



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA  
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

RODRIGO DE FREITAS LIMA RODRIGUES

***Patologia Digital: Análise de Imagem das Características  
Morfométricas Nucleares do Carcinoma Urotelial Não Músculo-  
Invasivo de Alto Grau - Diagnóstico e Recidiva***

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE ANATOMIA PATOLÓGICA

Trabalho realizado sob a orientação de:  
PROFESSOR DOUTOR VÍTOR MANUEL LEITÃO DE SOUSA  
DR. RUI JORGE GONÇALINHO DE ALMEIDA

MARÇO/2023



*Patologia Digital: Análise de Imagem das Características  
Morfométricas Nucleares do Carcinoma Urotelial Não Músculo-  
Invasivo de Alto Grau - Diagnóstico e Recidiva*

Rodrigo Rodrigues<sup>1</sup>; Rui Jorge Almeida<sup>1,2</sup>, MD; Vítor Manuel Sousa<sup>1,2</sup>, MD, PhD

1. Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal
2. Serviço de Anatomia Patológica, Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, Portugal

## Índice

Resumo.....	5
<i>Abstract</i> .....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	9
Resultados.....	11
Discussão.....	15
Conclusão.....	18
Agradecimentos.....	19
Referências Bibliográficas.....	20
Material Suplementar.....	22

## Resumo

**Introdução:** O cancro da bexiga permanece como o sexto mais prevalente na população masculina a nível mundial. As técnicas de *Whole-Slide-Imaging* (WSI) e de análise de imagem já demonstraram grande utilidade noutras patologias, como por exemplo o cancro da mama. Desta forma pretendeu-se aplicar estas tecnologias ao carcinoma urotelial não músculo-invasivo da bexiga (NMIBC), no sentido de pesquisar associações entre as características morfométricas nucleares e o tipo histopatológico das neoplasias (carcinoma in situ e carcinoma urotelial papilar de alto grau), o estadio (pTis/pTa/pT1) e a taxa de recidiva.

**Material e Métodos:** Foram selecionados 55 doentes diagnosticados com NMIBC no Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, entre 2014 e 2017. De cada doente foi selecionada uma lâmina corada com Hematoxilina-Eosina (HE), representativa da neoplasia. Efetuou-se a digitalização das lâminas através do sistema *Aperio Image Software*, e aplicou-se um algoritmo de análise de imagem para análise dos parâmetros morfométricos nucleares. Os parâmetros obtidos foram os seguintes: dimensão nuclear média, densidade nuclear, média de intensidade vermelho-verde-azul (RGB) nuclear e média de intensidade positiva. Foram posteriormente correlacionados com os dados anatomo-clínicos dos doentes, nomeadamente diagnóstico histológico, recorrência e estadiamento.

**Resultados:** Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os parâmetros morfométricos, dimensão nuclear média, densidade nuclear, média de intensidade RGB nuclear e média de intensidade positiva, com o diagnóstico ( $p=0,383$ ;  $p=0,585$ ;  $p=0,251$ ;  $p=0,711$ ). Também não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os referidos parâmetros e a recorrência ( $p=0,855$ ;  $p=0,854$ ;  $p=0,935$ ;  $p=0,333$ ) ou o estadiamento ( $p=0,171$ ;  $p=0,847$ ;  $p=0,222$ ;  $p=0,491$ ).

**Discussão:** Apesar de não se ter verificado uma associação estatisticamente significativa nos parâmetros analisados, observou-se uma associação entre o estadio e os parâmetros, densidade nuclear e média de intensidade positiva. Este estudo apresentou algumas limitações que poderão ter contribuído para a ausência de associação com significado estatístico. Entre as quais contam-se, amostra de baixas dimensões, lâminas HE provenientes apenas de um laboratório e otimização do *software* de análise de imagem, na medida em que não foi desenvolvido para aplicação em lâminas de HE, mas sim de imuno-histoquímica, em tecido mamário.

**Conclusão:** Este trabalho procurou contribuir para o conhecimento e desenvolvimento de aplicações das novas tecnologias de análise de imagem e de inteligência artificial na Medicina, e em concreto na Anatomia Patológica e no NMIBC.

**Palavras-Chave:** *Carcinoma Urotelial; Patologia Digital; Análise de Imagem.*

## **Abstract**

**Introduction:** Bladder cancer remains as the sixth most prevalent in male population worldwide. Both *Whole-Slide-Imaging* (WSI) and image analysis have already shown a great deal of usefulness in other pathologies, for example in breast cancer. With this in mind, the aim of this study was to apply these same technologies in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC), in order to search for correlations between its morphological nuclear features and its histological classification (carcinoma in situ and high-grade papillary urothelial carcinoma), stage and recurrence rate.

**Material and Methods:** 55 patients previously diagnosed with NMIBC in Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, between 2014 and 2017 were selected. From each patient, one hematoxylin-eosin (HE) stained slide, representative of the neoplasm, was selected. The slides were subsequently scanned using *Aperio Image Software* and the nuclear features were analyzed using an algorithm-based image analysis tool. The following parameters were obtained: average nuclear size, nuclear density, average nuclear red-green-blue (RGB) intensity and average positive intensity. The aforementioned parameters were then correlated with clinicopathological data, namely histological diagnostic, recurrence and staging.

**Results:** There was no statistically significant association between the morphological parameters, average nuclear size, nuclear density, average nuclear RGB intensity and average positive intensity, and the diagnosis ( $p=0,383$ ;  $p=0,585$ ;  $p=0,251$ ;  $p=0,711$ ). There were also no statistically significant differences between the aforementioned parameters and recurrence ( $p=0,855$ ;  $p=0,854$ ;  $p=0,935$ ;  $p=0,333$ ) or staging ( $p=0,171$ ;  $p=0,847$ ;  $p=0,222$ ;  $p=0,491$ ).

**Discussion:** Even though no statistically significant association was found, an association was observed between the stage and the parameters of nuclear density and average positive intensity. This study had some limitations that may have contributed to the absence of association with statistical significance. Among the most important are, a sample of low dimensions, HE stained slides obtained from a single source-laboratory and an image analysis software optimized for application in immunohistochemistry of breast tissue, instead of HE stained slides.

**Conclusion:** This study sought to contribute to the knowledge and development of applications for these new technologies of image analysis and artificial intelligence in Medicine, and particularly in Pathology and NMIBC.

**Keywords:** *Urothelial Carcinoma, Digital Pathology, Image Analysis.*

## Introdução

De acordo com o *Global Cancer Observatory* da Organização Mundial de Saúde (OMS) [1], o cancro da bexiga é o sexto mais prevalente a nível mundial na população masculina e décimo na população geral. A incidência mundial de cancro da bexiga por 100.000 habitantes é respetivamente de 9.5 e 2.4 em homens e em mulheres, no entanto na europa esta incidência sobe para 20 e 4.6. Esta diferença estatística pode ser justificada na forma de como cada país efetua o registo, rastreio diagnóstico e tratamento deste tipo de cancro, bem como os respetivos cenários ambientais e económicos em que cada um destes se encontra. [2]

De especial destaque é o facto de cerca de 75% dos casos de cancro da bexiga serem carcinomas uroteliais vesicais não músculo-invasivos (NMIBC), isto é, confinados à mucosa (Ta/Tis) ou submucosa (T1) [2], comparativamente aos estádios mais avançados (T2-4). Uma das razões apontadas para esta diferença de prevalência, é o facto de nos estádios iniciais, o cancro da bexiga associar-se a um tempo de sobrevida superior e uma taxa de mortalidade inferior. [1, 2]

Dada a elevada discrepância entre as taxas de prevalência, recorrência e de sobrevivência [3] verificada entre os tumores que não invadem a camada muscular da bexiga, o músculo detrusor, (Ta, Tis e T1) e os tumores músculo-invasivos, existem *guidelines* específicas para cada um destes dois grupos. [4, 5]

Do ponto de vista clínico, um tumor músculo-invasivo requer tipicamente como tratamento base uma cistectomia radical com quimioterapia adjuvante/neoadjuvante, dependendo do estadiamento tumoral [5]. Um NMIBC requererá habitualmente uma ressecção trans-uretral (RTU), que por sua vez deverá ser seguida por tratamento adjuvante intra-vesical (bacilo Calmette-Guerin e outros). A duração, frequência e o tipo de tratamento pós-operatório deverá ser decidido de acordo com o grupo de risco em que o doente se enquadra, de acordo com as orientações europeias de urologia [4]. Este tipo de tratamento pós-RTU, terá como objetivo, prevenir recorrências. Os tumores não músculo-invasivos, apesar de apresentarem um prognóstico geralmente favorável, apresentam uma taxa de recorrência que pode chegar aos 70% [6], por esta razão, deve ser realizado um seguimento clínico com estudos periódicos, de forma a prevenir a recidiva e a progressão de novos tumores.

O método de rastreio e vigilância de eleição é a cistoscopia com lavagem vesical e colheita para citologia urinária, que deverá ser sempre realizada 3 meses após uma RTU, dado que os resultados obtidos a partir deste procedimento é um indicador impactante para o prognóstico e progressão da doença. Apesar de existirem outros métodos de vigilância não invasivos, como citologia urinária de urina de micção ou a utilização de biomarcadores urinários, nenhuma destas opções é ainda capaz de substituir por completo a cistoscopia como método de rastreio, vigilância ou de diagnóstico. [5, 7, 8]

Com o aparecimento de máquinas digitalizadoras de lâminas por volta dos anos 2000, o conceito de *Whole-Slide-Imaging* (WSI) tem vindo a tornar-se cada vez mais prevalente. Através do WSI é possível digitalizar na totalidade lâminas histológicas e citológicas, permitindo desta forma a sua observação através de um ecrã de computador, da mesma forma que o faríamos com recurso a um microscópio ótico. Este avanço tecnológico veio a trazer uma série de benefícios no ramo da educação, diagnóstico médico e investigação [9]. Existe um alargado número de programas de análise de imagem, através dos quais é possível anotar, selecionar e efetuar medições de determinadas regiões da lâmina para posterior processamento por um também vasto número de algoritmos computacionais, com diversas funções, como deteção de biomarcadores ou deteção e aquisição de parâmetros morfométricos nucleares de uma determinada região da lâmina, nomeadamente área, densidade ou excentricidade nucleares. A principal vantagem no uso destas técnicas de análise de imagem reside na sua capacidade de processar a região histológica e produzir uma grande quantidade de dados de forma estandardizada e eficiente, minimizando os vieses de subjetividade e variabilidade presentes aquando avaliação histopatológica convencional por parte do patologista. [10]

Estas técnicas de análise de imagem encontram-se a ser empregues em vários domínios de investigação, nomeadamente no cancro da mama, na fibrose hepática, asma pulmonar e aterosclerose. [11-14]

De acordo com a Associação Europeia de Urologia todos os carcinomas uroteliais músculo-invasivos são considerados de alto grau [5]. A 5ª edição da *Classification Of Tumours: Urinary And Male Genital Tumours* da OMS é mais conservadora nesta associação e refere que a maior parte dos carcinomas uroteliais invasivos são de alto grau [15]. A OMS refere também que um carcinoma urotelial de alto grau histológico difere de um carcinoma urotelial de baixo grau histológico de acordo com o seu grau de pleomorfismo nuclear, variabilidade da dimensão e forma, contorno irregular e diferentes graus de hiper cromasia nuclear, entre outros parâmetros. [15]

Em 2017, num artigo publicado na revista *Oncology Letters* [16], observou-se uma diferença significativa em certos parâmetros morfométricos nucleares, recolhidos através de uma ferramenta de análise de imagem, entre o carcinoma urotelial invasivo e o carcinoma urotelial não invasivo de baixo grau. Mostrando desta forma o potencial da tecnologia de análise de imagem digital na dinamização do processo de diagnóstico e estadiamento histológico.

Deste modo, neste estudo procurou-se utilizar a eficiência e estandardização de um programa de análise de imagem digital para avaliar as características morfométricas dos núcleos das células neoplásicas em carcinomas uroteliais *in situ* (CIS) e carcinomas uroteliais papilares de alto grau (CUPAG), e verificar se existe alguma correlação entre estas características e a



taxa de recorrência observada, bem como aferir se os parâmetros morfométricos diferem entre os dois grupos histológicos e entre os diferentes estadios (pTis/pTa/pT1).

## **Material e Métodos**

No sentido de testar estas hipóteses, foram selecionados doentes do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) submetidos a ressecção transuretral vesical (RTU-V), com diagnóstico anatomopatológico de carcinoma urotelial papilar de alto grau ou de carcinoma urotelial in situ, durante um período de três anos (01/02/2014 a 01/02/2017). O período de estudo foi definido de forma a ser possível obter um período de seguimento de pelo menos cinco anos.

O projeto foi submetido para avaliação à Comissão de Ética do CHUC, identificado com a referência interna PI OBS.SF.226-2021, tendo obtido o parecer favorável a 19/01/2022 e posterior autorização do Conselho de Administração, com dispensa do consentimento informado. Todo o processo de recolha de informação foi efetuado de acordo com as normas éticas, tendo sido garantido o direito à privacidade e a proteção de dados pessoais.

Os doentes foram selecionados a partir dos registos informatizados do Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do CHUC, usando como critérios de pesquisa a codificação presente na 10ª edição da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (ICD-10). Os códigos utilizados na pesquisa foram os códigos referentes à localização topográfica da bexiga (C67.9) e morfológicos para carcinoma urotelial papilar (M.8130.2 e M.8130.3) e para carcinoma urotelial in situ (M.8120.2).

Foram inicialmente identificados 62 exames anatomopatológicos com os referidos diagnósticos, referentes a 62 doentes diferentes.

Após a identificação dos casos de interesse, foi realizada o levantamento dos antecedentes clínico-patológicos e dos dados biológicos, como o género e a idade ao diagnóstico.

Da amostra inicial foram excluídos sete doentes (Tabela 1). Excluiu-se um doente com 9 diagnósticos prévios ao do exame anatomopatológico identificado. Este caso foi excluído por ter sido considerado pelos autores que poderia tratar-se de um caso excecional, dado o elevado número de recorrências, comparativamente a todos os restantes casos da amostra. Excluíram-se dois doentes com pelo menos um diagnóstico prévio de carcinoma urotelial com estadiamento superior a T1 (com invasão da túnica muscular própria ou superior), de acordo com a classificação TNM aprovada pela *Union International Contre le Cancer* (UICC) (8ª edição). [17]

Foram também excluídos dois doentes com diagnóstico prévio de carcinoma urotelial papilar, cujo cálculo de recorrência a 1 ou 5 anos para carcinomas uroteliais não músculo-invasivos, efetuado através do modelo de classificação de 2006 da *European Organisation for Research*

and Treatment of Cancer (EORTC), foi superior a 50% (<https://www.omnicalculator.com/health/eortc-bladder-cancer>). O modelo baseia-se nos seguintes parâmetros: número de tumores presentes (aquando realização de ressecção transuretral), diâmetro do maior tumor (maior ou menor que 3cm), taxa de recorrência prévia (tumor primário / menos de 1 recorrência por ano / mais de 1 recorrência por ano), estadió da doença (Ta/T1), presença concomitante de CIS e grau histológico do tumor (G1/G2/G3).

Foi definido o *cut-off* de 50% por ser o risco médio de recidiva para o carcinoma urotelial papilar a cinco anos. [18]

De cada exame anatomopatológico foi selecionada uma lâmina de histopatologia corada com hematoxilina-eosina (HE), representativa da neoplasia.

As lâminas obtidas foram digitalizadas através do digitalizador *Aperio CS2*. Tendo sido obtidos dois grupos de imagens de especificações diferentes. No primeiro grupo (48) as lâminas foram digitalizadas através da lente 40x numa resolução de aproximadamente 0.25  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ . No segundo grupo (7) foi utilizada uma lente de 20x e a resolução de imagem obtida terá sido aproximadamente 0.50  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ .

Foram excluídos mais dois doentes, devido à baixa qualidade de imagem obtida da lâmina digitalizada, que impossibilitou a sua avaliação por parte do *software* de análise de imagem.

Tabela 1: Resumo de doentes excluídos do estudo.

Motivo de exclusão	Nº de casos
Elevado nº de diagnósticos prévios em relação à restante amostra	1
≥1 Diagnóstico Prévio superior a T1	2
Cálculo (EORTC) de recorrência a 5 anos >50%	2
Baixa qualidade de imagem após WSI	2
<u>Total</u>	7

De seguida, sempre que possível, foram selecionadas 40 áreas de tumor com forma retangular de 500x500pixel para as lâminas com resolução  $\approx 0.25 \mu\text{m}/\text{pixel}$  e de 250x250 pixel para as restantes com resolução  $\approx 0.50 \mu\text{m}/\text{pixel}$  (obtendo desta forma áreas de aproximadamente 15000-16000  $\mu\text{m}^2$ ). Em lâminas de CUP, 20 destas anotações encontravam-se em regiões de base tumoral e as restantes 20 em áreas de eixo, quando a lâmina não apresentava base ou eixo, foram delimitadas apenas 20 regiões para análise. Nas lâminas de CIS, sempre que possível, foram selecionadas 40 regiões tumorais nas mesmas especificações de área e formato que o grupo de CUP. Nas lâminas em que as dimensões das regiões tumorais eram incompatíveis com o método de delimitação retangular definido ou

naquelas em que a área tumoral disponível para análise era insuficiente, as áreas analisadas terão sido delimitadas de forma manual com recurso à ferramenta de desenho.

As áreas de interesse foram selecionadas através do programa Aperio ImageScope (v12.4.6.5003), de seguida foi executado o algoritmo de análise de imagem sobre as referidas áreas de interesse. O algoritmo em questão foi desenvolvido para avaliação de técnicas de imuno-histoquímica com os anticorpos recetores de progesterona e recetores de estrogénio, aplicados a lâminas digitalizadas com carcinoma da mama.

Foram obtidas as seguintes categorias para análise estatística: dimensão nuclear média ( $\mu\text{m}^2$ ); densidade nuclear (núcleos/ $\mu\text{m}^2$ ); média de intensidade vermelho-verde-azul (RGB) nuclear e média de intensidade positiva. Sendo que os dois últimos parâmetros têm por objetivo quantificar de forma indireta o grau de hiper cromasia nuclear, na coloração de hematoxilina.

O estudo estatístico foi elaborado com recurso ao programa de análise estatística SPSS, versão 28.01.0.

## Resultados

Na Tabela 2 estão presentes alguns dados referentes às características clinico-patológicas dos pacientes selecionados para estudo. Na secção de materiais suplementares, estão disponíveis gráficos caracterizadores da amostra. Foi realizado um total de 1681 anotações, com caracterização de 132 875 núcleos neoplásicos, em 55 WSI, representativas de carcinomas uroteliais não músculo-invasivos da bexiga, pertencentes a 55 doentes diferentes.

Na Figura 1 encontra-se exemplificado o processo de anotação e de análise de imagem através do Aperio ImageScope numa das lâminas estudadas, a partir das quais foram extraídas as características morfonucleares das células tumorais.

A estatística descritiva dos quatro parâmetros morfológicos, obtidos no programa de análise de imagem, encontra-se na Tabela 3.

**Tabela 2:** Características clinico-patológicas dos pacientes com carcinoma urotelial.

Parâmetro	Nº de casos (%)
<b>Total</b>	55 (100%)
<b>Idade</b>	
≤65	12 (21,8%)
>65	43 (78,2%)
<b>Sexo</b>	
Masculino	45 (81,2%)
Feminino	10 (18,2%)
<b>Diagnóstico</b>	
CIS	17 (30,9%)
CUPAG	38 (69,1%)
<b>Estadiamento</b>	
pTis	17 (30,9%)
pTa	27 (49,1%)
pT1	11 (20%)
<b>Com Recidiva Posterior</b>	
Sim	12 (21,8%)
Não	43 (78,2%)
pTis, carcinoma <i>in situ</i> ; pTa, carcinoma papilar não invasivo; pT1 carcinoma com invasão da lâmina própria	

Foi determinado o tipo de distribuição de cada uma das variáveis através de um teste de Shapiro-Wilk e de acordo com a normalidade das variáveis, foram implementados os testes de T student e Anova para variáveis com distribuição normal e testes de U de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para variáveis que não seguem uma distribuição normal.

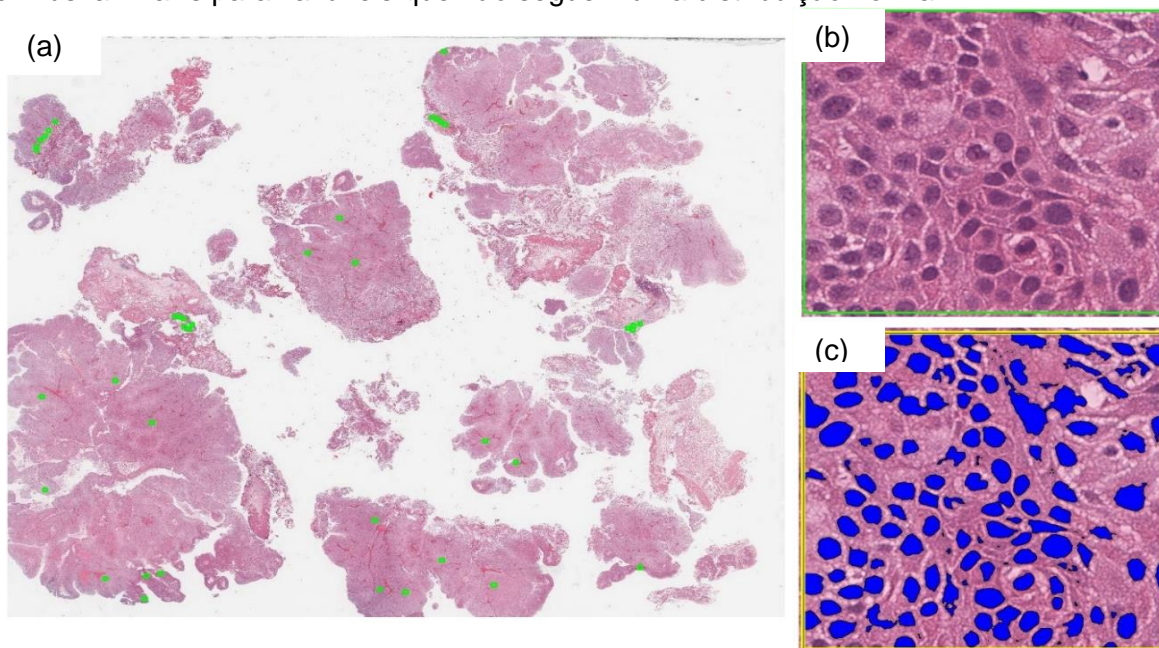


Figura 1: Processo de extração das características nucleares. (a) Lâmina original de hematoxilina e eosina digitalizada e anotada a verde. (b) Anotação contendo área de interesse (500x500 pixel). (c) Núcleos destacados automaticamente pelo algoritmo de análise de imagem.

Tabela 3: Estatística descritiva para os parâmetros de dimensão nuclear média ( $\mu\text{m}^2$ ); densidade nuclear (núcleos/ $\mu\text{m}^2$ ); média de intensidade RGB nuclear e média de intensidade positiva.

	Dimensão nuclear média ( $\mu\text{m}^2$ )	Densidade nuclear (núcleos/ $\mu\text{m}^2$ )	Média de intensidade positiva	Intensidade RGB nuclear média
<u>Média</u>	78,297502	,00468901067	203,58151	132,190031
<u>Mediana</u>	66,754500	,00462214549	204,00000	133,107000
<u>Erro Desvio</u>	41,1138806	,00121182489	2,450443	17,7395746
<u>Percentis</u>				
25	56,355900	,00396183899	201,66700	117,183000
50	66,754500	,00462214549	204,00000	133,107000
75	95,693000	,00547089211	205,97900	144,164000
<u>Shapiro-Wilk (valor p)</u>	<0,001	0,889	0,011	0,612

Através do teste de Shapiro-Wilk, determinou-se que as variáveis dimensão nuclear média e média de intensidade positiva possuíam uma distribuição normal ( $p < 0,05$ ) e que as variáveis densidade nuclear e intensidade RGB nuclear média apresentavam uma distribuição não normal ( $p \geq 0,05$ ). Neste teste, o parâmetro da idade obteve uma distribuição normal ( $p < 0,001$ ). Os histogramas referentes aos parâmetros referidos encontram-se disponíveis na secção de materiais suplementares.

De modo a despistar variáveis confundentes, efetuou-se um teste t student que determinou não existir correlação entre a idade dos doentes e o diagnóstico estabelecido (CUP/CIS), obtendo-se um valor  $p = 0,340$ .

Com o intuito de correlacionar os parâmetros nucleares obtidos e o diagnóstico, foi realizado o teste T para pesquisar diferenças entre a variável diagnóstico (CUP/CIS) e a variável dimensão nuclear média, tendo-se verificado que não existiam diferenças significativas entre a média da dimensão nuclear média entre o grupo dos doentes com CUP e CIS ( $p = 0,383$ ). Da mesma forma, o teste T não demonstrou diferenças significativas entre a média da média de intensidade positiva entre o grupo dos doentes com CUP e CIS ( $p = 0,711$ ). O teste de Mann-Whitney também não evidenciou diferenças significativas entre a mediana das características nucleares de distribuição não normal (densidade nuclear e intensidade RGB nuclear média) entre o grupo dos doentes com CUP e CIS ( $p = 0,585$  e  $p = 0,251$  respetivamente).

Não foi evidenciada relação entre os parâmetros morfonucleares e o risco de recidiva, tendo-se obtido um valor  $p = 0,855$  e  $p = 0,333$  no teste T para a dimensão nuclear média e média de intensidade positiva respetivamente, bem como um valor  $p = 0,854$  e  $p = 0,935$  no teste de Mann-Whitney para a densidade nuclear média e intensidade RGB nuclear média, respetivamente.

Com intuito de identificar associações entre os parâmetros morfométricos nucleares e o estadiamento (pTis/pTa/pT1), foi efetuado um teste de Anova, cujo resultado acabou por não demonstrar diferenças significativas para a dimensão nuclear média ( $p = 0,171$ ) ou para a média de intensidade positiva ( $p = 0,491$ ). Os gráficos de linhas (Figura 1 e Figura 2), demonstram a distribuição destes parâmetros em relação ao estadiamento. Foi também efetuado um teste de Kruskal-Wallis, que revelou não existirem diferenças significativas entre as características nucleares de distribuição não normal (densidade nuclear e intensidade RGB nuclear média) nos grupos de doentes com estadiamentos diferentes ( $p = 0,847$  e  $p = 0,222$  respetivamente).

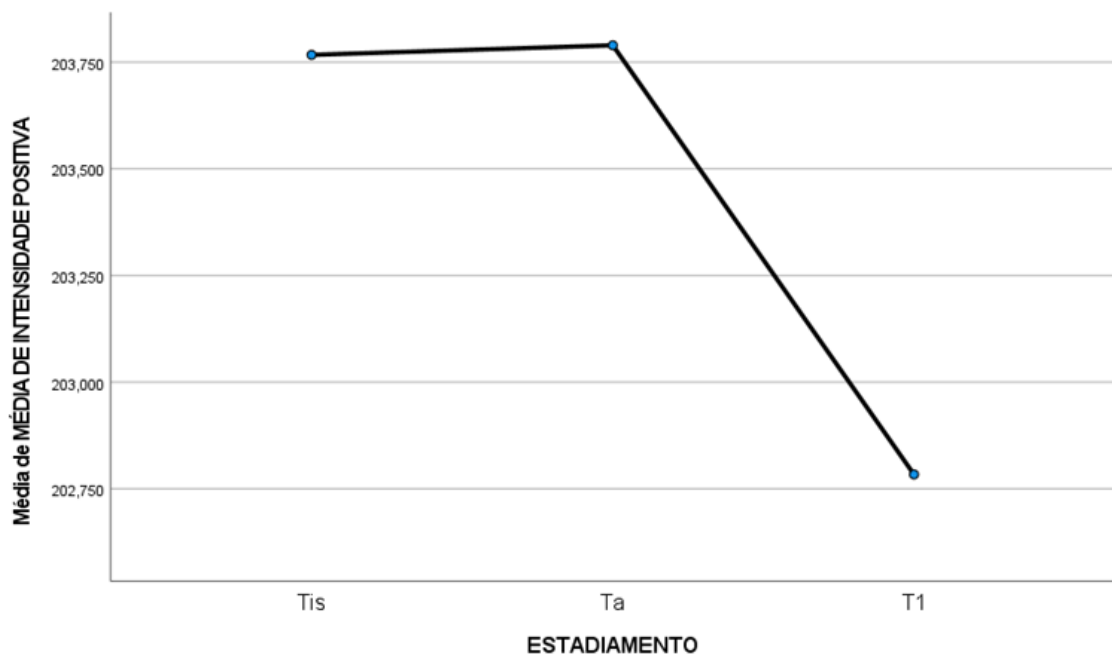


Figura 2: Distribuição da média de intensidade positiva nos diferentes estadiamentos

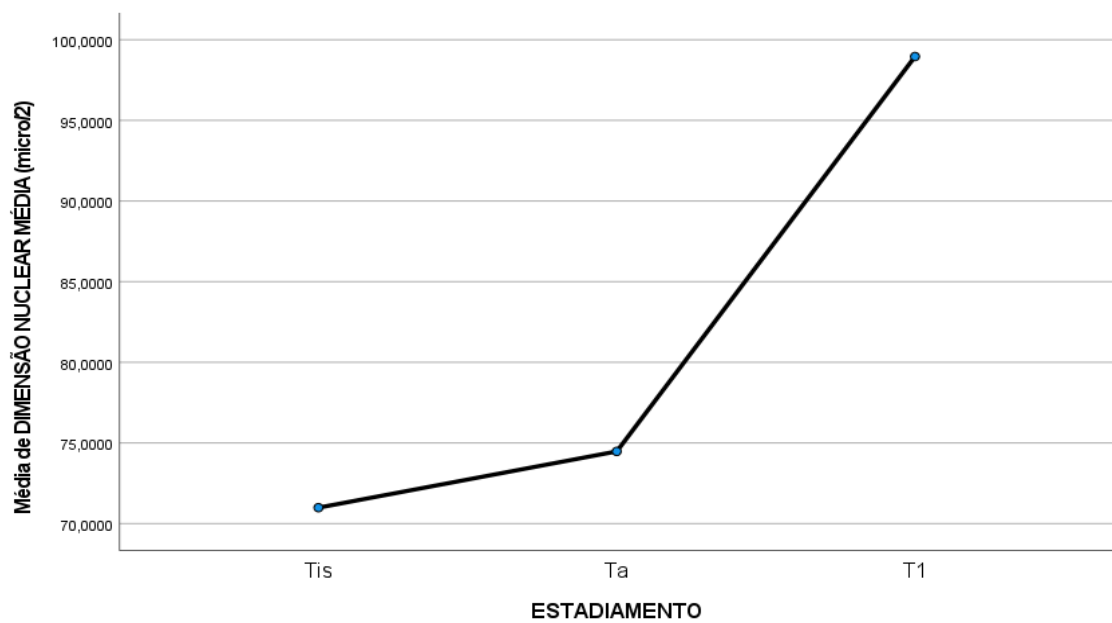


Figura 3: Distribuição da dimensão nuclear média nos diferentes estadiamentos

## Discussão

Neste estudo, testaram-se três hipóteses: (1) existência de diferenças entre as características morfológicas nucleares e o tipo histológico de NMIBC (CIS e CUPAG), (2) existência de associação entre as características morfológicas nucleares e o estadiamento do NMIBC e (3) existência de associação entre as características nucleares das células neoplásicas do NMIBC, com o seu risco de recidiva.

Existem outros trabalhos, na mesma área de estudo, nos quais, através do WSI e dos programas de análise de imagem foi possível encontrar associações entre certas características nucleares e outros tipos histológicos e evolução subsequente. Por exemplo, Poropatich *et al* [19] revelou que certos parâmetros morfométricos nucleares do CIS podem ser diferenciados de um epitélio com atipia reativa de forma consistente, tendo sido demonstrado com maior evidência que é possível utilizar os parâmetros de comprimento e largura nuclear para distinguir estes dois tipos histológicos através de um cut-off com alta especificidade e sensibilidade. Num outro estudo referido anteriormente [16], foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros de densidade nuclear média e nos desvios padrão de área nuclear, de diâmetro nuclear mínimo e máximo e de densidade nuclear média entre os casos com carcinoma urotelial invasivo e os casos de carcinoma urotelial papilar de baixo grau com valores p de 0.0093, 0.0001, 0.0020, 0.0009 e 0.0079, respetivamente.

Neste estudo foram analisadas as variáveis morfológicas, dimensão nuclear média ( $\mu\text{m}^2$ ), densidade nuclear (núcleos/ $\mu\text{m}^2$ ), a intensidade RGB nuclear média e a média de intensidade positiva. Estes parâmetros morfológicos foram avaliados quanto à sua correlação com o tipo de NMIBC, com o intuito de analisar a possibilidade da sua integração em eventuais algoritmos de análise de imagem, para diagnóstico e classificação do CIS e/ou CUPAG. De acordo com os resultados obtidos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as características nucleares dos tumores de CIS e CUPAG. Este resultado está em concordância com a descrição histopatológica nuclear de ambos os tipos histológicos, presentes na 5ª edição de *WHO classification of tumours: urinary and male genital tumours* [15] que descreve da mesma forma tanto os núcleos do CIS como os do CUPAG. Adicionalmente, apesar de não terem sido encontradas correlações com significado estatístico entre os parâmetros morfológicos dos diferentes estadios tumorais (pTis/pTa/pT1), é possível observar uma associação entre o estadio e os parâmetros de média de intensidade positiva e dimensão nuclear média, respetivamente nas Figuras 2 e 3.

Na Figura 2 identifica-se uma associação das neoplasias no estadio T1 com menor média de intensidade positiva das células tumorais. Uma hipotética explicação para este acontecimento, reside no facto de, tendo em conta que se trata de um estadio mais avançado, os núcleos das

células neoplásicas poderão apresentar-se mais vesiculosos, com menor condensação da cromatina, possivelmente promovendo transcrição proteica mais eficaz e necessária à ação infiltrativa, característica de um tumor em estádios mais avançados. Considerando que o *software* de análise de imagem foi desenvolvido para medir o grau de intensidade do cromogéneo castanho utilizado na imuno-histoquímica, a presença de núcleos mais vesiculosos e com coloração no espectro do roxo ou violeta presente na HE, poderá ser uma eventual explicação para o menor grau de cromasia nuclear no estadio T1.

Na Figura 3, consegue observar-se maior dimensão nuclear média no estadio T1, comparativamente aos estádios Tis e Ta. Esta associação está também de acordo com o que seria espectável para um tumor de estadio mais avançado.

Ambas as associações já foram referidas previamente por Kosuge N. e colegas, num trabalho publicado em 2017, e já mencionado anteriormente [16]. No referido estudo, foi observado que o grupo de estadio T1 e T2 apresentava uma “densidade nuclear média” (parâmetro utilizado como quantificador de hiperchromasia nuclear) superior (com significado estatístico,  $p=0.0079$ ) ao grupo de tumores com estadio Ta [16]. Em relação à segunda associação, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o parâmetro de área nuclear média, nos grupos de estadio T1 e T2 e de estadio Ta [16]. No entanto, verificou-se que este primeiro grupo apresentava um desvio padrão de área nuclear superior ( $p=0.0001$ ) ao do segundo grupo [16]. É importante efetuar a ressalva de que os tumores no estadio Ta neste estudo eram de baixo grau histológico [16], ao contrário do ocorrido no presente trabalho.

Nesta amostra também não se identificou correlação entre as características nucleares do CIS e CUPAG com o risco recidiva. Deste modo, de acordo com os dados obtidos, não é possível aferir acerca da probabilidade de um doente, previamente diagnosticado com CIS ou CUPAG, vir a ter uma nova recorrência, através dos parâmetros morfométricos nucleares do tumor prévio.

As técnicas de análise de imagem, quando combinadas entre si, são capazes de extrair um número superior de características morfológicas com maior precisão em comparação ao emprego de uma só técnica de análise de imagem. A volumosa quantidade de dados e categorias de caracterização morfológica obtidas através deste processo poderá ser posteriormente alimentada a um algoritmo de *deep learning*, especializado em reconhecer padrões dentro dos dados fornecidos, para posteriormente ser capaz de prever, com alta sensibilidade e especificidade, a que grupo um determinado caso irá pertencer. Em 2021, foi publicado na Revista *Modern Pathology* o trabalho de N. Tokuyama *et al* [20] em que foram combinadas várias tecnologias de análise de imagem para extrair, individualizar (com recurso ao *software* “ilastik” e ao algoritmo de *deep learning* “YOLOv3”, respetivamente) e efetuar a medição de mais de 900 características nucleares (desde a caracterização dos contornos



nucleares até ao padrão e textura intra-nuclear) em amostras de NMIBC (através do programa “CellProfiler”) previamente digitalizadas a partir de lâminas histológicas. Todos estes dados foram posteriormente fornecidos a dois modelos algorítmicos de *machine learning* (“support vector machine” e “random forest”) que, após uma fase de treino, foram capazes de prever com base nas características morfológicas nucleares, a recorrência a 2 anos após ressecção transuretral com 90% e 86.7% de probabilidade, respetivamente.

Desta forma, o estudo mencionado anteriormente, demonstra algumas das limitações do presente trabalho, por exemplo, o facto de as anotações de carcinoma urotelial obtidas não terem sido tratadas por nenhum outro programa de análise digital de modo a seleccionar apenas os núcleos e aprimorar a sua respetiva qualidade de imagem, antes de efetuar a medição das características morfológicas nucleares. Para além disto, o facto de o *software* de análise de imagem utilizado, apenas caracterizar os núcleos em 4 categorias diferentes, bem como o facto de se encontrar otimizado para outro tipo de tecido e para imuno-histoquímica, constituem fatores que conferem uma menor variedade e robustez aos dados extraídos.

Outro fator com implicações relevantes na qualidade dos resultados obtidos, encontra-se presente no modo em como foram processadas as lâminas durante o procedimento de WSI, no qual se acabou por obter um grupo de lâminas em que a resolução em  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  era inferior à resolução das lâminas restantes. Por sua vez, esta incongruência verificada poderá ter afetado os dados obtidos pelo programa de análise de imagem no grupo afetado.

Apesar de se ter realizado um total de 1681 anotações e de se terem caracterizado 132 875 núcleos neoplásicos, a amostra incluiu apenas 55 amostras diferentes de carcinoma urotelial, constituindo também um fator limitante.

Outra limitação deste trabalho prende-se com o fato de todas as lâminas serem pertencentes apenas a doentes tratados no Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, o que invoca também o viés de seleção neste trabalho.

Por último, neste estudo também estará presente o viés de medição, uma vez que a classificação do grau histológico do carcinoma urotelial papilar da WHO de 2004, terá sido atualizado em 2016, tendo em conta que a amostra compreende um intervalo de tempo entre os anos 2014 e 2017, antes e depois da atualização, é possível que existam certas inconsistências no grau histológico tumoral definido pelo patologista à data do diagnóstico [4]. Estas limitações poderão ser colmatadas em futuros estudos, através de uma amostra de maiores dimensões, idealmente com um estudo multicêntrico, e com aplicação de ferramentas mais complexas, como o *deep learning*.

## Conclusão

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que, com os métodos utilizados, não é possível encontrar uma associação significativa entre as características morfonucleares das células tumorais e o risco de recidiva ou com o tipo histológico do NMIBC. Também não foi identificada uma correlação com significado estatístico entre o estadiamento do NMIBC e as suas características morfonucleares, contudo parece haver uma associação com significado clínico, nomeadamente dos parâmetros, média de intensidade positiva e dimensão nuclear média. Nestes parâmetros parece haver diferenças entre os estádios não invasivos ou intra-epiteliais (pTis e pTa), comparativamente aos casos com invasão do tecido conjuntivo suburotelial (pT1).

Existem várias lacunas que poderão ser melhoradas, nomeadamente o emprego de um método de processamento de imagem com o intuito de aprimorar e isolar o objeto de interesse para que posteriormente possa ser analisado de forma mais consistente e eficiente. A utilização de um *software* de análise de imagem com capacidade para discernir um maior volume de parâmetros morfológicos diferentes também irá conferir uma maior robustez e validade aos dados de caracterização obtidos. Todo este processo, deverá também ser precedido por um procedimento de WSI com especificações consistentes para todas as lâminas reduzindo desta forma a variabilidade.

Por último, seria benéfica a realização de estudos com populações mais alargadas e diversas, de modo explorar com maior profundidade o papel das técnicas de análise de imagem no diagnóstico, estadiamento e risco de recorrência no carcinoma urotelial.

Este trabalho procurou contribuir para o conhecimento e desenvolvimento de aplicações das novas tecnologias de análise de imagem e de inteligência artificial na medicina, e em concreto na Anatomia Patológica.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus orientadores, Exmo. Professor Doutor Vítor Manuel Leitão de Sousa e Exmo. Dr. Rui Jorge Gonçalinho de Almeida, por todo o acompanhamento e tempo investido neste trabalho sempre com novas indicações, sugestões e correções prestadas com toda a disponibilidade, atenção, paciência e rigor.

Agradeço também a todo o restante corpo docente do Serviço de Anatomia Patológica do CHUC, pela amabilidade com que fui recebido no serviço, durante a colheita dos dados para o estudo.

Por último, mas não menos importante agradeço à minha família, colegas e amigos que me apoiaram de forma incondicional em todos os momentos ao longo desta jornada.

## Referências Bibliográficas

- [1] Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. 2020. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today>
- [2] Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 2013;63(2):234-241. doi:10.1016/j.eururo.2012.07.033
- [3] Chen S, Zhu S, Cui X, et al. Identifying non-muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer based on blood serum surface-enhanced Raman spectroscopy. *Biomed Opt Express.* 2019;10(7):3533-3544. doi:10.1364/BOE.10.003533
- [4] Gontero, P., et al. Guidelines on Non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1 and CIS). In: EAU Guidelines published at the 38th Annual Congress Milan 2023. European Association of Urology Guidelines Office, Arnhem, the Netherlands. <https://uroweb.org/guidelines/non-muscle-invasive-bladder-cancer>
- [5] Witjes, J., et al. EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer 2022. Edn. presented at the 37th EAU Annual Congress Amsterdam. European Association of Urology Guidelines Office Arnhem, The Netherlands. <https://uroweb.org/guideline/bladder-cancer-muscle-invasive-and-metastatic/>
- [6] Soukup V, Čapoun O, Cohen D, et al. Prognostic Performance and Reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization Grading Classification Systems in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A European Association of Urology Non-muscle Invasive Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *European Urology.* 2017;72(5):801-813. doi:10.1016/j.eururo.2017.04.015
- [7] Soria F, Droller MJ, Lotan Y, et al. An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *World J Urol.* 2018;36(12):1981-1995. doi:10.1007/s00345-018-2380-x
- [8] Soria F, Krabbe LM, Todenhöfer T, et al. Molecular markers in bladder cancer. *World J Urol.* 2019;37(1):31-40. doi:10.1007/s00345-018-2503-4
- [9] Zarella MD, Bowman; D, Aeffner F, et al. A Practical Guide to Whole Slide Imaging: A White Paper From the Digital Pathology Association. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* 2018;143(2):222-234. doi:10.5858/arpa.2018-0343-RA
- [10] Aeffner F, Zarella MD, Buchbinder N, et al. Introduction to Digital Image Analysis in Whole-slide Imaging: A White Paper from the Digital Pathology Association. *Journal of Pathology Informatics.* 2019;10(1):9. doi:10.4103/jpi.jpi\_82\_18
- [11] Robertson S, Azizpour H, Smith K, Hartman J. Digital image analysis in breast pathology—from image processing techniques to artificial intelligence. *Translational Research.* 2018;194:19-35. doi:10.1016/j.trsl.2017.10.010

- [12] Zhou Y, Qing Ru G, Yan R, et al. An Inexpensive Digital Image Analysis Technique for Liver Fibrosis Quantification in Chronic Hepatitis B Patients. *Annals of Hepatology*. 2017;16(6):881-887. doi:10.5604/01.3001.0010.5278
- [13] Jerome JA, Wenzel SE, Trejo Bittar HE. Digital Imaging Analysis Reveals Reduced Alveolar  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Expression in Severe Asthma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2021;29(7):506. doi:10.1097/PAI.0000000000000926
- [14] Zheng H, Gasbarrino K, Veinot JP, Lai C, Daskalopoulou SS. New Quantitative Digital Image Analysis Method of Histological Features of Carotid Atherosclerotic Plaques. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2019;58(5):654-663. doi:10.1016/j.ejvs.2019.07.015
- [15] WHO Classification of Tumours Editorial Board. Urinary and male genital tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 8). <https://publications.iarc.fr/610>.
- [16] Kosuge N, Saio M, Matsumoto H, Aoyama H, Matsuzaki A, Yoshimi N. Nuclear features of infiltrating urothelial carcinoma are distinguished from low-grade noninvasive papillary urothelial carcinoma by image analysis. *Oncology Letters*. 2017;14(3):2715-2722. doi:10.3892/ol.2017.6474
- [17] Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind CH, editors. TNM classification of malignant tumours. 8th ed. Oxford, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2017.
- [18] Kobayashi H, Kikuchi E, Mikami S, et al. Long term follow-up in patients with initially diagnosed low grade Ta non-muscle invasive bladder tumors: tumor recurrence and worsening progression. *BMC Urology*. 2014;14(1):5. doi:10.1186/1471-2490-14-5
- [19] Poropatich K, Yang JC, Goyal R, Parini V, Yang XJ. Nuclear size measurement for distinguishing urothelial carcinomas from reactive urothelium on tissue sections. *Diagnostic Pathology*. 2016;11(1):57. doi:10.1186/s13000-016-0501-7
- [20] Tokuyama N, Saito A, Muraoka R, et al. Prediction of non-muscle invasive bladder cancer recurrence using machine learning of quantitative nuclear features. *Modern Pathology*. 2022;35(4):533-538. doi:10.1038/s41379-021-00955-y

## Material Suplementar

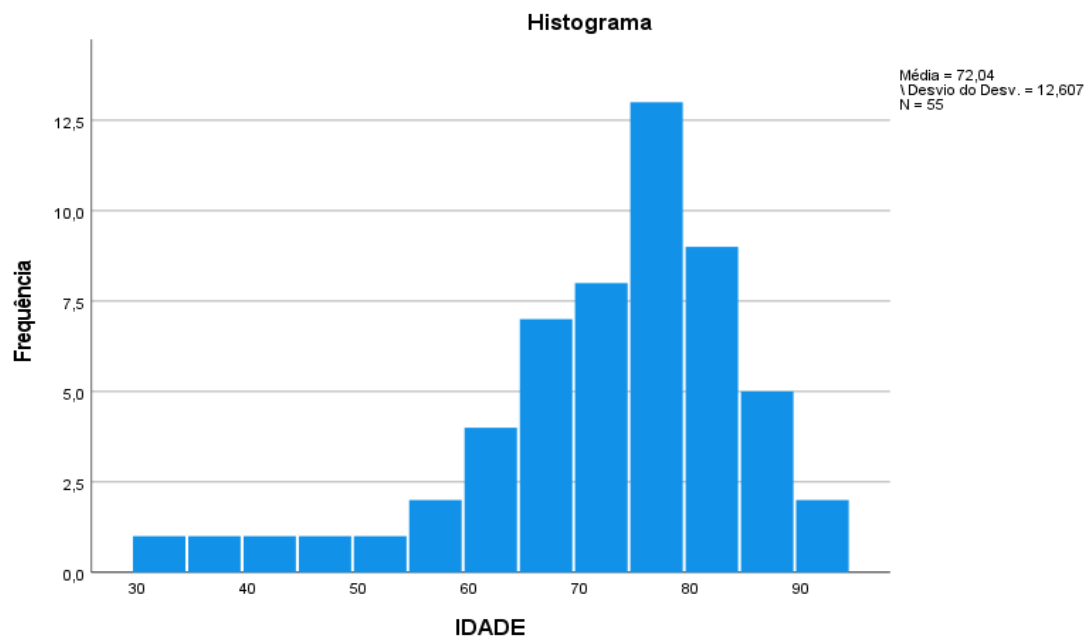


Figura 1: Histograma de distribuição da idade na amostra

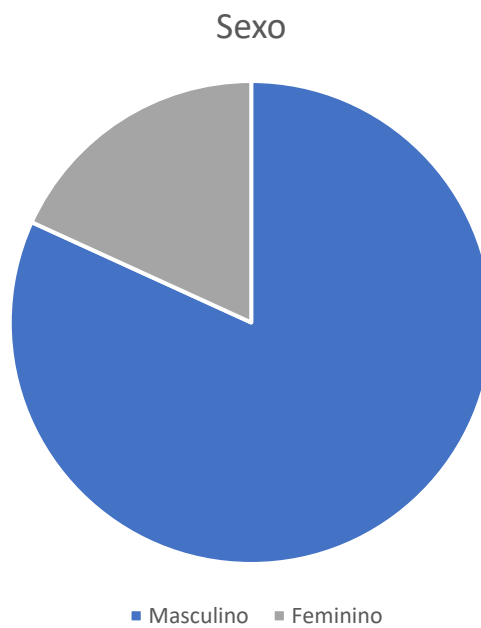
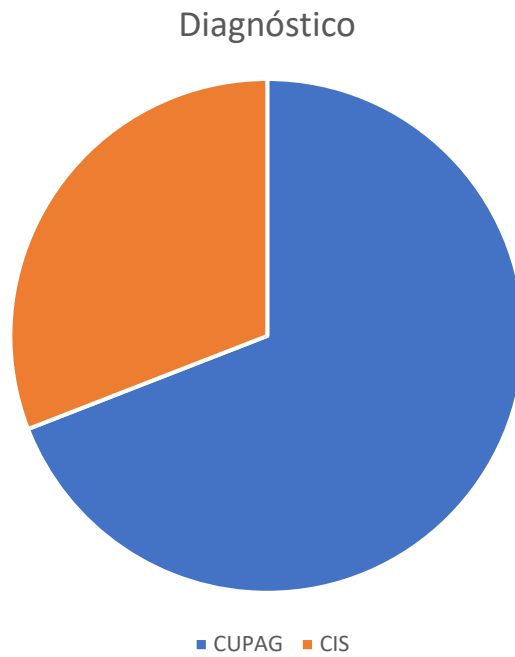
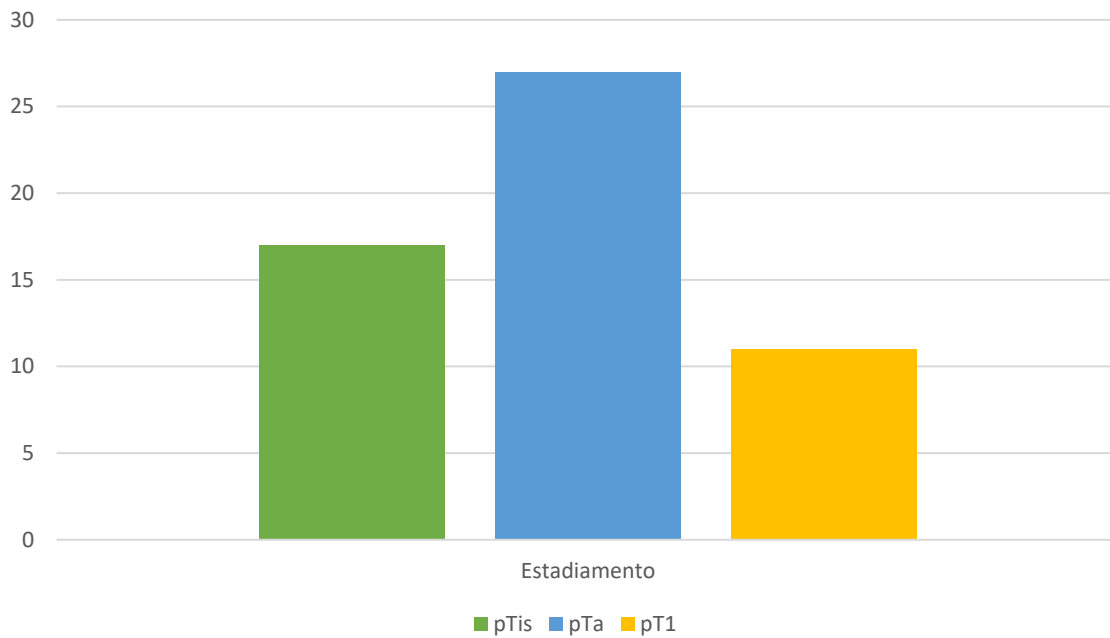


Figura 2: Gráfico circular com distribuição do sexo na amostra



**Figura 3:** Gráfico circular com distribuição do diagnóstico na amostra



**Figura 4:** Gráfico de barras com distribuição do estadiamento na amostra

### Com Recidiva Posterior

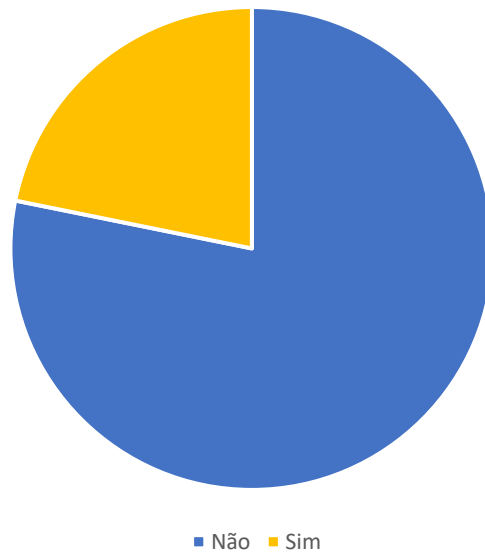


Figura 5: Gráfico circular com distribuição do diagnóstico na amostra

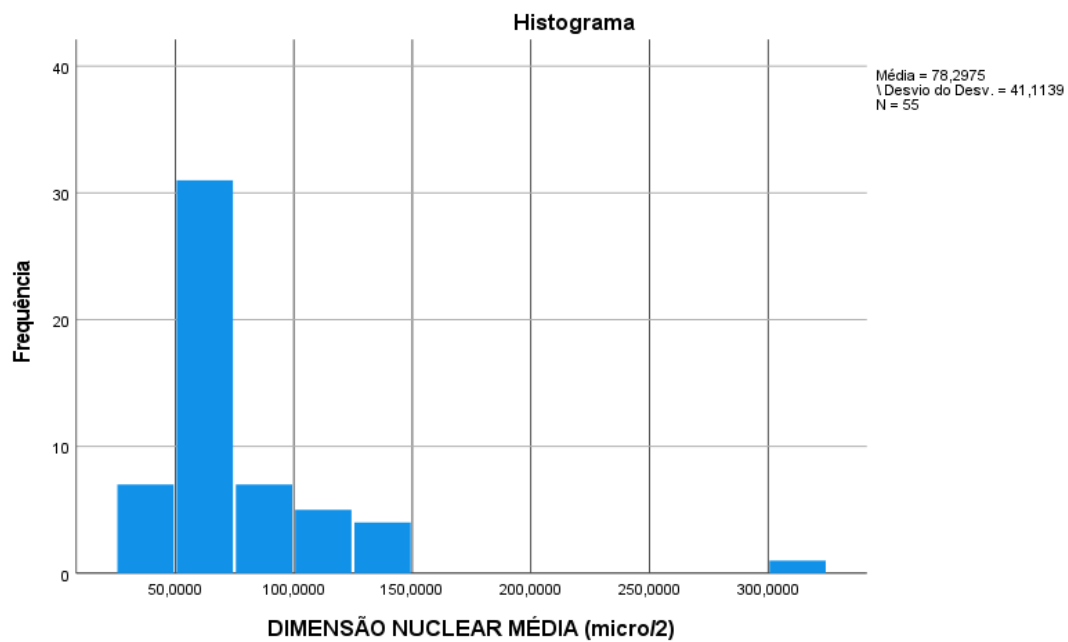


Figura 6: Histograma de distribuição da dimensão nuclear média ( $\mu\text{m}^2$ ) na amostra



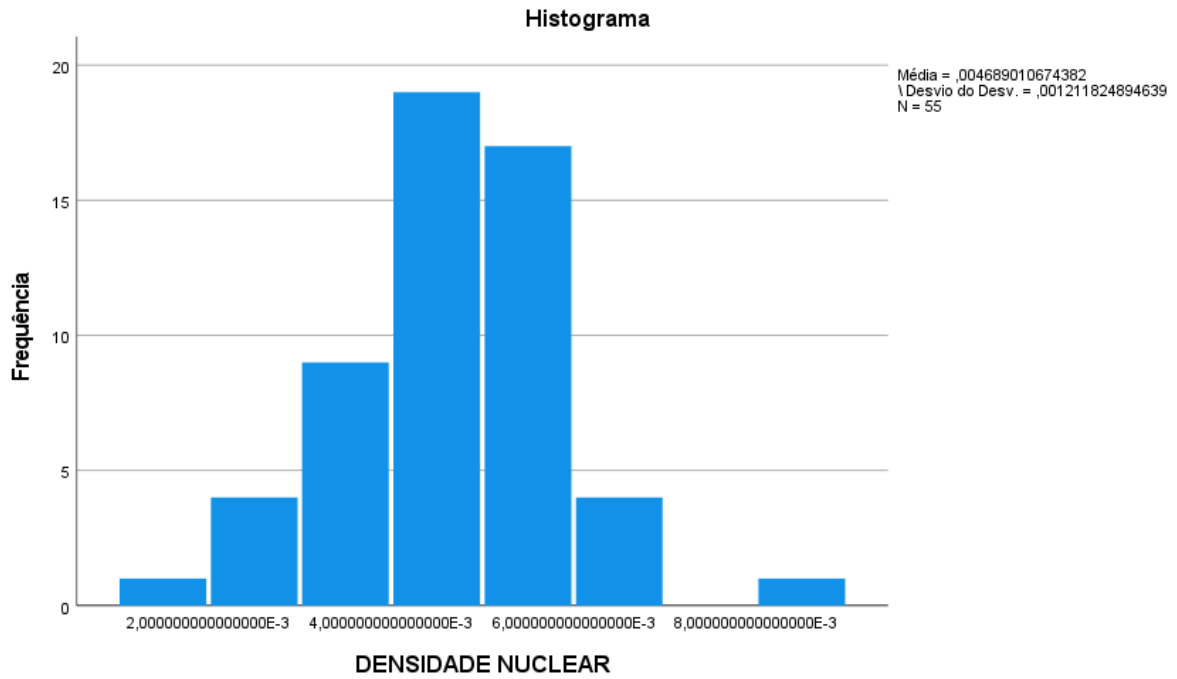


Figura 7: Histograma de distribuição da densidade nuclear (núcleos/μm<sup>2</sup>) na amostra

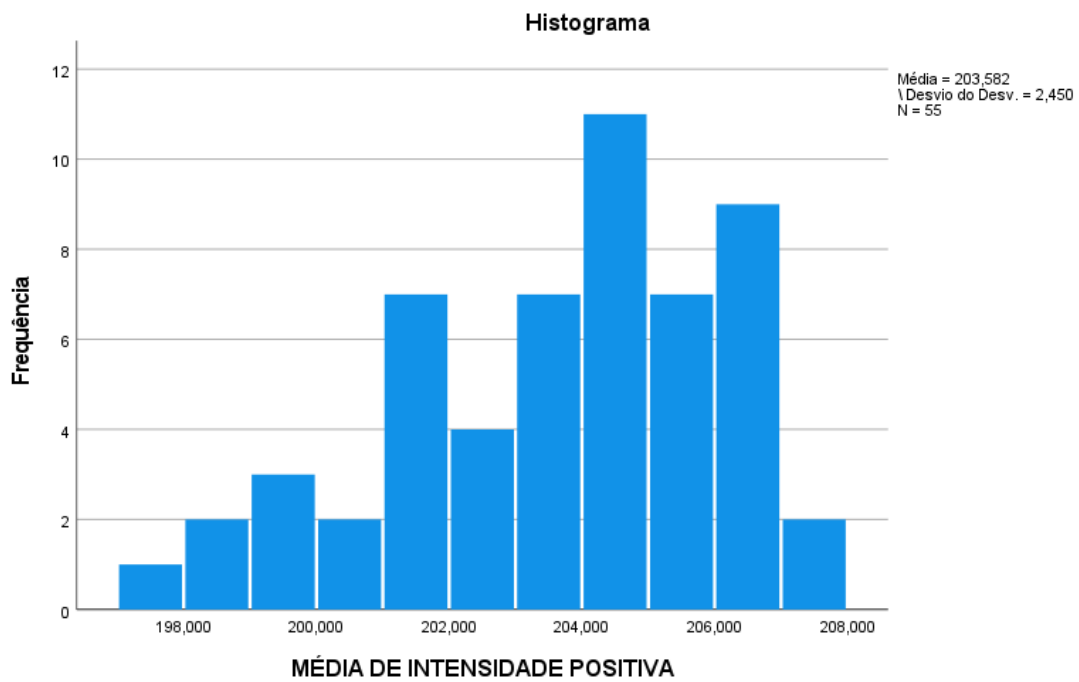


Figura 8: Histograma de distribuição da média de intensidade positiva na amostra

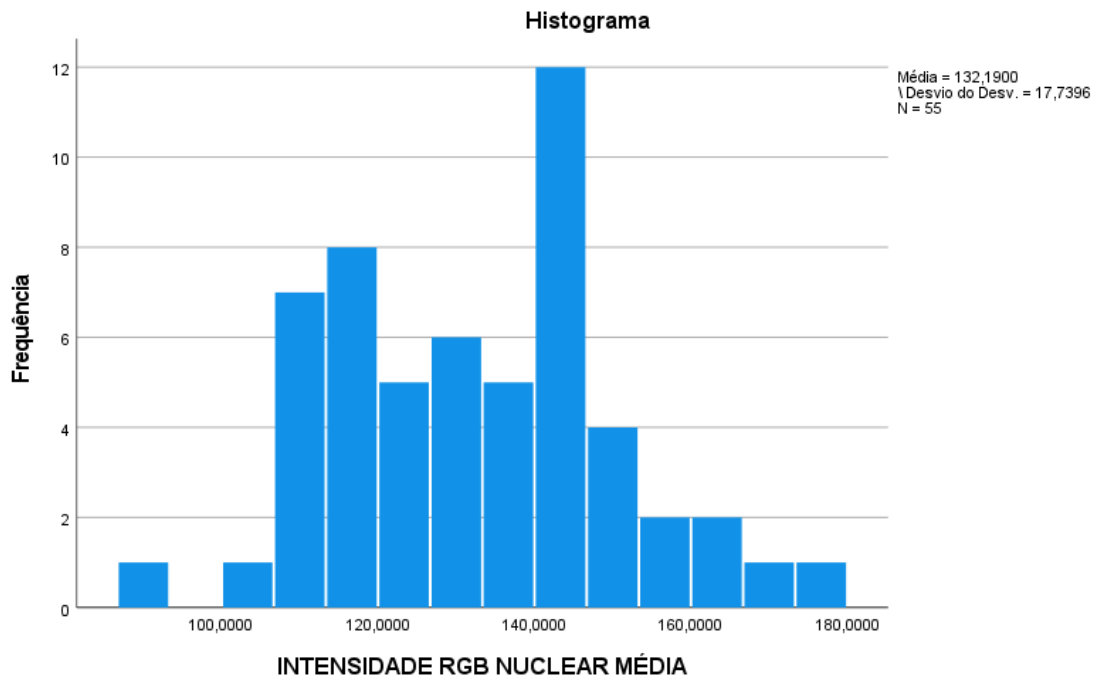


Figura 9: Histograma de distribuição da intensidade RGB nuclear média na amostra