pelo apoio e contribuição na criação dos Sistemas automatizados de Citopatologia.

Agradeço a todos pacientes que passaram por nós nesta caminhada, pois sem eles este estudo não seria possível, e a FAPERGS, que através do PPSUS, acreditou e investiu financeiramente neste projeto.

Por fim, agradeço a vida e a fé, as duas quando caminhando juntas, me permitiram estar nesta Instituição a qual admiro tanto e assim obter a minha formação cercada de pessoas especiais, que compreenderam esse meu ritmo de vida, um tanto quanto diferente, e me proporcionaram riquíssimos momentos de trocas e aprendizado.

Sumário

1. Resumo	07
2. Justificativa e Antecedentes	10
3. Objetivos	16
4. Artigo 1	18
<i>Análise citopatológica da mucosa bucal para a estratificação de risco para carcinoma espinocelular em coloração de Papanicolaou.</i>	
5. Artigo 2	45
<i>Monitoramento do risco para carcinoma espinocelular pela quantificação citopatológica das NORs com o uso de CNN.</i>	
6. Artigo 3	67
<i>Modelo categórico para a análise de risco para o Carcinoma Espinocelular de boca : Avaliação preliminar.</i>	
7. Considerações Finais	87
8. Referências Bibliográficas	90
9. Anexos	106
9.1. Comitê de Ética	107
9.2. Ficha Clínica e TCLE	108
9.3. Protocolo Papanicolau	114
9.4. Protocolo AgNOR	115
9.5. Apêndice - Tabelas Suplementares	120
9.6. <i>Artigo publicado: A CNN-based approach for joint segmentation and quantification of nuclei and NORs in AgNOR-stained images. Rönna MM, Lepper TW, Amaral LN, Rados PV, Oliveira MM, 2023.</i>	123

1. RESUMO

1. RESUMO

O carcinoma espinocelular de boca (CEC) é ainda um grande desafio para todos os profissionais da área de saúde. Estes desafios envolvem o manejo desta forma de neoplasia maligna, mas principalmente, seu diagnóstico precoce a fim de minimizar a morbidade e a mortalidade desses pacientes. O monitoramento das desordens potencialmente malignas bucais (DPMB), como as leucoplasias e eritroplasias, tem papel fundamental para o diagnóstico precoce do CEC. Para que isto seja alcançado existem diversos métodos de detecção de alterações a nível celular bem como alterações fenotípicas a nível clínico, entretanto esta ação clínica ainda é extremamente passiva e depende do aparecimento das lesões visíveis para tomada de decisão dentre um grupo relativamente amplo de indivíduos que estão em monitoramento e que estão cumulativamente somando danos precoces para o CEC e/ou DMPB. O objetivo deste estudo foi estabelecer o peso relativo dos diferentes parâmetros de risco para o desenvolvimento de CEC, clínicos e citopatológicos; e a validade de aplicação de um sistema capaz de acelerar este monitoramento. Como principais resultados sugere-se um modelo multicategórico apresentando pontos de corte como indicadores de risco aumentado. Para análise de papanicolau o ponto de corte com maior acurácia (89%), sensibilidade (96%) e especificidade (72%) foi aumento de 17% na razão núcleo-citoplasmas associado ao sistema Bethesda modificado. Para análise de AgNOR o ponto de corte foi a observação de média acima de 3,69 NORs por núcleo, apresentando acurácia de 90% (sensibilidade 86% e especificidade 93%). O uso da inteligência artificial CNN efetivamente permitiu a aceleração da obtenção dos resultados comparáveis com a análise humana. A análise do modelo multicategórico apresentou pontuações preliminares de baixo (4-6), moderado (7-12) e alto risco (13-19) para desenvolvimento de CEC. A

aplicação longitudinal igualmente poderá contribuir com o monitoramento de indivíduos de risco para o CEC.

Palavras-chave: Câncer bucal, leucoplasia, citopatologia, Bethesda, citomorfometria, AgNOR, Papanicolau.

2. JUSTIFICATIVA E ANTECEDENTES DA LITERATURA

2. JUSTIFICATIVA E ANTECEDENTES DA LITERATURA

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que na última década, houve um aumento de 20% na incidência de câncer no mundo e espera-se que, para 2030, ocorram mais de 25 milhões de novos casos, a maioria em países de baixa e média renda. No Brasil, a estimativa é de 704 mil novos casos de câncer para o triênio 2023-2025. As neoplasias malignas acometem milhares de pessoas em todo o mundo, sendo o câncer de boca e orofaringe 1 dos 20 cânceres mais comuns (Cancer today, OMS 2023). O número estimado de casos novos de câncer de boca no Brasil é de 15.100, correspondendo ao risco estimado de 6,99 por 100 mil habitantes, sendo 10.900 em homens e 4.200 em mulheres (INCA 2023). Nosso país devido às suas dimensões continentais e heterogeneidade social e cultural, apresenta um perfil da incidência que reflete a diversidade destes padrões, coexistindo semelhanças tanto entre países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Santos M. de O. et al, 2023).

De todas as lesões malignas orais, o carcinoma espinocelular (CEC) é o mais prevalente (Sarode G. et al, 2020). O risco de CEC aumenta com o aumento da idade e pela exposição a fatores de risco como álcool, fumo e exposição UV (Lucena IM. et al, 2022). Quanto ao gênero, o risco é maior em homens, mas tem aumentando progressivamente em mulheres desde 2010 (GLOBOCAN, 2018). Sua causa é multifatorial e nenhum agente ou fator carcinogênico etiológico único tem sido claramente definido ou aceito. A rotina clínica odontológica se mantém passiva nos últimos anos e sem mudança expressiva desses cenários e com limitada busca ativa dos indivíduos com risco de desfecho positivo para CEC (Lepper T.W. et al, 2020).

O sítio mais comumente acometido pelo CEC é a língua, geralmente as superfícies lateral posterior e ventral. O assoalho de boca é o segundo sítio mais acometido, seguido

em ordem decrescente de frequência o palato mole, gengiva, mucosa jugal, mucosa labial e palato duro (Riju J. et al, 2023).

O carcinoma espinocelular tem uma apresentação clínica variada, incluindo as seguintes: exofítica (papilar ou verruciforme), endofítica (invasiva ou ulcerada), leucoplásica (mancha branca), eritroplásica (mancha vermelha) ou leucoeritroplásica (combinação de áreas brancas e avermelhadas) (Chuang SL. et al, 2018). Por vezes, os carcinomas espinocelulares podem ser precedidos por desordens potencialmente malignas bucais (DPMB), como a leucoplasia e/ou eritroplasia, sendo mais fortemente precedido quando estas alterações clínicas visíveis apresentam alterações epiteliais displásicas (Warnakulasuriya S, 2020).

O melhor prognóstico do CECl depende de seu diagnóstico precoce, uma vez que possuem alta taxa de mortalidade. Nos últimos 5 anos, a mortalidade esteve em quase 50% dos casos (OMS, 2023). Logo, avaliações preventivas e de monitoramento devem ser realizadas principalmente em indivíduos do grupo de risco, a fim de reduzir a morbidade e mortalidade destes pacientes.

Sabe-se que o exame clínico visual é o principal método de diagnóstico bucal. A biópsia, quando necessária, acompanhada da análise histopatológica, no manejo de lesões bucais é a conduta considerada padrão ouro para diagnóstico definitivo (Müller S. 2018; Shanti RM, 2020). Porém, para o rastreio de indivíduos de risco sem lesões clínicas visíveis, bem como para o acompanhamento dos mesmos durante a sua vida, a biópsia não está indicada (Warnakulasuriya S, 2020). Desta forma, métodos que sejam capazes de mensurar maior ou menor risco do indivíduo desenvolver o CECl são importantes na rotina clínica do cirurgião-dentista (Macaulay et al, 2012).

Muitos meios de diagnósticos visam melhorar a eficiência desta detecção precoce: esfregaço e escovação associados a várias técnicas de citopatologia, corantes vitais, fluorescência, microscopia confocal, tomografia, espectroscopia, testes genéticos e

quimioluminescência. Entretanto, mesmo que estes testes de forma isolada tenham mostrado resultados promissores na literatura, eles ainda não trazem evidência de precisão suficiente para excluir ou confirmar um diagnóstico de benignidade ou malignidade ou como meio incorporado a protocolos clínicos de rastreamento para mensuração de risco do indivíduo (Reychler et al, 2010).

Uma técnica não invasiva e de baixo custo que pode auxiliar neste processo é a citopatologia (da Silva AD, et al, 2017). Esta técnica analisa uma amostra de células epiteliais que podem ser submetidas a exame microscópico ou molecular para avaliar sinais de mudança nuclear (Weigun et al, 2010; Al Sarraf et al, 2018). A citopatologia permite analisar a célula tanto em padrões quantitativos (citomorfometria e padrão de maturação) quanto em qualitativos (aglomerados celulares) (Singh V. et al, 2021). Estas análises têm sido consideradas na literatura como promissoras para realizar avaliações individuais de risco (Cançado et al., 2001, Al Sarraf, 2018, Lepper T.W. et al, 2018). Estudo usando método de Papanicolau mensurando os diferentes padrões de maturação em células bucais expostas a carcinógenos em lesões leucoplásicas e carcinoma espinocelular observou valores aumentados de células parabasais nos grupos carcinoma espinocelular (CEC) e álcool/fumo quando comparado ao grupo controle (Burzlaff J et al, 2007, Gedoz L et al, 2009 Lepper T.W. et al, 2018). A análise citomorfométrica mostrou aumento da relação núcleo/citoplasma conforme progressão da doença tanto em análise celular individual quanto em aglomerados (Al Sarraf 2018, Lepper T.W 2018). Valores quantitativos das células parabasais e da relação N/C podem ser padrões de avaliação para o desenvolvimento de alteração na mucosa bucal nos indivíduos expostos aos fatores de risco para CEC. (Al Sarraf et al, 2018; Jairajpuri ZS et al, 2019).

Quando analisamos a acurácia dos métodos citológicos pela coloração de papanicolau os valores de sensibilidade destes dois testes de diagnóstico variaram de 56 a 80% e a especificidade variou de 56 a 82% (Lepper et al, 2020). O valor da acurácia do

método de diagnóstico em citopatologia apresenta variação de 85,5 a 96% (Koch et al, 2011; Fontes et al, 2012)

A análise citomorfométrica em Papanicolau tem apresentado resultados promissores, bem como a análise dos aglomerados. Historicamente, a observação do aumento da razão núcleo citoplasma (N/C) é avaliada no método Bethesda para o monitoramento de câncer de colo de útero (Mishra S. et al, 2023). Em cavidade oral, estudos como de Shaila M. et al, 2016 e Raman RK. et al, 2019 apresentaram que o aumento da razão (N/C) pode ser um indicativo de maior risco de suspeição ou malignização e sugerem como método citopatológico de padronização para análise de progressão da doença.

Outro método que pode ser usado por meio da citopatologia é a identificação de Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) (CARRARD et al, 2004; Salgueiro AP, 2020). O aumento da velocidade de proliferação celular reduz o tempo para o processo de reparo do DNA, contribuindo para os múltiplos eventos genéticos da carcinogênese. A técnica das AgNORs avalia essa velocidade de proliferação celular por meio da impregnação pela prata das proteínas associadas às NORs, que são as regiões organizadoras nucleolares responsáveis pela transcrição do DNA ribossômico (REMMERBACH et al, 2003).

O estudo de Pinto T.A.S. et al, 2003 associou as técnicas de Papanicolau e de AgNORs. Apesar da pequena amostra, observou-se uma correlação entre o aumento da área nuclear e o aumento da média do número das AgNORs/núcleo.

A média do número das AgNORs/núcleo, a porcentagem de células com mais de 3 ou 5 AgNORs/núcleo e a média da área das AgNORs são formas de análise deste método. Estudos têm mostrado que o aumento destes padrões são maiores em pacientes expostos ao fumo e ao álcool e com CEC. A exposição crônica destes carcinógenos aumenta a atividade proliferativa celular proporcionalmente ao tempo de exposição,

principalmente sob o efeito sinérgico destes fatores (Paiva RL, 2004; Gedoz L, 2007). O pontos de corte do número médio das AgNORs/núcleo na distinção de lesões benignas e malignas ainda é bem definido, alguns autores consideram 6.5, outros mais de 70% das células do raspado com mais de 3 e 4 (Paiva RL, 2021; Jajodia E, et al., 2017; Remmerbach TW, 2033).

Metodologias conjuntas para identificar indivíduos que tenham maior probabilidade de desenvolver lesões com risco de malignização podem melhorar a efetividade do processo de rastreamento (ROSIN et al, 2000). Estudos atuais demonstraram que sistemas de captura de células com integração de algoritmos de diagnóstico por imagem e incorporados ao sistema podem produzir precisões de diagnóstico. Essas ferramentas podem servir como métodos auxiliares capazes de distinguir entre lesões orais de alto e baixo risco com o objetivo de melhorar os cuidados primários para tratamento secundário e terciário (McRae MPet al, 2020).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estabelecer o peso relativo dos diferentes parâmetros citológicos para a transformação maligna em indivíduos expostos aos fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular e elaboração de um modelo multicategórico.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a variabilidade citopatológica entre pacientes com CEC, DPMB e expostos aos consumos de álcool e fumo, visando estabelecer valores para suspeição de desenvolvimento de CEC, empregando análises citopatológicas, qualitativas, quantitativas e morfométricas em células de mucosa bucal na coloração de Papanicolaou;
- Definir um valor médio de AgNOR por esfregaço buscando estabelecer valores para suspeição de desenvolvimento de CEC em indivíduos expostos ao álcool e fumo comparativamente com indivíduos diagnosticados com DPMB e CEC, e avaliar a contagem humana especializada manual e contagem automatizada por um sistema de CNN (tecnologia desenvolvida pelo mesmo grupo de trabalho - Ronnau M. et al 2023);
- Estabelecimento de uma graduação para avaliação de indivíduos expostos aos fatores de risco para CEC por meio de uma análise multicategórica que envolve parâmetros clínicos, citopatológicos e histopatológicos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. Considerações Finais

O carcinoma espinocelular (CEC) é a neoplasia maligna mais prevalente na cavidade bucal e está entre 10 tipos de cânceres que acomete a população brasileira com alta taxa de mortalidade (INCA, 2023). Nas últimas décadas este contexto não sofreu grande modificação, trazendo um alerta sobre a importância de novas medidas de mensuração de risco para esta patologia (OMS, 2023).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma espinocelular (CEC) são conhecidos e multifatoriais e o exame clínico seguido da biópsia e o exame histopatológico segue sendo o padrão para o diagnóstico das lesões displásicas ou carcinoma espinocelular (Sarode G. et al, 2020; Abati S, 2020).

No entanto, alterações subclínicas podem estar presentes e a rotina clínica odontológica se mantém passiva nos últimos anos, sem mudança expressiva deste cenário, com limitada busca ativa dos indivíduos com risco de desfecho positivo para CEC (Bezerra N.V.F. et al., 2018; Warnakulasuriya S, 2021).

Os estudos existentes na literatura, como pudemos observar, versam sobre vários critérios de análises e padrões citológicos individuais. A associação de mais modelos como forma de rastreio no acompanhamento do indivíduo pode estar mais próximo de um protocolo clínico e citológico utilizável, contribuindo para superarmos o comportamento de acompanhamento passivo destes indivíduos até que ocorra o desfecho da doença.

Os avanços nos sistemas de inteligência artificial sugerem a utilização de sistemas automatizados para avaliação citológica, podendo tornar este processo mais seguro e rápido e com menor subjetividade para seu emprego nas análises citopatológicas em boca e de maneira especial para seu uso confiável de suspeição de malignização (Sunny S et al, 2019; Adeoye J et al, 2021; Ronnau M. et al, 2023).

Atualmente as evidências mais sólidas de pesquisa indicam que exames periódicos através de modelos multicategóricos, como o proposto neste estudo, associado às análises citopatológicas automatizadas possam contribuir para a formulação de um modelo clínico de monitoramento dos indivíduos de risco capaz de sinalizar de maneira ainda mais precoce e específica quais indivíduos apresentam maior chance de malignização (Wang T et al, 2019; McRae MP, 2020; Cai X et al, 2021).

O exame clínico visual seguido da biópsia e exame histopatológico segue sendo a conduta considerada padrão para diagnóstico definitivo CEC e de alterações de displasia epitelial (Müller S. 2018; Shanti RM, 2020).

Agradecimento ao apoio financeiro Fapergs PPSUS 2017 e 2020.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências

1. Organização Mundial de Saúde. Relatório Mundial de Violência e Saúde. Genebra: OMS, 2003. ONU - Organização das Nações Unidas.
2. Warnakulasuriya S, Kerr AR. Oral Cancer Screening: Past, Present, and Future. *J Dent Res*. 2021 Nov;100(12):1313-1320. doi: 10.1177/00220345211014795. Epub 2021 May 26. PMID: 34036828; PMCID: PMC8529297.
3. Alsarraf A, Kujan O, Farah CS. Liquid-based oral brush cytology in the diagnosis of oral leukoplakia using a modified Bethesda Cytology system. *J Oral Pathol Med*. 2018 Oct;47(9):887-894. doi: 10.1111/jop.12759. Epub 2018 Jul 19. PMID: 29957892.
4. Abati S, Bramati C, Bondi S, Lissoni A, Trimarchi M. Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Dec 8;17(24):9160. doi: 10.3390/ijerph17249160. PMID: 33302498; PMCID: PMC7764090
5. Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 Jun;125(6):612-627. doi: 10.1016/j.oooo.2017.12.011. Epub 2017 Dec 29. PMID: 29396319.
6. Andrade JOM, Santos CA de ST, Oliveira MC. Fatores associados ao câncer de boca: um estudo de caso-controle em uma população do Nordeste do Brasil. *Rev bras epidemiol* [Internet]. 2015Oct;18(4):894–905. Available from: <https://doi.org/10.1590/1980-5497201500040017>.

7. Sarode G, Maniyar N, Sarode SC, Jafer M, Patil S, Awan KH. Epidemiologic aspects of oral cancer. *Dis Mon.* 2020 Dec;66(12):100988. doi: 10.1016/j.disamonth.2020.100988. Epub 2020 Jun 27. PMID: 32605720.
8. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR, Lodi G, Mello FW, Monteiro L, Ogden GR, Sloan P, Johnson NW. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis.* 2021 Nov;27(8):1862-1880. doi: 10.1111/odi.13704. Epub 2020 Nov 26. PMID: 33128420.
9. Awadallah M, Idle M, Patel K, Kademani D. Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018 Jun;125(6):628-636. doi: 10.1016/j.oooo.2018.03.010. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29656948.
10. Stojanov IJ, Woo SB. Malignant Transformation Rate of Non-reactive Oral Hyperkeratoses Suggests an Early Dysplastic Phenotype. *Head Neck Pathol.* 2022 Jun;16(2):366-374. doi: 10.1007/s12105-021-01363-z. Epub 2021 Jul 13. PMID: 34255278; PMCID: PMC9187802.
11. Wang T, Wang L, Yang H, Lu H, Zhang J, Li N, Guo CB. Development and validation of nomogram for prediction of malignant transformation in oral leukoplakia: A large-scale cohort study. *J Oral Pathol Med.* 2019 Jul;48(6):491-498. doi: 10.1111/jop.12862. Epub 2019 May 15. PMID: 30980769.
12. Cai X, Zhang J, Han Y, Tang Q, Zhang H, Li T. Development and validation of a nomogram prediction model for malignant transformation of oral potentially

- malignant disorders. *Oral Oncol.* 2021 Dec;123:105619. doi: 10.1016/j.oraloncology.2021.105619. Epub 2021 Nov 21. PMID: 34818615.
13. Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther.* 2016 Apr-Jun;12(2):458-63. doi: 10.4103/0973-1482.186696. PMID: 27461593.
14. Pereira LH, Reis IM, Reategui EP, Gordon C, Saint-Victor S, Duncan R, Gomez C, Bayers S, Fisher P, Perez A, Goodwin WJ, Hu JJ, Franzmann EJ. Risk Stratification System for Oral Cancer Screening. *Cancer Prev Res (Phila).* 2016 Jun;9(6):445-55. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-15-0200. Epub 2016 Mar 28. PMID: 27020654; PMCID: PMC5086457.
15. Heller MA, Nyirjesy SC, Balsiger R, Talbot N, VanKoeveering KK, Haring CT, Old MO, Kang SY, Seim NB. Modifiable risk factors for oral cavity cancer in non-smokers: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2023 Feb;137:106300. doi: 10.1016/j.oraloncology.2022.106300. Epub 2023 Jan 11. PMID: 36638697.
16. Goodson ML, Smith DR, Thomson PJ. The "Newcastle Nomogram"-Statistical modelling predicts malignant transformation in potentially malignant disorders. *J Oral Pathol Med.* 2019 Sep;48(8):662-668. doi: 10.1111/jop.12881. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31125457.
17. de Oliveira LQR, Almangush A, Al-Samadi A, Salo T, Coletta RD. Prognostic markers for oral cancer: An overview of the current status and directions for future research. *J Oral Pathol Med.* 2023 Apr;52(4):288-293. doi: 10.1111/jop.13406. Epub 2023 Feb 1. PMID: 36659864.
18. Monteiro de Oliveira Novaes JA, William WN Jr. Prognostic factors, predictive markers and cancer biology: the triad for successful oral cancer chemoprevention.

- Future Oncol. 2016 Oct;12(20):2379-86. doi: 10.2217/fo-2016-0168. Epub 2016 Jun 22. PMID: 27329013; PMCID: PMC5066140.
19. Mitsala A, Tsalikidis C, Pitiakoudis M, Simopoulos C, Tsaroucha AK. Artificial Intelligence in Colorectal Cancer Screening, Diagnosis and Treatment. A New Era. *Curr Oncol*. 2021 Apr 23;28(3):1581-1607. doi: 10.3390/currenocol28030149. PMID: 33922402; PMCID: PMC8161764.
20. Meng B, Li G, Zeng Z, Zheng B, Xia Y, Li C, Li M, Wang H, Song Y, Yu S. Establishment of early diagnosis models for cervical precancerous lesions using large-scale cervical cancer screening datasets. *Virol J*. 2022 Nov 5;19(1):177. doi: 10.1186/s12985-022-01908-w. PMID: 36335385; PMCID: PMC9636682.
21. Sarode G, Maniyar N, Sarode SC, Jafer M, Patil S, Awan KH. Epidemiologic aspects of oral cancer. *Dis Mon*. 2020 Dec;66(12):100988. doi: 10.1016/j.disamonth.2020.100988. Epub 2020 Jun 27. PMID: 32605720.
22. BRASIL. Ministério da Saúde. 2022.
23. Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther*. 2016 Apr-Jun;12(2):458-63. doi: 10.4103/0973-1482.186696. PMID: 27461593.
24. Muthukrishnan A, Warnakulasuriya S. Oral health consequences of smokeless tobacco use. *Indian J Med Res*. 2018 Jul;148(1):35-40. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1793_17. PMID: 30264752; PMCID: PMC6172921.
25. Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 Jun;125(6):582-590. doi: 10.1016/j.oooo.2018.03.011. Epub 2018 Apr 4. PMID: 29673799.
26. Brener S, Jeunon FA, Barbosa AA, Grandinetti H de AM. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev. Bras. Cancerol*. [Internet]. 30º de março de

- 2007 [citado 26º de novembro de 2023];53(1):63-9. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/1831>.
27. Bezerra NV, Leite KL, de Medeiros MM, Martins ML, Cardoso AM, Alves PM, Padilha WW, Cavalcanti YW. Impact of the anatomical location, alcoholism and smoking on the prevalence of advanced oral cancer in Brazil. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018 May 1;23(3):e295-e301. doi: 10.4317/medoral.22318. PMID: 29680854; PMCID: PMC5945237.
28. Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, De Virgilio A, Di Maio P, Spriano G, Pardiñas López S, Shanti RM. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head Neck*. 2020 Mar;42(3):539-555. doi: 10.1002/hed.26006. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31803979.
29. Aguirre-Urizar JM, Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral leukoplakia: Systematic review and meta-analysis of the last 5 years. *Oral Dis*. 2021 Nov;27(8):1881-1895. doi: 10.1111/odi.13810. Epub 2021 Apr 1. PMID: 33606345.
30. Omar, E. (2015). Current concepts and future of noninvasive procedures for diagnosing oral squamous cell carcinoma - a systematic review. *Head and Face Medicine*, 11(1).
31. Stojanov IJ, Woo SB. Malignant Transformation Rate of Non-reactive Oral Hyperkeratoses Suggests an Early Dysplastic Phenotype. *Head Neck Pathol*. 2022 Jun;16(2):366-374. doi: 10.1007/s12105-021-01363-z. Epub 2021 Jul 13. PMID: 34255278; PMCID: PMC9187802.
32. Chaturvedi AK, Udaltsova N, Engels EA, Katznel JA, Yanik EL, Katki HA, Lingen MW, Silverberg MJ. Oral Leukoplakia and Risk of Progression to Oral Cancer: A

- Population-Based Cohort Study. *J Natl Cancer Inst.* 2020 Oct 1;112(10):1047-1054. doi: 10.1093/jnci/djz238. PMID: 31860085; PMCID: PMC7566351.
33. Abram TJ, Floriano PN, James R, Kerr AR, Thornhill MH, Redding SW, Vigneswaran N, Raja R, McRae MP, McDevitt JT. Development of a cytology-based multivariate analytical risk index for oral cancer. *Oral Oncol.* 2019 May;92:6-11. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.02.011. Epub 2019 Mar 13. PMID: 31010626; PMCID: PMC7358989.
34. Maikel M. Rönnau, Tatiana W. Lepper, Luara N. Amaral, Pantelis V. Rados, Manuel M. Oliveira. A CNN-based approach for joint segmentation and quantification of nuclei and NORs in AgNOR-stained images. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 2023, 107788,ISSN 0169-2607.
35. Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Reboiras-López MD, Gándara-Vila P, Gándara Rey JM, García-García A. Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer. *Biotech Histochem.* 2010 Apr 28;85(3):177-87. doi: 10.3109/10520290903162730. Erratum in: *Biotech Histochem.* 2019 Apr;94(3):224. Pérez-Sayáns M [corrected to Pérez Sayáns M]. PMID: 20426699.
36. McRae MP, Modak SS, Simmons GW, Trochesset DA, Kerr AR, Thornhill MH, Redding SW, Vigneswaran N, Kang SK, Christodoulides NJ, Murdoch C, Dietl SJ, Markham R, McDevitt JT. Point-of-care oral cytology tool for the screening and assessment of potentially malignant oral lesions. *Cancer Cytopathol.* 2020 Mar;128(3):207-220. doi: 10.1002/cncy.22236. Epub 2020 Feb 7. PMID: 32032477; PMCID: PMC7078980.
37. REMMERBACH T.W., Weidenbach H., Müller C., et al. Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal Cell Pathol.* v. 25(3), p.139-46, 2003.

38. Ahmed HG, Ebnoof SO, Hussein MO, Gbreel AY. Oral epithelial atypical changes in apparently healthy oral mucosa exposed to smoking, alcohol, peppers and hot meals, using the AgNOR and Papanicolaou staining techniques. *Diagn Cytopathol.* 2010 Jul;38(7):489-95. doi: 10.1002/dc.21224. PMID: 19894260.
39. Jajodia E, Raphael V, Shunyu NB, Ralte S, Pala S, Jitani AK. Brush Cytology and AgNOR in the Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Acta Cytol.* 2017;61(1):62-70. doi: 10.1159/000451050. Epub 2016 Nov 11. PMID: 27832639.
40. Paiva RL, de Figueiredo MAZ, Cherubini K, Da Silva VD, Salum FG. Cytological Screening Model of Normal Oral Mucosa Exposed to Carcinogens: A Pilot Study. *Acta Cytol.* 2022;66(2):114-123. doi: 10.1159/000519877. Epub 2021 Nov 16. PMID: 34784590.
41. Sunny S, Baby A, James BL, Balaji D, N V A, Rana MH, Gurpur P, Skandarajah A, D'Ambrosio M, Ramanjinappa RD, Mohan SP, Raghavan N, Kandasarma U, N S, Raghavan S, Hedne N, Koch F, Fletcher DA, Selvam S, Kollegal M, N PB, Ladic L, Suresh A, Pandya HJ, Kuriakose MA. A smart tele-cytology point-of-care platform for oral cancer screening. *PLoS One.* 2019 Nov 15;14(11):e0224885. doi: 10.1371/journal.pone.0224885. PMID: 31730638; PMCID: PMC6857853.
42. Adeoye J, Koochi-Moghadam M, Lo AWI, Tsang RK, Chow VLY, Zheng LW, Choi SW, Thomson P, Su YX. Deep Learning Predicts the Malignant-Transformation-Free Survival of Oral Potentially Malignant Disorders. *Cancers (Basel).* 2021 Dec 1;13(23):6054. doi: 10.3390/cancers13236054. PMID: 34885164; PMCID: PMC8657223.
43. Daroit NB, Salgueiro AP, Maito FLDM, Visioli F, Rados PV. The use of cytopathology to identify disturbances in oral squamous cell carcinoma at early stage: A case report. *Diagn Cytopathol.* 2018 Dec;46(12):1068-1072. doi: 10.1002/dc.24057. Epub 2018 Sep 8. PMID: 30195265.

44. Vyas T, Verma P, Abidullah M, Kushwaha SS, Sahoo PK, Priyadarshini SR, Subudhi SK, Rana V. Quantitative analysis of AgNOR counts and pap stain in exfoliative cytology specimens of oral mucosa in bidi smokers and nonsmokers. *Ann Afr Med.* 2018 Oct-Dec;17(4):210-214. doi: 10.4103/aam.aam_69_17. PMID: 30588935; PMCID: PMC6330784.
45. Dogenski LC, de Figueiredo Ribeiro S, Gambin DJ, Maso PC, Linden MSS, Trentin MS, Zoehler B, Crivelini MM, De Carli JP. Oral leukoplakia-epidemiological survey and histochemical analysis of 107 cases in Brazil. *Clin Oral Investig.* 2021 Apr;25(4):1859-1867. doi: 10.1007/s00784-020-03488-x. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32761445.
46. Ruz IA, Ossa DA, Torres WK, Kemmerling U, Rojas BA, Martínez CA. Nucleolar organizer regions in a chronic stress and oral cancer model. *Oncol Lett.* 2012 Mar;3(3):541-544. doi: 10.3892/ol.2011.514. Epub 2011 Dec 6. PMID: 22740947; PMCID: PMC3362340.
47. Sharma A, Saxena S. Quantification of AgNOR expression in exfoliated oral mucosal cells of tobacco chewers with and without lesion. *Indian J Dent Res.* 2012 Mar-Apr;23(2):251-6. doi: 10.4103/0970-9290.100436. PMID: 22945719.
48. You Y, Lai X, Pan Y, Zheng H, Vera J, Liu S, Deng S, Zhang L. Artificial intelligence in cancer target identification and drug discovery. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 May 10;7(1):156. doi: 10.1038/s41392-022-00994-0. PMID: 35538061; PMCID: PMC9090746.
49. Plano de Trabalho Bianual 2021-2023 da OPAS/OMS no Brasil. Brasília, D.F.: Organização Pan-Americana da Saúde; 2022. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
35. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

36. Shanti RM, Tanaka T, Stanton DC. Oral Biopsy Techniques. *Dermatol Clin*. 2020 Oct;38(4):421-427. doi: 10.1016/j.det.2020.05.003. Epub 2020 Aug 10. PMID: 32892851.
37. Asthana S, Labani S, Kailash U, Sinha DN, Mehrotra R. Association of Smokeless Tobacco Use and Oral Cancer: A Systematic Global Review and Meta-Analysis. *Nicotine Tob Res*. 2019 Aug 19;21(9):1162-1171. doi: 10.1093/ntr/nty074. PMID: 29790998.
38. Lucena IM, Santos IDS, Daroit NB, Salgueiro AP, Cavagni J, Haas AN, Rados PV. Sun protection as a protective factor for actinic cheilitis: Cross-sectional population-based study. *Oral Dis*. 2022 Oct;28(7):1802-1810. doi: 10.1111/odi.13837. Epub 2021 Mar 19. PMID: 33751725.
39. Awan Kh. Oral Cancer: Early Detection is Crucial. *J Int Oral Health*. 2014 Sep;6(5):i-ii. PMID: 25395811; PMCID: PMC4229841.
40. H Alsarraf A, Kujan O, Farah CS. The utility of oral brush cytology in the early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: A systematic review. *J Oral Pathol Med*. 2018 Feb;47(2):104-116. doi: 10.1111/jop.12660. Epub 2017 Dec 7. PMID: 29130527.
41. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996 Jun 1;56(11):2488-92. PMID: 8653682.
42. Birur PN, Patrick S, Warnakulasuriya S, Gurushanth K, Raghavan SA, Rath GK, Chaturvedi P, Chandru V, Mathew B, Prabhash K, Gurudath S, Mukhia N, Sunny SP, Mehrotra R, Vivek V, Patil S, Kumar GS, Fasalkar S, Pratima R, Kuriakose MA. Consensus guidelines on management of oral potentially malignant disorders.

- Indian J Cancer. 2022 Jul-Sep;59(3):442-453. doi: 10.4103/ijc.IJC_128_21. PMID: 36412324.
43. da Silva AD, et al. Expression of E-cadherin and involucrin in leukoplakia and oral cancer: an immunocytochemical and immunohistochemical study. *Braz Oral Res.* 2017;31:e19.
44. Nayar R, Wilbur DC. The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol.* 2015 May;123(5):271-81. doi: 10.1002/cncy.21521. Epub 2015 May 1. PMID: 25931431.
45. Ali SZ, Leteurtre E. The official nomenclature and terminologies in diagnostic cytopathology: history, evolution, applicability and future. *Ann Pathol.* 2012 Dec;32(6):e3-7, 389-93. English, French. doi: 10.1016/j.annpat.2012.09.198. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23244483.
46. Udayashankar U, Guduru VS, Ananthaneni A, Ramisetty SD, Kuberappa PH, Namala S. Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. *J Cytol.* 2016 Jul-Sep;33(3):125-129. doi: 10.4103/0970-9371.188047. PMID: 27756983; PMCID: PMC4995868.
47. Nivia M, Sunil SN, Rathy R, Anilkumar TV. Comparative cytomorphometric analysis of oral mucosal cells in normal, tobacco users, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *J Cytol.* 2015 Oct-Dec;32(4):253-60. doi: 10.4103/0970-9371.171241. PMID: 26811574; PMCID: PMC4707788.
48. Patel U, Shah R, Patel A, Shah S, Patel D, Patel A. Effect of tobacco in human oral leukoplakia: a cytomorphometric analysis. *Med Pharm Rep.* 2020 Jul;93(3):273-279. doi: 10.15386/mpr-1439. Epub 2020 Jul 22. PMID: 32832892; PMCID: PMC7418830.

49. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Sep 1;8(9):11884-94. PMID: 26617944; PMCID: PMC4637760.
50. Ettinger KS, Ganry L, Fernandes RP. Oral Cavity Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2019 Feb;31(1):13-29. doi: 10.1016/j.coms.2018.08.002. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30454788.
51. Yuwanati M, Gadbail A, Gondivkar S, Sarode SC, Dande R, Mhaske S, Tekade S, Pathak SK. A systematic scoping review on utility of cytomorphometry in the detection of dysplasia in oral potentially malignant disorders. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020 Oct-Dec;10(4):321-328. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.06.016. Epub 2020 Jul 3. PMID: 32714783; PMCID: PMC7371910.
52. Hosmani JV, Pujari VK, Kotrashetti VS, Nayak RS, Babji DV, Patanshetti SM. Comparison of the Efficacy of Sediment Cytology over Oral Brush Cytology in Oral Leukoplakia. *Acta Cytol.* 2020;64(4):368-374. doi: 10.1159/000503216. Epub 2019 Oct 8. PMID: 31593966.
53. Vyas T, Verma P, Abidullah M, Kushwaha SS, Sahoo PK, Priyadarshini SR, Subudhi SK, Rana V. Quantitative analysis of AgNOR counts and pap stain in exfoliative cytology specimens of oral mucosa in bidi smokers and nonsmokers. *Ann Afr Med.* 2018 Oct-Dec;17(4):210-214. doi: 10.4103/aam.aam_69_17. PMID: 30588935; PMCID: PMC6330784.
54. Salgueiro AP, Martelli FT, D'Ávila SR, Milnikel TR, Koehler-Santos P, Maraschin BJ, da Silva VP, Rados PV, Visioli F. Cytopathological tests for early detection of oral carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev.* 2020 Jan;29(1):73-79. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000513. PMID: 30913094.
55. Singh V, Bhargava M, Varma K, Misra V, Singh R. Evaluation and Quantification of Cytomorphometry in Conjunction with Visual Examination and Exfoliative Cytology

- in Early Diagnosis of Oral Premalignant and Malignant Lesions. *Acta Cytol.* 2021;65(6):522-528. doi: 10.1159/000518582. Epub 2021 Sep 1. PMID: 34515045.
56. Jairajpuri ZS, Rana S, Hajela A, Jetley S. Toward early diagnosis of oral cancer: Diagnostic utility of cytomorphological features, a pilot study. *Natl J Maxillofac Surg.* 2019 Jan-Jun;10(1):20-26. doi: 10.4103/njms.NJMS_12_17. PMID: 31205384; PMCID: PMC6563646.
57. Raman RK, Kamboj M, Narwal A. The Diagnostic Role of Methyl Green-Pyronin Y Staining in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma: An Exfoliative Cytology-Based Cytomorphometric Analysis. *Acta Cytol.* 2019;63(5):401-410. doi: 10.1159/000499623. Epub 2019 May 21. PMID: 31112943.
58. Shaila M, Shetty P, Pai P. A new approach to exfoliative cytology: A comparative cytomorphometric study. *Indian J Cancer.* 2016 Jan-Mar;53(1):193-8. doi: 10.4103/0019-509X.180830. PMID: 27146777.
59. Verma R, Singh A, Badni M, Chandra A, Gupta S, Verma R. Evaluation of exfoliative cytology in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions: A cytomorphometric analysis. *Dent Res J (Isfahan).* 2015 Jan-Feb;12(1):83-8. doi: 10.4103/1735-3327.150339. PMID: 25709680; PMCID: PMC4336977.
60. Navone R, Marsico A, Reale I, Pich A, Broccoletti R, Pentenero M, Gandolfo S. Utilità della citologia esfoliativa orale per la diagnosi di displasia e carcinoma squamoso orale [Usefulness of oral exfoliative cytology for the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma]. *Minerva Stomatol.* 2004 Mar;53(3):77-86. Italian. PMID: 15107778.
61. Santos M de O, Lima FC da S de, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LM de, Cancela M de C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Rev.*

- Bras. Cancerol. [Internet]. 6º de fevereiro de 2023 [citado 5º de novembro de 2023];69(1):e-213700.
62. GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. International Agency for Research on Cancer; 2018 Available from: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations>.
63. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. CA Cancer J Clin. 2002 Jul-Aug;52(4):195-215. doi: 10.3322/canjclin.52.4.195. PMID: 12139232.
64. LEPPER, TATIANA WANNMACHER; Daroit, Natalia Batista ; Oliveira, Marcia Gaiger de; Salgueiro, Arthur Pias ; Visioli, Fernanda ; Rados, Pantelis Varvaki ; Prigol, Renata Ferreira . TESTES DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO PRECOCE DO CÂNCER BUCAL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. Comunicação Científica e Técnica em Odontologia 5. 5ed.: Atena Editora, 2020, v. , p. 70-84
65. Riju J, Tirkey AJ, Vidya K, Agarwal M, Babu M, Kurian R, Paulose A. A Site-Based Analysis of Relationship Between Clinicopathological Factors and Their Influence on Locoregional Recurrence in Oral Squamous Cell Carcinoma. Indian J Surg Oncol. 2023 Sep;14(3):733-741. doi: 10.1007/s13193-023-01750-8. Epub 2023 Apr 27. PMID: 37900650; PMCID: PMC10611655.
66. Chuang SL, Wang CP, Chen MK, Su WW, Su CW, Chen SL, Chiu SY, Fann JC, Yen AM. Malignant transformation to oral cancer by subtype of oral potentially malignant disorder: A prospective cohort study of Taiwanese nationwide oral cancer screening program. Oral Oncol. 2018 Dec;87:58-63. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.10.021. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30527244.
67. Müller S. Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral

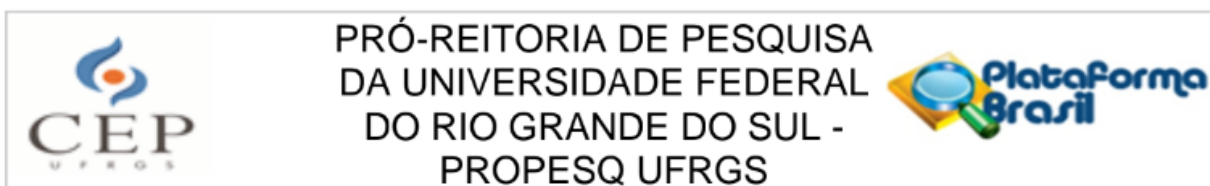
- Radiol. 2018 Jun;125(6):591-602. doi: 10.1016/j.oooo.2018.02.012. Epub 2018 Mar 1. PMID: 29606637.
68. Shanti RM, Tanaka T, Stanton DC. Oral Biopsy Techniques. *Dermatol Clin*. 2020 Oct;38(4):421-427. doi: 10.1016/j.det.2020.05.003. Epub 2020 Aug 10. PMID: 32892851.
69. Raman RK, Kamboj M, Narwal A. The Diagnostic Role of Methyl Green-Pyronin Y
Mishra S, Khurana U, Kapoor N, Joshi A, Joshi D. Evaluation of the
Cytonucleomorphometric Parameters for Cases Diagnosed as Squamous Cell
Abnormality on Conventional Cervico-Vaginal Pap Smears. *J Cytol*. 2023
Jan-Mar;40(1):5-11. doi: 10.4103/joc.joc_73_22. Epub 2022 Dec 26. PMID:
37179967; PMCID: PMC10167830.
70. Paiva, R L. Quantificação das AgNORs em células da mucosa bucal normal
exposta ao fumo e álcool : um estudo citopatológico. [Dissertação]. Porto Alegre:
Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande
do Sul; 2003.
71. Burzlaff JB, Bohrer PL, Paiva RL, Visioli F, Sant'Ana Filho M, da Silva VD, et al.
Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal
cells: a cytohistological study. *Cytopathology*. 2007;18:367–75.
72. Gedoz L, Bohrer PL, Paiva RL, Burzlaff JB, Rösing CK, Sant'Ana Filho M, Rados
PV. Validation of cytopathology as a technique for analysis of epithelial cell
maturation in oral mucosa of smokers and nonsmokers. *Analytical and Quantitative
Cytology and Histology* 2009; 31:96-100.

73. Rajput DV, Tupkari JV. Early detection of oral cancer: PAP and AgNOR staining in brush biopsies. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2010 Jul;14(2):52-8. doi: 10.4103/0973-029X.72501. PMID: 21731263; PMCID: PMC3125060.
74. Skandarajah A, Sunny SP, Gurpur P, Reber CD, D'Ambrosio MV, Raghavan N, James BL, Ramanjinappa RD, Suresh A, Kandasarma U, Birur P, Kumar VV, Galmeanu HC, Itu AM, Modiga-Arsu M, Rausch S, Sramek M, Kollegal M, Paladini G, Kuriakose M, Ladic L, Koch F, Fletcher D. Mobile microscopy as a screening tool for oral cancer in India: A pilot study. *PLoS One.* 2017 Nov 27;12(11):e0188440. doi: 10.1371/journal.pone.0188440. PMID: 29176904; PMCID: PMC5703562.

9. ANEXOS

9. Anexos

9.1. PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Modelo multifatorial e desenvolvimento de ferramenta computadorizada para o monitoramento de lesões potencialmente malignas orais

Pesquisador: Pantelis Varvaki Rados

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 39212420.9.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.678.356

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br

9.2. FICHA EXAME CLÍNICO E TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro participante,

Esta pesquisa, cujo título é: Métodos de Rastreamento na Prevenção do Câncer Bucal será realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e tem como objetivo Avaliar a aplicabilidade clínica de testes de rastreio em pacientes de risco para o câncer bucal.

Se você concordar em participar do estudo, deverá responder um questionário, terá sua boca fotografada, células coletadas de sua boca com uma escova e se tiver lesão em boca, esta será corada com corantes em azul. Os possíveis desconfortos associados à participação neste estudo são aqueles decorrentes da coleta das células bucais, em que a região poderá ficar sensível, dolorida. As áreas coradas com o azul de toluidina poderão ficar coradas por algumas horas, porém a mesma coloração desaparecerá por completo posteriormente. Serão utilizados materiais descartáveis e esterilizados, portanto, sem riscos adicionais. O benefício relacionado à participação neste estudo é o acesso ao monitoramento e diagnóstico de qualquer condição bucal. Além disso, o conhecimento adquirido com este estudo poderá contribuir para melhor entender e prevenir as doenças da boca. Fica assegurado o direito ao sigilo de todas as informações coletadas.

Seu tratamento não será afetado independentemente da sua escolha em participar ou não desta pesquisa. Caso decida participar e depois mude de ideia, basta entrar em contato com o Professor responsável pela pesquisa e solicitar seu desligamento do grupo estudado, continuando assegurada a continuidade de seu tratamento.

Eu, _____ (participante), declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, bem como sei dos meus

direitos e dos deveres dos pesquisadores. Declaro, ainda, que recebi uma cópia deste Termo.

Porto Alegre, ____ de _____ de 201_.

Telefone: _____

O pesquisador responsável por este estudo é Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados e a aluna responsável: Tatiana Wannmacher Lepper, telefone para contato: (51)33083629 do professor responsável.

Observação: o presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentadoras para Pesquisa em Saúde do Conselho Nacional de Saúde (resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma em poder do paciente e a outra da equipe de pesquisadores deste estudo. Esta pesquisa será aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, telefone: 51.33083629

FICHA ENTREVISTA – ANAMNESE

Entrevistador: _____

1. Dados Pessoais

1.1. Número de identificação _____

1.2. Identidade _____

1.3. Endereço _____

1.4. Telefone _____

1.5. Sexo: 1 masc () 2 fem ()

1.6. Qual sua data de nascimento: _____ Qual sua idade _____

1.7. A sua raça ou cor é 1 () branca 2() negra 3() parda 4() amarela 5() indígena

1.8. Você está: 1 () casado 2 () solteiro 3() divorciado 4 () viúvo

1.9: Você é alfabetizado 1 () sim 2() não

1.10. Você estudou até:

1() nunca estudou 2() 1-4 série 3() 5-8 série 4() 2 grau incompleto 5() 2 grau completo

6() superior incompleto 7() superior completo

2. Hábitos de Higiene Bucal

2.1. Com que frequência você escova seus dentes

1() uma vez por semana 2() 2-5 vezes por semana 3() uma vez por dia 4() mais de uma vez por dia 5 () nunca escova

2.2. Você divide a sua escova com outras pessoas 1() sim 2 () não

2.3. O que você usa para limpar seus dentes

1 () nada 2 () palito 3 () fio dental 4() outro _____

2.4. Você usa algum produto para bochecho

1() não 2() sim. Qual? _____ Há quanto tempo? _____

2.5. Com que frequência

1 () uma vez por semana 2 () 2-5 vezes por semana 3() uma vez por dia 4 () mais de

uma vez por dia 5 () nunca usa

2.6. Quando iniciou o uso?

1 () antes 2() depois do diagnóstico de câncer ou de lesão cancerizável

2.7. Quando foi a última vez que você foi ao dentista

1() muitos anos atrás 2 () 1-3 anos atrás 3() menos de 1 ano atrás 4 () não lembra 5 ()
nunca visitou

3. Fatores comportamentais

3.1. Você fuma atualmente 1() sim 2() não 3.2 Tipo_____

3.2 Quantos cigarros por dia _____

3.3 Há quantos anos_____

3.4 Você fumou anteriormente 1 () sim 2() não

3.5 Quantos cigarros por dia_____

3.6 Por quantos anos_____

3.7 Quanto tempo faz que você parou de fumar_____

3.8 Você toma chimarrão 1() frequentemente 2() algumas vezes 3() raramente 4()
nunca

3.9 Você ingere bebidas alcóolicas: 1() frequentemente 2() algumas vezes 3() raramente
4() nunca

3.10 Qual tipo de bebida 1() nenhum 2() cerveja 3() cachaça 4() vinho
5() outros_____

3.11 Quantas doses/copos você ingere por semana _____

4. História Médica

Você tem: Sim Não Não sei

4.1 Diabetes () () ()

4.2 Asma, alergia a alimentos, medicamentos () () ()

4.3 Doença cardíaca ou renal () () ()

4.4. Artrite () () ()

4.5 Outro problema de saúde (HIV,hepatite) () () ()

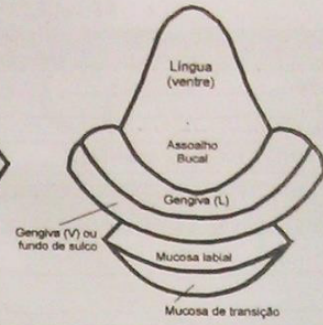
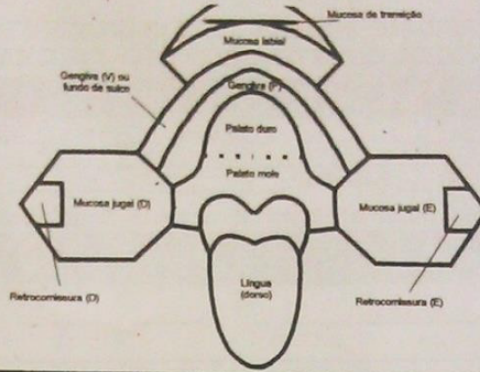
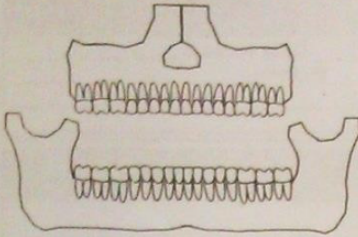
4.6. Você está usando alguma medicação 1 () sim 2 () não

4.7. Qual ? _____

FICHA DE EXAME CLÍNICO

DESENHO LESAO

() tecido mole () intra-ossea



Descrição da lesão / lesões

Lesão	L1	L2	L3
Tamanho (cm)			
Lesão fundamental			
Cor			
Consistência			
Duração			
Tratamento prévio			
Diagnóstico clínico			
Conduta			

Descrição da lesão / lesões

Lesão	L4	L5	L6
Tamanho (cm)			
Lesão fundamental			
Cor			
Consistência			
Duração			
Tratamento prévio			
Diagnóstico clínico			
Conduta			

Exames Complementares/Observações

Data	Descrição (Exame e resultado)

9.3. TÉCNICA DE PAPANICOLAOU MODIFICADO*

- Álcool absoluto por 15 segundos (quatro vezes)
- Água destilada por 15 segundos
- Hematoxilina de Harris com 0,5g de Acido Acético Glacial durante 1 minuto
- Descansar em papel absorvente
- Levar em água corrente e remover somente quando esta tiver aspecto límpido
- Carbonato de Lítio** durante 15 segundos
- Álcool por 15 segundos (aplicar quatro vezes)
- Orange G6 durante 1 minuto com Ácido Fosfotungstico (0,15g/l)
- Descansar em papel absorvente
- Álcool por 15 segundos (por duas vezes)
- Policromo*** durante 3 minutos
- Descansar em papel absorvente
- Álcool por 15 segundos (por três vezes)
- Descansar em papel absorvente
- Xilol por 5 minutos (2x) seguido por Montagem com Bálsamo do Canadá

*Técnica preconizada por Papanicolaou, 1941 e modificada pelo Serviço de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, utilizada pelo Laboratório de Patologia da UFRGS. **

O carbonato de lítio é utilizado para realçar o efeito da hematoxilina. Tal solução é preparada com 5 gramas deste carbonato para 2 litros de água destilada.

** Composição: 200 ml de corante EA36 e 600 ml de corante EA65 (proporção 3:1).

9.4. PROTOCOLO AGNOR - Para 6 lâminas

FIXAÇÃO

- Materiais necessários: lâminas, álcool etílico 99° ou absoluto, frasco para depósito das lâminas.
- Fixar as lâminas em álcool etílico 99° ou absoluto por 30 minutos, caso a técnica seja realizada não imediatamente após a coleta, armazenar as amostras imersas em álcool sob refrigeração entre -5° C a 10° C.

ANTES DE INICIAR A COLORAÇÃO

- Preparar o Falcon envolto com papel alumínio.
- Pegar água deionizada no laboratório.
- Conferir a temperatura da estufa entre 30°C - 32,5°C para receber a câmara escura depois.

HIDRATAÇÃO DAS LÂMINAS

- 1- Hidratar as lâminas em álcool etílico absoluto por 3 minutos.

PÓS-FIXAÇÃO

- 1- Preparar uma mistura na concentração de 1:2 de álcool etílico absoluto e ácido acético.
 - a. 30 ml de álcool absoluto + 15ml de ácido acético.
- 2- Deixar as lâminas mergulhadas na solução por 10 minutos.

PREPARO DA SOLUÇÃO COLÓIDE

- 1- Pegar o frasco de vidro e tarar a balança de precisão.

2- Colocar 0,1g de gelatina.

3- Acrescentar à gelatina 5ml de água deionizada.

4- Aquecer a solução por 12 segundos no micro-ondas e mexer bem até dissolver bem a gelatina.

a. Se necessário, aquecer por mais 3 segundos para dissolver bem a gelatina.

PREPARO DA SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA

1- Pegar o frasco de vidro e tarar sobre a balança.

2- Colocar 5g de nitrato de prata e 10 ml de água deionizada.

3- Mexer bem a solução até não enxergar mais os cristais.

4- Colocar a solução de nitrato de prata no Falcon protegido com papel alumínio, acrescentar à solução colóide.

5- Misturar bem as soluções dentro do Falcon e acrescentar 50ul de ácido fórmico.

6- Fechar o Falcon e deixar na estante sobre a bancada.

a. Atenção! Sempre que for usar as pipetas de precisão, trocar de luva, para evitar a corrosão do nitrato de prata.

LAVAGEM DAS LÂMINAS

1- Após decorrido os 10 minutos na solução de álcool etílico absoluto e ácido acético, lavar as lâminas duas vezes com água deionizada.

PREPARO DA CÂMARA ÚMIDA

1- Colocar água deionizada, em temperatura ambiente, até cobrir o fundo da câmara (camada fina).

2- Retirar o excesso de água que pode ter nas lâminas (sacudir elas um pouco) e colocar sobre as grades.

3- Com uma pipeta, colocar a solução preparada até cobrir completamente as lâminas.

4- Levar a câmara à estufa por 10 minutos junto com o Falcon com o restante de solução que sobrou. Após, abrir para conferir se as lâminas não secaram, se necessário, cobrir as áreas secas com a solução guardada no Falcon dentro da estufa.

5- Após conferir as lâminas, deixá-las por mais 10 minutos na estufa.

a. Elas devem chegar a uma cor de café, um castanho escuro.

b. Se houver muita alteração de temperatura na estufa (abaixo de 30°C, podemos acrescentar o tempo dessa alteração nos minutos finais até atingir a coloração desejada).

c. Nesses últimos 10 minutos, devemos preparar:

- Trocar o xilol na bateria para evitar a contaminação com eosina das demais colorações.
- Conferir se há lamínulas que cubram toda a área desejada mergulhadas no álcool na bateria de montagem.
- Conferir se há água destilada para as lavagens a seguir, se não, pegar mais no laboratório.

LAVAGEM DAS LÂMINAS

1- Retirar as lâminas da estufa após os 20 minutos.

2- Lavar as lâminas duas vezes com água destilada em temperatura ambiente.

- a. Os descartes dessas lavagens da solução de nitrato de prata devem ser descartados no recipiente específico.

DESIDRATAÇÃO DAS LÂMINAS

1- Uma lavagem das lâminas em álcool etílico absoluto.

- a. Só mergulhar elas e já tirar.

CLAREAR DAS LÂMINAS

1- Retirar as lâminas do álcool etílico absoluto e mergulhar uma vez no álcool.

- a. Devemos ter a visualização de uma cor acastanhada clara.
- b. Se perceber a presença de muitos “rastros” do nitrato de prata, mergulhar mais uma vez.

MONTAGEM DAS LÂMINAS

1- Secar bem as lamínulas que serão usadas com a gaze.

2- Retirar a lâmina do mergulho no xilo.

- a. Uma por vezes, deixamos as outras no frasco fechado e vazio do banho de álcool.

3- Colocar uma gota de Entellan no centro da lâmina úmida.

4- Colocar a lamínula em 45°C na ponta da lâmina e, com o auxílio da pinça, ir cobrindo a lâmina com ela.

- a. Para retirar possíveis bolhas, pressione levemente a área com a pinça.

5- Aguardar a secagem das lâminas.

- a. De 10 a 15 minutos.
- b. Com gaze e xilol, retirar possíveis extravasamentos do Entellan.
 - i. Garantir que as lâminas estejam bem secas antes de manipulá-las, pois pode prejudicar a imagem.

CAPTURAS

- 1- Pegar no laboratório o óleo de imersão, algodão e álcool isopropílico.
- 2- Ligar a régua, o computador, o microscópio e a câmera.
- 3- Colocar a objetiva de 100x e ajustar o feixe no máximo 1.25.
- 4- Colocar a lâmina na bandeja.
- 5- Após as capturas, limpar a objetiva com algodão úmido com álcool isopropílico.

9.6. Artigo publicado: A CNN-based approach for joint segmentation and quantification of nuclei and NORs in AgNOR-stained images.

Rönnau MM, Lepper TW, Amaral LN, Rados PV, Oliveira MM.

Comput Methods Programs Biomed. 2023 Dec;242:107788. doi: 10.1016/j.cmpb.2023.107788. Epub 2023 Sep 7.

PMID: 37738838.