



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ESTEREOLOGIA E
ANÁLISE DE IMAGEM PARA QUANTIFICAÇÃO
RÁPIDA E PRECISA EM PATOLOGIA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada por Professor Doutor Pedro Faísca.

Maria Carolina da Silva Razões, n.º 21802377

2025



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ESTEREOLOGIA E
ANÁLISE DE IMAGEM PARA QUANTIFICAÇÃO
RÁPIDA E PRECISA EM PATOLOGIA EXPERIMENTAL**

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa,
no dia 12/02/2025, perante o júri, nomeado pelo
Despacho de Nomeação n.º: 58/2025, de 27 de janeiro,
com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor David Ramilo
Arguente: Professora Doutora Tânia Carvalho
Orientador: Professor Doutor Pedro Faisca

Maria Carolina da Silva Razões, n.º 21802377

2025

Todas as coisas da vida são criadas duas vezes: quando as sonhamos e quando as concretizamos.

- Stephen Covey

Aos meus pais, Ilda e Carlos Razões, pelo amor, esforço e dedicação que têm para comigo.
Sou eternamente grata por tudo o que fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Pedro Faísca, pela dedicação, confiança, disponibilidade constante e por nunca ter desistido de mim.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, pela excelente instituição e profissionais que passaram pela minha vida académica.

Agradeço ao Instituto Gulbenkian de Ciência, por me ter recebido tão bem. A toda a equipa do serviço de histopatologia e microscopia eletrónica do Instituto Gulbenkian de Ciência por me terem feito sentir em casa. Obrigada pelo ambiente acolhedor que proporcionaram.

Um agradecimento muito especial à Mariana Monteiro e à Patrícia Rodrigues, pela incansável ajuda, disponibilidade e, acima de tudo, paciência. Muito grata por toda a ajuda, foram sem dúvida muito importantes neste processo. Agradeço também à Joana Santos por ter sido incansável e por me ter dado muita motivação para escrever esta tese.

Quero agradecer ao laboratório DNATech e a toda a equipa. Um especial agradecimento às minhas colegas de estágio, Giulia e Rita, por terem uma energia contagiante e por terem alegrado esses dias.

Aos meus pais, Carlos e Ilda razões, por todos os valores que me transmitem, pela confiança que têm em mim e por todo o amor, apoio, força e dedicação. São um exemplo e inspiração na minha vida. Sem o esforço deles, não seria possível. Um obrigada não chega por tudo o que fazem por mim, todos os dias.

À minha irmã, Bruna Razões, a minha melhor amiga e o meu maior exemplo. Por ser a pessoa que mais acredita e que mais confia nas minhas capacidades, por estar sempre disponível para me ouvir e aconselhar. Sempre me apoiou e incentivou em tudo. Devo-lhe um enorme obrigada por me dedicar tanto de si e por ser a pessoa mais genuína que conheço.

Ao meu namorado, José Mota, por ser o meu melhor amigo, companheiro e maior apoio. Por nunca duvidar de mim, por me dar toda a sua força, incentivo e inspiração. Agradeço-lhe muito por tudo o que faz, toda a paciência, compreensão e amor incondicional. Por toda a felicidade que transmitimos quando estamos juntos, sem dúvida, o meu braço direito, todos os dias.

Ao meu cunhado, André Moreira, por ser um exemplo de trabalho, dedicação e profissionalismo. Agradeço a ele e à minha irmã, por me terem dado o ser mais importante na minha vida, a Júlia, a minha sobrinha de 2 anos, que é um docinho de amor. É a minha

motivação mais forte e um amor que não consigo explicar. Trabalho e dedico-me para um dia conseguir ser um exemplo na vida dela, como a minha irmã é para mim.

À minha avó, Rosalina Razões, por demonstrar tanto do seu amor e humildade para comigo. Por todas as preocupações, telefonemas e velinhas acesas. Mesmo estando longe conseguiu sempre demonstrar o seu apoio com as suas mensagens de força. É um apoio muito grande para mim.

Um agradecimento especial às minhas amigas Joana, Mia e Stela, por serem as minhas amigas de coração, por estarem sempre lá para mim e por todo o apoio e força ao longo destes anos. Muito obrigada por estarem presentes e por mostrarem serem as amigas para a vida toda.

A todos os meus amigos de Torres Novas, especialmente ao João, Rodrigo e Xavier. São três amigos pelo quais tenho muita estima e amor, conseguem acreditar mais em mim do que eu própria, devo-lhes muito.

Às minhas amigas de faculdade, Beatriz, Carolina, Marta, Sara, Tiffany e Victoria por todo o companheirismo e integração, por terem estado comigo desde o início desta etapa tão importante na minha vida. Este curso, de facto não se faz sozinho e elas são a prova disso. Sou eternamente grata por terem entrado na minha vida e por todos estes anos. São seis amigas que levo para a vida. Muito obrigada. Que venham mais viagens juntas.

À Rita e Mariana, por todas as corridas e risotas no comboio, logo pela manhã. Obrigada por terem marcado estes 6 anos e especialmente os comboios de Portugal.

A todos, muito obrigada.

RESUMO

A análise de imagem representa um avanço na avaliação quantitativa em patologia. Os programas de código aberto, como o *QuPath*, facilitam o acesso a essas ferramentas, mas a precisão e exatidão podem variar, e inferir estruturas tridimensionais a partir de estruturas bidimensionais pode induzir em erro. Este estudo combinou a estereologia com a análise de imagem para criar uma abordagem precisa e rápida.

Foram aproveitados blocos de parafina de estudos de melanoma metastático pulmonar e fibrose cardíaca. A estereologia foi realizada no *Visiopharm*, e a análise de imagem no *QuPath*, utilizando o *threshold* para as metástases pulmonares e o *machine learning* para a fibrose cardíaca.

Não houve diferenças estatísticas entre os métodos ($p>0,05$). O coeficiente de correlação foi de $r=1,000$ para volume pulmonar e metástases, e $r=0,900$ para percentagem metástase/pulmão. Para o volume do miocárdio ventricular foi de $r=0,900$, $r=1,000$ para o volume de fibrose e para a percentagem fibrose/ventrículo. Entre lâminas do mesmo animal, observou-se coeficientes de variação elevados indicado uma forte heterogeneidade.

Conclui-se que a integração da estereologia com a análise de imagem gera estimativas de volume precisas e rápidas. Além disso, não é adequado confiar apenas em uma única secção bidimensional para representar uma lesão tridimensional.

Palavras-Chaves: Análise de Imagem; Inteligência Artificial; *Machine Learning*; Patologia Digital; *QuPath*.

ABSTRACT

Image analysis represents a significant advancement in quantitative pathology assessment. Open-source programs, such as QuPath, enhance accessibility to these tools; however, accuracy and precision may vary, and inferring three-dimensional structures from two-dimensional representations can lead to errors. This study combined stereology with image analysis to develop a rapid and accurate approach.

Paraffin blocks from studies on pulmonary metastatic melanoma and cardiac fibrosis were used. Stereology was performed using Visiopharm, and image analysis was conducted with QuPath, applying the threshold method for pulmonary metastases and machine learning for cardiac fibrosis.

No statistical differences were found between the methods ($p>0.05$). The correlation coefficient was $r=1.000$ for lung and metastasis volumes and $r=0.900$ for the metastasis/lung ratio. For ventricular myocardial volume, the coefficient was $r=0.900$, and $r=1.000$ for both fibrosis volume and the fibrosis/ventricle ratio. High coefficients of variation were observed among slides from the same animal, indicating significant heterogeneity.

In conclusion, integrating stereology with image analysis provides precise and rapid volume estimations. Although relying solely on a single two-dimensional section to represent a three-dimensional lesion is not appropriate.

Keywords: Digital Pathology; Image Analysis; QuPath; Artificial Intelligence; Machine Learning.

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2D – Duas Dimensões

3D – Três Dimensões

CBIOS - Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde

CV – Coeficiente de Variação

DAB - 3,3'-Diaminobenzidina

DL – Aprendizagem profunda, do inglês “*Deep Learning*”

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês “*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*”

Et al. - E outros, do latim “*et alli*”

FELv - Vírus da Leucemia Felina, do inglês “*Feline Leukemia Virus*”

FIV - Vírus da Imunodeficiência Felina, do inglês “*Feline Immunodeficiency Virus*”

H&E - Hematoxilina e Eosina

HER-2 - Recetor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2, do inglês “*Human Epidermal Growth Factor-type 2*”

IA – Inteligência Artificial

IFI - Imunofluorescência Indireta

IHC – Imunohistoquímica

IGC - Instituto Gulbenkian de Ciência

ML – Aprendizagem de máquina, do inglês “*Machine Learning*”

RIA - Técnica Radioimunoensaio

ROI – Região de Interesse, do inglês “*Region of interest*”

SPPA - Sociedade Portuguesa de Patologia Animal

SPCV – Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias

SURS – Amostragem Aleatória Uniforme e Sistemática

TILs - Linfócitos Infiltrantes dos Tumores, do inglês “*Tumor-Infiltrating Lymphocytes*”

WSI – Imagem de Lâmina Inteira, do inglês “*Whole Slide Images*”

µm – Micrómetro

µm² - Micrómetro Quadrado

mm - Milímetro

mm² – Milímetro Quadrado

mm³ - Milímetro ao Cubo

> - Maior

< - Menor

“±” - Mais ou Menos

% - Percentagem

Texto em Itálico - Palavras em língua inglesa

Texto a Negrito - Para dar destaque a um determinado termo

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	12
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	13
ÍNDICE DE FIGURAS	14
CAPÍTULO 1: CASUÍSTICA DO ESTÁGIO CURRICULAR	17
1.1. Instituto Gulbenkian de Ciência	17
1.1.1. Atividades desenvolvidas durante o estágio curricular	17
1.2. Laboratório DNATech.....	19
1.2.1. Atividades desenvolvidas durante o estágio curricular	19
CAPÍTULO 2: INTRODUÇÃO	24
2.1. Patologia Digital	24
2.2. Análise de Imagem	25
2.3. Patologia Computacional e Inteligência Artificial	26
2.4. Ferramentas de Análise de imagem e Programas de Código Aberto	27
2.4.1. <i>QuPath</i>	28
2.5. Estereologia	30
2.6. Contexto e Objetivos do Estudo	31
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Amostras	33
3.2. Imagens para Quantificação	33
3.3. Estereologia	33
3.4. Análise de Imagem	34
3.4.1. Estudo 1 - Quantificação de Metástases Pulmonares	34
3.4.1.1. <i>QuPath</i>	34
3.4.1.1.1. Normalização de Cores	34
3.4.1.1.2. Desenvolvimento do Classificador para a Região Pulmonar.....	35

3.4.1.1.3. Desenvolvimento do Classificador para a Quantificação de Metástases Pulmonares	37
3.4.2. Estudo 2 - Quantificação de Fibrose Cardíaca	38
3.4.2.1. <i>QuPath</i>	38
3.4.2.1.1. Normalização de Cores	39
3.4.2.1.2. Desenvolvimento do Classificador para a Quantificação de Fibrose Cardíaca	39
3.4.2.1.3. Desenvolvimento do Classificador para a Região Ventricular	40
3.4.2.1.4. Automatização do Processo de Detecção e Quantificação de Fibrose Cardíaca	41
3.6. Exportação dos resultados do Estudo 1 e 2	42
3.6.1. Comparação de Ambas as Metodologias	43
3.6.2. Cortes Individuais	43
3.7. Análise Estatística.....	43
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	45
4.1. Resultados da Quantificação de Metástases Pulmonares (Estudo 1)	45
4.1.1. Comparação de Ambas as Metodologias.....	45
4.1.2. Cortes Individuais.....	47
4.2. Resultados da Quantificação de Fibrose Cardíaca (Estudo 2).....	49
4.2.1. Comparação de Ambas as Metodologias.....	49
4.2.3. Cortes Individuais.....	51
CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO	53
5.1. Escolha dos Métodos – <i>QuPath</i> e Estereologia.....	53
5.2. Escolha dos Métodos para a Quantificação - <i>QuPath</i>	54
5.2. Discussão dos Resultados	54
5.2.1. Comparação de ambos os métodos.....	54
5.2.2. Cortes Individuais.....	55
5.3. Limitações e Desafios da Investigação.....	56
5.4. Projetos Futuros	56
CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO	57

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO 8: ANEXOS	I
Anexo A - Formadora e Coorganizadora do Workshop sobre o programa <i>QuPath</i> (1ªEdição), Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa	I
Anexo B – Formadora e Coorganizadora do Workshop sobre o programa <i>QuPath</i> (2ªEdição) da Sociedade Portuguesa e Patologia Animal e da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias.....	II
Anexo C – Resumo da apresentação do Seminário sobre o Programa <i>QuPath</i> , realizada no CBIOS, na Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa.....	III
Anexo D – Submissão de Resumo Científico, sobre o Tema da Dissertação de Mestrado, no III Encontro de Investigação da FMV na Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa	IV
Anexo E – Submissão de Resumo Científico, sobre o Tema da Dissertação de Mestrado, no 5º Congresso Europeu de Patologia (European Society of Veterinary Pathology), em Madrid	VI

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Configurações para o desenvolvimento do classificador da região pulmonar, utilizando o QuPath.	35
Tabela 2: Configurações para o desenvolvimento do classificador para a quantificação de metástases pulmonares, utilizando o QuPath.	37
Tabela 3: Configurações para o desenvolvimento do classificador para a quantificação de fibrose cardíaca, utilizando o QuPath.	40
Tabela 4: Configurações para o desenvolvimento do classificador para a região ventricular, utilizando o QuPath.	40
Tabela 5: Comparação da análise estatística dos resultados obtidos pelo programa QuPath e pelo método de estereologia, para o volume pulmonar, o volume metástases e a percentagem metástases/pulmão.	45
Tabela 6: Resultados da correção de Spearman entre os métodos QuPath e Estereologia para o volume pulmonar, volume de metástases e a percentagem metástases/pulmão.	46
Tabela 7: Resultados do Coeficiente de Variação relativamente ao volume pulmonar, volume de metástase e percentagem metástase/pulmão, de cada animal.	48
Tabela 8: Análise estatística dos resultados obtidos pelos métodos QuPath e estereologia, para o volume ventricular, o volume de fibrose e a percentagem fibrose/ventrículo.	49
Tabela 9: Resultados da correção de Spearman entre os métodos QuPath e Estereologia para o volume ventricular, volume de fibrose e a percentagem fibrose/ventrículo.	50
Tabela 10: Resultados do Coeficiente de Variação relativamente ao volume ventricular, volume de fibrose e percentagem fibrose/ventrículo, de cada animal.	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Horas realizadas em cada rotação durante o estágio no Laboratório DNATech (10 semanas).....	19
Gráfico 2: Resultados obtidos na IFI realizada durante os meses de estágio.	20
Gráfico 3: Microrganismos mais comuns na análise de urocultura.....	22
Gráfico 4: Microrganismos mais comuns na cultura de aeróbios.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Da esquerda para a direita: 1- Visualização ao microscópio de imunofluorescência de <i>Leishmania infantum</i> ; 2- <i>Ehrlichia canis</i> ; 3- <i>Rickettsia conorii</i>	21
Figura 2: Seccionamento de um órgão por amostragem aleatória uniforme e sistemática, em que (T) é o intervalo de amostragem e (RS) o início aleatório da primeira secção (Brown, 2017b).	31
Figura 3: Normalização de cores automática para corrigir a variabilidade de cores entre imagens. Original da autora.	35
Figura 4: (A) Imagem representativa da aplicação dos parâmetros para a quantificação da área pulmonar. (B) Anotação da área pulmonar. (C) Passos para o comando ‘Split by Line’. (D) Ilustração da zona onde foi aplicado a ferramenta linha. (E) Resultado após o comando ‘Split by Line’. (F) Passos para o comando ‘Fill Holes’. (G) Anotação final da área pulmonar, após a aplicação dos comandos descritos. Original da autora.	36
Figura 5: Aplicação do script em todo o projeto e nos restantes projetos de melanoma estudados neste estudo. (A) Exemplo de imagens de diferentes projetos. (B) Aplicação do classificador desenvolvido para a quantificação da região pulmonar. (C) Aplicação do classificador desenvolvido para a quantificação de metástases pulmonares. Original da autora.	38
Figura 6: Normalização automática de cores para corrigir a variabilidade de cores entre imagens. Original da autora.	39
Figura 7: Imagem treino criada no QuPath: (A) Imagem original sem aplicação dos parâmetros. Áreas de fibrose estão coradas a azul. (B) A mesma imagem treino após a aplicação dos parâmetros para a identificação de áreas de fibrose/coloração azul. A cor roxa representa a fibrose, a cor azul os núcleos e a cor amarela o miocárdio. Original da autora.	40
Figura 8: Imagem representativa da aplicação do classificador desenvolvido para a quantificação da região ventricular. Original da autora.	41
Figura 9: (A) Exemplo de um corte de coração. (B) Seleção da região de interesse. (C) Aplicação do classificador para a quantificação de fibrose.	41
Figura 10: Comparação após aplicação do classificador para a quantificação de fibrose cardíaca. (A) Imagem Original. (B) Aplicação do classificador para a quantificação de fibrose cardíaca. Original da autora.	42
Figura 11: Correlação entre os métodos QuPath e Estereologia para o volume de pulmonar. Original da autora.	46

Figura 12: Correlação entre os métodos QuPath e Estereologia para o volume de metástase. Original da autora.	46
Figura 13: Correlação entre os métodos QuPath e Estereologia para a percentagem metástase/pulmão. Original da autora.	47
Figura 14: Outliers identificados pelo método de ROUT. Da esquerda para a direita: referente ao Volume Pulmonar, Volume de Metástases e percentagem Metástase/Pulmão. Os pontos a preto correspondem aos outliers identificados. Original da autora.	47
Figura 15: Variação dos cortes individuais de cada animal em relação ao volume pulmonar. A branco corresponde aos valores de cada corte, enquanto a preto os outliers identificados pelo método de ROUT. Os ** representa CV: 15%-30% - variabilidade moderada. Original da autora.	48
Figura 16: Variação dos cortes individuais de cada animal em relação ao volume de metástases. A branco corresponde aos valores de cada corte. Os ** representa CV: 15%-30% - variabilidade moderada; ***: CV>30% - variabilidade elevada. Original da autora.	48
Figura 17: Variação dos cortes individuais de cada animal em relação à percentagem metástase/pulmão. A branco corresponde aos valores de cada corte, enquanto a preto os outliers identificados pelo método de ROUT. O * representa CV<15% - baixa variabilidade; **: CV: 15%-30% - variabilidade moderada; ***: CV>30% - variabilidade elevada. O triângulo preto representa o valor total da percentagem metástase/pulmão. Original da autora.	49
Figura 18: Correlação entre os métodos QuPath e Estereologia para o volume ventricular. Original da autora.	50
Figura 19: Correlação entre os métodos QuPath e Estereologia para o volume de fibrose. Original da autora.	51
Figura 20: Correlação entre os métodos QuPath e Estereologia para a percentagem fibrose/ventrículo. Original da autora.	51
Figura 21: Outliers identificados pelo método de ROUT. Da esquerda para a direita: referente ao Volume Pulmonar, Volume de Metástases e percentagem Metástase/Pulmão. Os pontos a preto correspondem aos outliers identificados. Original da autora.	51
Figura 22: Representação da variação dos cortes individuais de cada animal em relação ao volume ventricular. A branco corresponde aos valores de cada corte. Os *** representam CV>30% - variabilidade elevada. Original da autora.	52

Figura 23: Representação da variação dos cortes individuais de cada animal em relação ao volume de fibrose. A branco corresponde aos valores de cada corte. Os *** representam CV>30% - variabilidade elevada. Original da autora.....52

Figura 24: Representação da variação dos cortes individuais de cada animal em relação à percentagem fibrose/ventrículo. A branco corresponde aos valores de cada corte, enquanto a preto o outlier identificado pelo método de ROUT. Os ** representam CV: 15%-30% - variabilidade modera; ***: CV>30% - variabilidade elevada. O triângulo preto representa o valor total da percentagem fibrose/ventrículo. Original da autora.52

CAPÍTULO 1: CASUÍSTICA DO ESTÁGIO CURRICULAR

De modo a cumprir os requisitos de conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa, é necessário a realização do estágio curricular. Esta casuística tem por objetivo apresentar de forma concisa as atividades desenvolvidas pela autora durante esse período.

O estágio curricular da autora foi realizado em dois locais distintos. O primeiro decorreu no Instituto *Gulbenkian* de Ciência (IGC), com a duração de 16 semanas, compreendido entre 04 de setembro de 2023 e 22 de dezembro de 2023. O segundo no laboratório *DNATech*, em Lisboa, com a duração de 10 semanas, entre 02 de janeiro de 2024 e 01 de março de 2024.

1.1. Instituto Gulbenkian de Ciência

O IGC, localizado em Oeiras, Portugal, é um centro nacional e internacional dedicado à investigação biológica e biomédica, à excelência científica, à formação e transformação da sociedade através da ciência. Fundado em 1961 pela Fundação Calouste Gulbenkian, uma instituição portuguesa com o intuito de promover a arte, a ciência e a educação.

O IGC recebe e apoia grupos de investigação nacionais e internacionais, proporcionando-lhes instalações de investigação avançadas. Está localizado na Rua da Quinta Grande 6, em Oeiras, numa área conhecida como Oeiras *Valley*, que é um centro de inovação, de ciência e tecnologia.

1.1.1. Atividades desenvolvidas durante o estágio curricular

Na Unidade de Histopatologia, a autora teve a oportunidade de acompanhar um patologista experimental no seu trabalho diário.

Durante o período de estágio, dedicou-se a explorar um novo programa chamado *QuPath*, utilizado em patologia digital e análise de imagem. O objetivo foi desenvolver classificadores de quantificação de modo a responder a três questões que normalmente surgem num laboratório de histopatologia experimental como a quantificação de metástases pulmonares, fibrose cardíaca e o rácio de proliferação celular Ki-67.

No âmbito do projeto desenvolvido durante o estágio, a autora foi formadora e coorganizadora de dois *Workshops*: *QuPath*, um programa de código aberto para análise de imagem em patologia digital, na Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa, de forma presencial (Anexo A), e de forma *online*, organizado pela Sociedade Portuguesa de Patologia Animal (SPPA) e pela Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias (SPCV) (Anexo B). Foram abordados os princípios básicos e práticos do programa, bem como a demonstração de exemplos práticos de análise de imagem em patologia digital. O principal objetivo foi proporcionar uma melhor compreensão das suas funcionalidades e como aplicá-las de maneira eficaz. Teve como destinatários patologistas, médicos, médicos veterinários, biomédicos, biólogos, investigadores, e outros profissionais. Além disso, a autora realizou também um seminário no Centro de Investigação em Biociências e Tecnologias da Saúde na Universidade Lusófona (CBIOS) (Anexo C).

A autora colaborou também no serviço de histopatologia quando necessário. A unidade de histopatologia do IGC tem como objetivo preparar uma ampla variedade de amostras, desde humanos a organismos modelo, como camundongos, peixes, moscas, plantas, anfíbios, bem como culturas de células esferoides e organoides, para análise microscópica. Esta unidade fornece apoio histopatológico tanto aos utilizadores internos do IGC como a utilizadores externos, como laboratórios associados, instituições académicas e empresas privadas.

Os serviços disponibilizados incluem processamento e inclusão em parafina, gelatina e resina, e equipamentos como micrótomo, vibrátomo e criostato. São realizadas coloração de rotina e colorações especiais como a imunohistoquímica (IHC). Disponibiliza também serviços de patologia quantitativa e digitalização de lâminas inteiras.

A autora digitalizou lâminas utilizando o digitalizador de lâminas digital *NanoZoomer-SQ C13140-01* e quantificou estruturas pelo método de estereologia através do programa *Visiopharm*. Realizou também um curso de fundamentos de fixação de amostras, realizado pela unidade de histopatologia e microscopia eletrónica, onde foram abordados tópicos como tipos de fixadores e métodos de fixação, boas práticas na fixação e biossegurança.

Além disso, demonstrou apoio ao projeto da outra estagiária, onde teve a oportunidade de aprender a realizar necropsias em ratinhos de laboratório, utilizar a impressora MSLA 3D PRUSA SL1 para a fabricação de moldes tridimensionais e todo o procedimento para fabricação desses moldes.

1.2. Laboratório DNATech

DNATech, fundado em 2004, é o primeiro laboratório em Portugal de análises clínicas exclusivamente veterinárias, reconhecido pela excelência dos seus serviços em diversas áreas de Medicina Veterinária. Está presente em três cidades distintas, nomeadamente Lisboa, Porto e Algarve, assegurando recolhas em todo o território nacional e ilhas.

O laboratório de Lisboa, está organizado em diversas áreas funcionais e destaca-se pela dedicação e competência dos seus profissionais, assim como pelo rigor, eficácia e fiabilidade. Estabelece também uma colaboração com os médicos para assegurar diagnósticos rápidos e confiáveis.

Tem como especialidades análises bioquímicas, biologia molecular, biotecnologia, hematologia, hemóstase, endocrinologia e toxicologia, imunologia, microbiologia, histopatologia, citologia, radioimunoensaio e alergologia.

1.2.1. Atividades desenvolvidas durante o estágio curricular

O estágio no Laboratório DNATech englobou diferentes áreas laboratoriais, nomeadamente análises bioquímicas, citologia, microbiologia, imunologia, urianálise e coprologia com o objetivo de conhecer, compreender, relacionar e aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso de Medicina Veterinária nessas áreas, no gráfico 1 estão representadas as horas realizadas em cada rotação. Com o decorrer do estágio e com o desempenho de funções nas diferentes áreas, foi adquirida a autonomia necessária para a realização das tarefas.

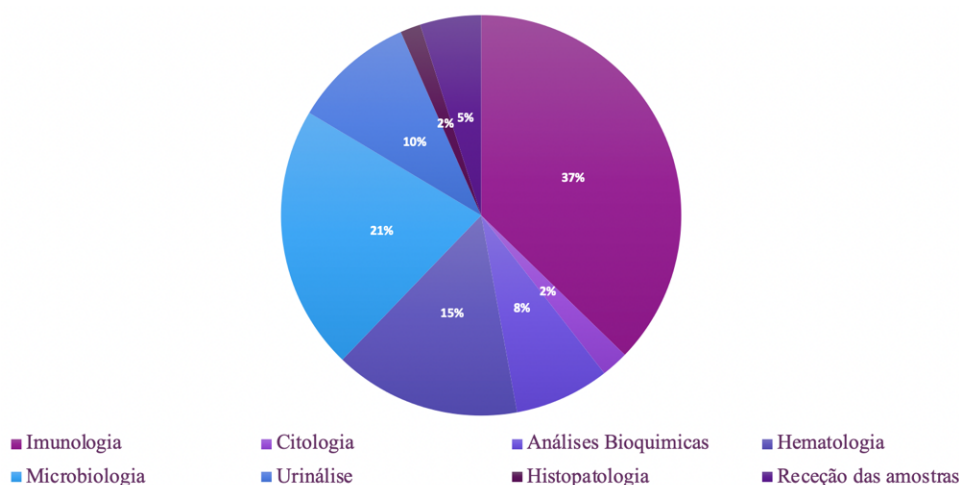


Gráfico 1: Horas realizadas em cada rotação durante o estágio no Laboratório *DNATech* (10 semanas).

Aquando da chegada ao laboratório, todas as amostras são identificadas individualmente, seja de forma manual ou automática, e são inseridas no sistema de forma a garantir a sua associação ao processo criado pela clínica. Após este procedimento, as amostras são encaminhadas para as diferentes áreas de processamento garantido a sua rastreabilidade.

Na área de imunologia, a autora realizou diversas serologias através das técnicas imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês “*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*”). A IFI é utilizada para detetar anticorpos no soro, utilizando lâminas fixadas com antígeno de diversos tipos de bactérias, protozoários e vírus. O procedimento utilizado é semelhante para as diferentes serologias, variando apenas as diluições, lâminas e o fluorocromo utilizando, dependendo da espécie cão, gato, cavalo, bovino, coelho. Após a elaboração do protocolo de IFI, as lâminas eram visualizadas ao microscópio de forma autónoma, comparando os resultados previamente analisados pela técnica responsável da área de imunologia (Figura 1). A realização da IFI pode ser feita de forma manual ou automática, através de um sistema automático de preparação de amostras (IPRO), dependendo da quantidade de amostras para *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii* em cães. A interpretação dos resultados é sempre baseada nos sinais clínicos descritos.

O gráfico 2 mostra os resultados obtidos na IFI realizada durante o estágio.

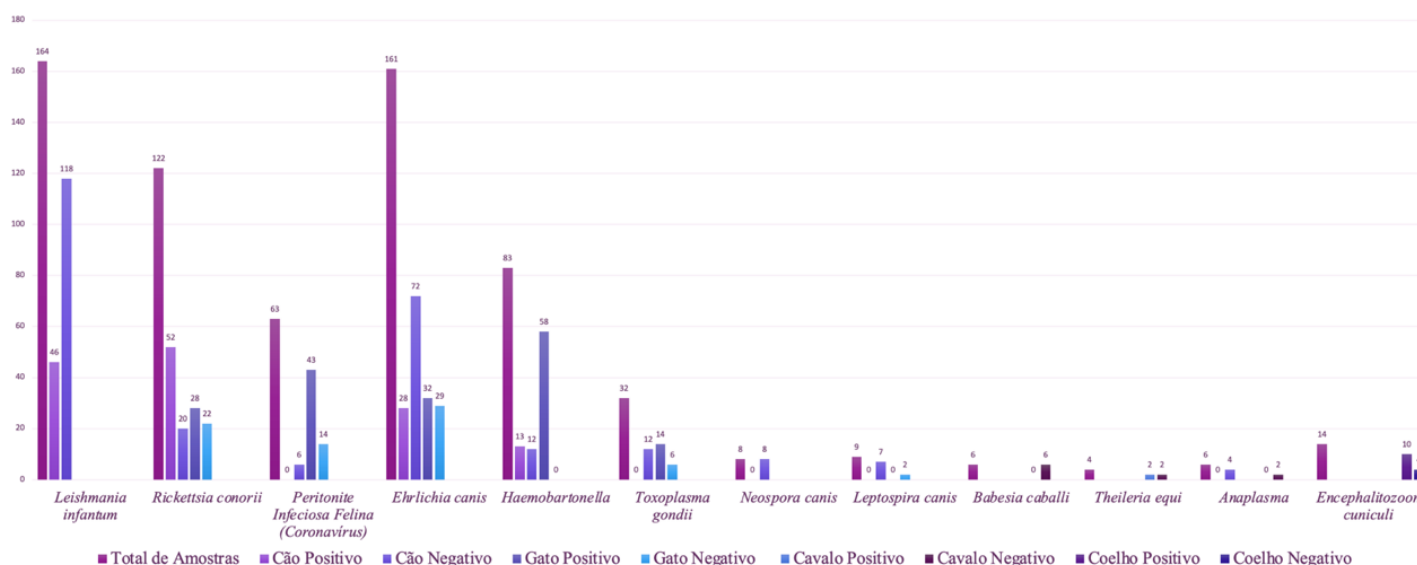


Gráfico 2: Resultados obtidos na IFI realizada durante os meses de estágio.

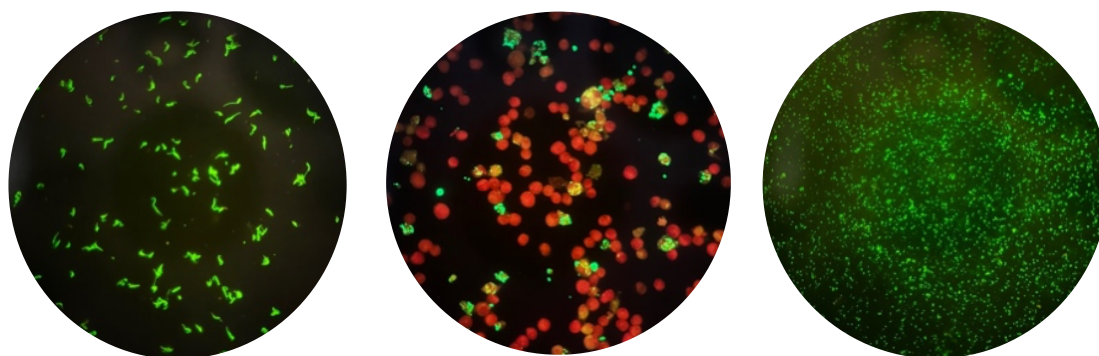


Figura 1: Da esquerda para a direita: 1- Visualização ao microscópio de imunofluorescência de *Leishmania infantum*; 2- *Ehrlichia canis*; 3- *Rickettsia conorii*.

O método ELISA é semelhante à IFI, mas utiliza uma enzima em vez da substância fluorescente. Esta técnica é mais utilizada para casos de vírus da leucemia felina (FELv, do inglês “Feline Leukemia Virus”) e vírus da imunodeficiência felina (FIV, do inglês “*Feline Immunodeficiency Virus*”). É um processo automatizado através do equipamento *Gemini* (*Meditecno*).

Para além das técnicas IFI e ELISAS de FIV e FELv, todas as segundas-feiras era realizado a técnica radioimunoensaio (RIA), ELISAS de Próstata utilizando o *Kit ELISA Odelis CPSE* para medição de CPSE (*Canine Prostate-Specific Esterase*) uma proteína secretada pela próstata, encontrada no fluido seminal. Além disso, eram realizadas também ELISAS manuais para a deteção de *Theileria equi* e *Babesia Caballi*.

O RIA é uma técnica quantitativa de alta precisão que se baseia na interação anticorpo-antígeno, que utiliza uma substância não marcada, ou seja, a amostra e uma substância marcada com isótopo radioativo. O laboratório DNATech é o único laboratório veterinário certificado pela Direção-Geral da Saúde para realizar esta técnica.

A autora também teve a possibilidade de realizar o *Canine Vaccicheck Antibody Teste Kit* de modo a verificar a presença de anticorpos circulantes para Hepatite infecciosa canina, parvovirose e cinomose. E também o teste *Biogal imuno Comb Developing Plate* para a deteção de anticorpos específicos no sangue.

Na área de microbiologia, as amostras recebidas eram muito diversas, incluindo urinas, fezes, zaragatoas de exsudados oculares, nasais, auriculares, vaginais, de feridas ou abscessos, entre outras. Após a confirmação das amostras, estas eram encaminhadas para o respetivo meio de cultura onde eram semeadas e incubadas na estufa. Posteriormente, o crescimento bacteriano era observado pelo técnico superior. Para a identificação dos microrganismos, era utilizado o equipamento *Vitek 2*, podendo também ser realizado, se solicitado, o teste de sensibilidade aos

antibióticos, no mesmo equipamento. Os microrganismos mais comuns na microbiologia estão representados nos gráficos 3 e 4.

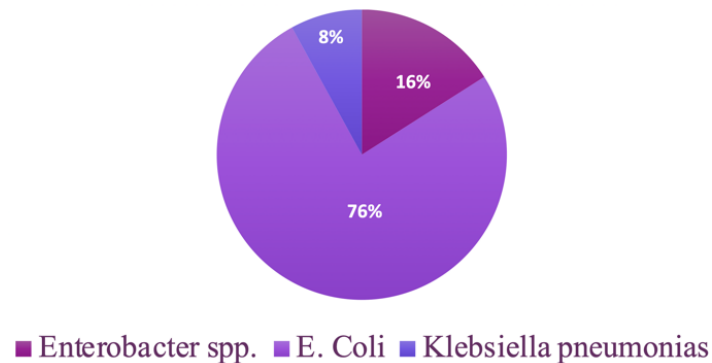


Gráfico 3: Microrganismos mais comuns na análise de urocultura.

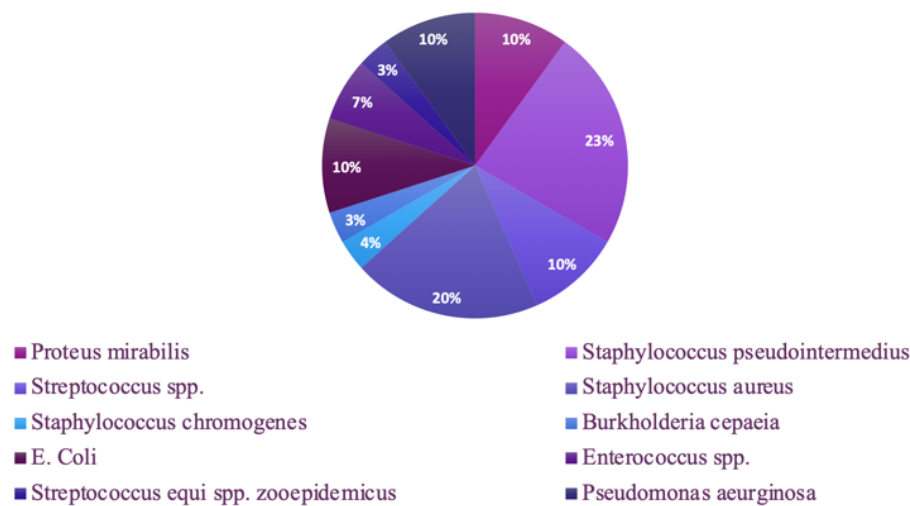


Gráfico 4: Microrganismos mais comuns na cultura de aeróbios.

Na secção das urinas, a autora realizava a análise microscópica com o técnico responsável desse departamento. O exame iniciava-se com a ampliação de 10x para uma avaliação inicial do sedimento, concentração celular e presença de agregados celular, cristais grandes, cilindros e até mesmo artefactos. Após essa primeira avaliação, eram então selecionados campos para posterior visualização com ampliação de 40x. Nesta fase, eram avaliados os seguintes componentes: células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, bactérias, cristais, cilindros, muco, entre outros.

Na secção da coprologia a autora realizava o exame das amostras fecais, avaliando a aparência geral das fezes, como consistência, cor, presença de sangue e muco. As técnicas utilizadas eram a citologia de flutuação e sedimentação, pesquisa de teste rápido de *Giardia* e *Cryptosporidium*, digestão de fezes, pesquisa de sangue oculto e coprocultura. Após terminar

o procedimento das técnicas de flutuação, sedimentação e digestão era realizada uma análise ao microscópio.

Na secção das análises bioquímicas, as amostras são centrifugadas a 4400 rotações durante 6 minutos, procedendo-se em seguida à separação do soro das células sanguíneas. Após a separação, as amostras são encaminhadas para os equipamentos automáticos correspondentes, de acordo com as análises bioquímicas solicitadas. Os resultados são enviados para os técnicos superior para validação dos resultados e posterior envio.

Após a receção das amostras, aquelas em que era solicitado um hemograma eram encaminhadas para a secção de hematologia. Os tubos de EDTA eram separados de acordo com as espécies cão, gato, cavalo, coelho, aves e bovinos. Antes de serem inseridas no aparelho de leitura XN-1000V da *Sysmex*, designado exclusivamente para uso veterinário, as amostras eram homogeneizadas e verificadas quanto à presença de coágulos. Se uma amostra apresentasse coágulo, era colocada de parte e a entidade correspondente era contactada. Após a análise de todos os resultados, estes eram enviados aos técnicos superiores para validação dos resultados e posterior envio.

Caso os resultados não fossem validados corretamente, procedia-se a uma nova leitura ou a uma correção manual. Neste processo, era feito um esfregaço sanguíneo, seguido de coloração e observação ao microscópio. As células sanguíneas da linhagem branca eram contadas utilizando a aplicação *WBC Counter* e comparadas com os resultados obtidos anteriormente pelo equipamento de contagem automática.

O departamento de citologia é composto por uma equipa de citologistas veterinários e um técnico de laboratório. Durante o tempo passado nesta área, a autora foi acompanhada por um médico veterinário de modo a aprender a analisar lâminas de citologia. Nos tempos livres do dia, de forma autónoma, a autora observava lâminas de citologia previamente diagnosticadas.

CAPÍTULO 2: INTRODUÇÃO

2.1. Patologia Digital

A patologia é uma área da biologia e medicina que se dedica ao estudo das alterações estruturais e funcionais de órgãos, tecidos e fluidos corporais. Esta desempenha um papel essencial no diagnóstico e na compreensão das doenças (O'Dowd, Bell, & Wright, 2020, p.2). Tradicionalmente, o papel do patologista consiste na análise macroscópica e microscópica de amostras biológicas, através de um microscópio ótico (Hanna & Ardon, 2023; Jahn, Plass & Moinfar, 2020). No entanto, com a introdução de novas tecnologias informáticas a patologia tem evoluído significativamente para a era digital, dando origem à patologia digital (Go, 2022).

O desenvolvimento da patologia digital começou no início da década de 1990, com a introdução de câmaras digitais em microscópios, permitindo aos patologistas capturar e partilhar imagens digitais estáticas de lâminas histológicas (Zuraw & Aeffner, 2022). Em 1999, o aparecimento de digitalizadores de imagem de lâmina inteira (WSI, do inglês “*Whole Slide Images*”), permitiu a aquisição de imagens digitais que podem ser visualizadas, interpretadas, partilhadas, armazenadas e analisadas digitalmente em várias ampliações (Baxi et al., 2022; Cho, 2022; Hanna & Ardon, 2023; Kiehl, 2022, Zuraw & Aeffner, 2022). Além disso, a patologia digital reduz a necessidade de armazenamento de lâminas físicas, eliminando o risco de deterioração das lâminas e da qualidade da coloração (Madabhushi & Lee, 2016).

Atualmente, a digitalização de WSI permite também utilizar técnicas de análise de imagem, com recurso a métodos de inteligência artificial (IA) para deteção, segmentação e diagnóstico. Esta abordagem permite interpretações mais rápidas, precisas e reproduzíveis (Bera, Schalper, Rimm, Velcheti & Madabhushi, 2019; Nam et al., 2020; Niazi et al., 2019; O'Dowd et al., 2020, p.10; Robertson, Azizpour, Smith & Hartman, 2018).

Durante a pandemia Covid-19, a necessidade de realizar trabalhos profissionais e educacionais remotamente impulsionou a utilização da patologia digital (Kiehl, 2022). Esta tem contribuído significativamente para diversas áreas, como a telepatologia, o ensino e investigação através do desenvolvimento de algoritmos (Go, 2022; Madabhushi & Lee, 2016; Zuraw & Aeffner, 2022). A telepatologia permite o acesso a imagens digitais remotamente e facilita a partilha de WSI de forma rápida e simples. Este sistema promove a colaboração entre patologistas à distância, permitindo facilmente o trabalho conjunto e a troca de conhecimentos (Bertram & Klopfleisch, 2017; Hanna & Ardon, 2023; Kiehl, 2022; Nam et al., 2020).

No ensino, a patologia digital é um excelente método alternativo e complementar à microscopia convencional (Jahn et al., 2020). Tem sido implementada em várias universidades de medicina e medicina veterinária, oferecendo uma melhor aprendizagem individual e em grupo. Esta permite a realização de exames de patologia *online*, garante a apresentação uniforme das lâminas, independentemente do tamanho da turma, é intuitiva, fácil de usar e não necessita de ajustes de iluminação ou lente (Bertram & Klopfleisch, 2017; Sakamoto et al., 2020). Além disso, reduz os custos associados ao investimento em microscópios e possibilita uma aprendizagem à distância, como seminários, *workshops* e palestras (Bertram & Klopfleisch, 2017; Webster & Dunstan, 2014; Zuraw & Aeffner, 2022).

Na investigação, a patologia digital, juntamente com as ferramentas de análise de imagem, tem sido transformadora, uma vez que, permite o desenvolvimento e automatização de algoritmos, assim como, a quantificação de biomarcadores específicos (Hanna & Ardon, 2023; Kumar, Gupta & Gupta, 2020; Madabhushi & Lee, 2016).

Apesar dos seus benefícios, a transição para a patologia digital apresenta alguns desafios. Entre eles, destacam-se: (1) o elevado investimento inicial, que inclui a aquisição de um digitalizador de lâminas e um computador que permita ao patologista observar as imagens digitalizadas (Go, 2022; Kiehl, 2022); (2) a inclusão de uma etapa da digitalização no fluxo de trabalho (Bertram & Klopfleisch, 2017); (3) o armazenamento das imagens digitais, uma vez que a dimensão dos ficheiros variam aproximadamente entre 200 megabytes a 1 gigabyte, dependendo da resolução da digitalização e do tamanho da amostra, o que requer grandes capacidades de armazenamento (Webster & Dunstan, 2014); (4) e a qualidade da digitalização, que depende diretamente da qualidade da lâmina e do digitalizador (Bera et al., 2019; Zuraw & Aeffner, 2022).

Ainda assim, a patologia digital é considerada uma das áreas mais promissoras da medicina digital, destacando-se como uma ferramenta em constante evolução no campo da patologia (Bui et al., 2019; Sucaet & Waelput, 2014, p.10).

2.2. Análise de Imagem

A histopatologia é uma área da patologia que se dedica ao estudo dos tecidos corporais, da sua organização e função (Jahn et al., 2020). A avaliação histopatológica foca-se em análises descritivas, qualitativas ou semi-quantitativas de lesões, enfrentando problemáticas como a subjetividade, a baixa reprodutibilidade e variabilidade inter e intra-observador (Bertram & Klopfleisch, 2017; Horai et al., 2019; Webster & Dunstan, 2014). No entanto, com a evolução

da patologia digital, a análise de imagem passou a ser realizada de forma automática através de WSI, permitindo resultados mais objetivos e quantitativos. Esta abordagem aumenta a reprodutibilidade, reduz a subjetividade e a variabilidade, permitindo a transição da patologia para uma ciência mais exata e quantitativa (Aeffner et al., 2019b; Bertram & Klopfleisch, 2017; Webster & Dunstan, 2014).

A análise de imagem utiliza algoritmos matemáticos e programas de processamento de imagens digitais que permitem obter informações ou características visuais relevantes, como a detecção, a identificação e segmentação de elementos específicos. Os dados obtidos são transformados em valores quantitativos (Baxi et al., 2022; Webster & Dunstan, 2014). Esta técnica é fundamental em várias áreas da medicina, como oncologia, imuno-oncologia, cardiologia, hepatologia e neurociência. Na patologia, tem sido cada vez mais utilizada na quantificação, por exemplo, de imunohistoquímica (IHC) (Aeffner, 2019b; Madabhushi & Lee, 2016). As tarefas básicas de análise de imagem têm várias aplicações na quantificação de rotina, como por exemplo, na contagem de mitoses, de linfócitos infiltrantes dos tumores (TILs) e de biomarcadores como o Ki-67. Estas tarefas, além de repetitivas e demoradas, estão sujeitas a variabilidade inter e intra-observador (Dawson, 2022).

Com os avanços tecnológicos, o aumento da disponibilidade de dados de imagens digitais e a necessidade de análises reprodutíveis, surgiu o conceito de patologia computacional (Baxi et al., 2022; Berbís et al., 2023; Rakha et al., 2021). Este conceito permite a utilização de algoritmos mais complexos, de modo a obter resultados mais precisos de forma eficiente (Baxi et al., 2022; Berbís et al., 2023; Rakha et al., 2021).

2.3. Patologia Computacional e Inteligência Artificial

A patologia computacional é uma área inovadora que utiliza a análise de imagem juntamente com técnicas de IA, como a aprendizagem de máquina (ML, do inglês “*Machine Learning*”) e aprendizagem profunda (DL, do inglês “*Deep learning*”) (Cui & Zhang, 2021; Kiehl, 2022; Robertson et al., 2018). O ML é um tipo de IA que aprende padrões a partir de exemplos, utilizando-os para prever variáveis de interesse, após a fase de aprendizagem. Por sua vez, o DL, uma evolução do ML, utiliza redes neuronais artificiais inspiradas nas redes neuronais biológicas, permitindo análises mais complexas e detalhadas (Kiehl, 2022; Robertson et al., 2018).

A escolha entre ML e DL depende da tarefa específica a desenvolver. O ML é mais indicado para tarefas simples e funciona bem com conjuntos de dados de menores dimensões

(Jan, Spangaro, Lenartowicz & Usaj, 2024). Por outro lado, o DL é mais adequado para tarefas complexas e não exige a identificação manual de características, mas requer um grande volume de dados e uma elevada capacidade de processamento (Jan et al., 2024). Por exemplo, o estudo de Campanella et al. (2019) mostrou que são necessários, pelo menos 10.000 WSI para que o algoritmo desenvolvido tenha um bom desempenho (Cui & Zhang, 2021). Contudo, as técnicas de IA não dependem apenas da quantidade dos dados, mas também da sua qualidade para desenvolver modelos com bom desempenho e precisão (Ibrahim, et al., 2019; Litjens et al., 2018; Madabhushi & Lee, 2016; Pantanowitz et al., 2018).

A IA na patologia computacional permite realizar tarefas como a classificação e a segmentação de imagens digitais. A classificação inclui, por exemplo, a distinção entre áreas tumorais e não tumorais, enquanto a segmentação consiste na deteção de elementos específicos como células, estroma, glândulas e epitélio em imagens digitais (Abels et al., 2019). As suas principais aplicações na patologia são: (1) o apoio ao diagnóstico, como a localização de células em mitose (Kiehl, 2022); (2) deteção e classificação de lesões (Barisoni, Lafata, Hewitt, Madabhushi & Balis, 2020; Kiehl, 2022); (3) segmentação e quantificação de parâmetros histológicos e alterações estruturais (Barisoni et al., 2020; Heinz, Echle, Foersch, Bychkov & Kather et al., 2022); (4) deteção de células (Heinz et al., 2022); (5) avaliação de biomarcadores, por exemplo, o biomarcador de proliferação celular Ki-67 e o recetor do fator de crescimento epidérmico humano tipo-2 (HER-2) no cancro da mama (Berbís et al., 2023; Cui & Zhang, 2021); (6) desenvolvimento de biomarcadores; (7) otimização dos fluxos de trabalho, como o controlo de qualidade (Berbís et al., 2023; Kiehl, 2022); (8) entre outros.

Assim, torna-se possível aceder a informações que não eram acessíveis através da microscopia convencional (Barisoni et al., 2020).

2.4. Ferramentas de Análise de imagem e Programas de Código Aberto

O trabalho colaborativo entre cientistas informáticos e patologistas é essencial para identificar e adaptar as melhores soluções computacionais para problemas biológicos específicos (Robertson et al., 2018). Contudo, muitos cientistas na área das ciências biológicas não possuem o conhecimento, a experiência e o tempo necessários para desenvolver métodos avançados (Wang, Yan & Wei, 2018). Para ultrapassar a limitação entre a informática e a biologia, foram desenvolvidas plataformas de programas de código aberto que tornam os métodos computacionais mais acessíveis e fáceis de utilizar (Bankhead et al., 2017; Levet et al., 2021; Wang et al., 2018).

O desenvolvimento de programas de código aberto tem desempenhado um papel fundamental, uma vez que, promovem o desenvolvimento e a partilha de soluções de análise personalizadas, como *plug-ins*, *scripts* e *Workflows*, melhorando a qualidade e a reprodutibilidade dos dados (Bankhead et al., 2017; Sikpa et al., 2019; Wang et al., 2018). Além disso, o desenvolvimento de *Plug-ins* ou de extensões para plataformas existentes, como *ImageJ*, *Fiji* e *CellProfiler*, facilitam a adaptação dos utilizadores, evitando a necessidade de aprender programas completamente novos (Levet et al., 2021; Sikpa et al., 2019). No entanto, com a constante evolução do panorama computacional e biológico, pode ser necessário o desenvolvimento de novos programas de análise de imagem de código aberto, para responder às novas necessidades (Levet et al., 2021).

O suporte a estas ferramentas depende de utilizadores experientes que partilham exemplos, documentação e recursos online. A maioria dos programas de código aberto são acompanhados por tutoriais e guias práticos que orientam os principiantes nos princípios básicos do programa. Além disso, existe um fórum de imagem para a comunidade científica - *Scientific Community Image Forum* - para facilitar a troca de conhecimento e discussão sobre análise de imagem (Bankhead, 2022; Levet et al., 2021).

2.4.1. QuPath

Como referido anteriormente, existem vários programas de código aberto, no entanto, nenhum deles funciona adequadamente com WSI e suporta imagens de grandes dimensões. Assim, os utilizadores acabam por recorrer a soluções alternativas, como a redução da resolução e corte de imagens (Bankhead et al., 2017; Porter, Din, Bankhead, Oniscu & Arends, 2023).

Por isso, em 2017, foi desenvolvido um sistema denominado *QuPath*, abreviatura de *Quantitative Pathology*, desenvolvido por Peter Bankhead, que permite a análise de WSI, com maior eficiência (Bankhead et al., 2017; Porter et al., 2023).

O *QuPath* é um programa de fácil utilização que permite a análise de imagens de IHC, de fluorescência e de hematoxilina e eosina (H&E) (Bankhead et al., 2017). Com este programa é possível realizar deteções de células e tecido, utilizar o ML para a classificação de objetos e *pixels*, em WSI, sem a necessidade de reduzir o tamanho das imagens (Acs, Rantalainen, & Hartman, 2020; Bankhead et al., 2017). Esses objetos correspondem a regiões ou estruturas dentro de uma imagem, que podem ser criadas através de ferramentas de desenho ou de algoritmos automáticos permitindo a anotação de regiões de interesse (ROI do inglês “*Region of interest*”) (Bankhead et al., 2017; Pavone et. al, 2024).

Uma das funcionalidades mais utilizadas é o *Threshold*, que permite uma análise de *pixels* baseada em parâmetros de intensidade, ou seja, permite separar áreas com diferentes intensidades, sendo útil para definir o ROI e medir áreas específicas. Este método oferece uma forma eficiente de criar anotações sem a necessidade de desenhar manualmente todas as áreas (Bankhead et al., 2017).

O QuPath permite a detecção de células através de um algoritmo automático de segmentação celular. Com esta funcionalidade deixa de ser necessário a contagem manual de células, tornando o processo mais rápida e os resultados mais reprodutíveis e padronizados (Acs et al., 2020; Bankhead et al., 2017). Além disso, permite determinar a percentagem de células tumorais que são positivas, coradas com 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), e células não tumorais, coradas com hematoxilina (Bankhead et al., 2017).

Este programa também disponibiliza funcionalidades de ML, como a classificação de objetos e *pixels*, que permitem treinar o sistema com base em exemplos fornecidos pelo utilizador. O treino do classificador de objetos e *pixels* é feito através da seleção de pequenas anotações na imagem que correspondem às diferentes classes de interesse, como por exemplo tecido tumoral, estroma ou necrose (Bankhead et al., 2017). O número de anotações depende da complexidade da análise e da variação de coloração. O ajuste dos parâmetros e a adição de mais anotações permite que o classificador tenha um maior desempenho e precisão (Sakamoto et al., 2020; Zuraw & Aeffer, 2022).

Além disso, é possível treinar um classificador com regiões de diferentes imagens de um projeto. Esta abordagem torna o classificador mais completo e abrangente, permitindo a resposta a uma maior diversidade de características (Bankhead et al., 2017; Porter et al., 2023).

Outra funcionalidade importante é o processamento em lote, ou seja, o QuPath permite a análise automatizada em grandes quantidades de imagens, sem ser necessário aplicar os parâmetros individualmente em cada WSI. E apresenta ainda a funcionalidade *script*, que permite a personalização do fluxo de trabalho e da análise. Os *scripts* criados podem ser utilizados noutros projetos semelhantes, o que facilita a padronização da análise numa grande quantidade de amostras (Bankhead et al., 2017; Loughrey et al., 2018; Porter et al., 2023).

Em conclusão, este programa de código aberto está descrito como sendo uma ferramenta acessível e eficiente para a análise de imagem que melhora a velocidade, a precisão e a reprodutibilidade das análises patológicas utilizando WSI (Loughrey et al., 2018).

2.5. Estereologia

A histomorfometria bidimensional permite obter informações quantitativas sobre tecidos ou estruturas num corte histológico bidimensional. No entanto, os resultados referem-se apenas à secção histológica analisada, o que pode não ser representativo de todo o tecido. Esta limitação leva a suposições que podem ser fontes de viés (Brown, 2017a; Brown, 2017b). Por exemplo, a histomorfometria assume que o órgão ou região de interesse são homogêneos e que a secção analisada representa adequadamente o tecido tridimensional, não considerando a variabilidade presente na amostra. Além disso, na histomorfometria, as secções analisadas provêm de amostras de tecido não aleatórias, o que diminui a probabilidade de algumas células ou estruturas serem incluídas na análise (Brown, 2017a).

Ao contrário da histomorfometria, a estereologia oferece uma abordagem rigorosa e precisa para obter estimativas tridimensionais (3D) (Brown, 2017a; Brown, 2017b). O termo ‘estereologia’ deriva do grego ‘*Stereos*’, que significa ‘sólido’, e refere-se à análise de objetos em 3D (Knudsen et al., 2021). Representa um método matemático e estatístico e utiliza conceitos da teoria geométrica e de probabilidades, o que possibilita a obtenção de informações 3D a partir de secções 2D (Brown et al., 2017a; Knudsen et al., 2021).

A estereologia é o método de referência para a patologia quantitativa devido ao seu rigoroso método de amostragem sistemática, uniforme e aleatória (SURS do inglês *systematic uniform random sampling*). Este método garante que cada estrutura de interesse do órgão tenha a mesma probabilidade de ser colhida e quantificada, independentemente do tamanho, forma, distribuição ou orientação espacial (Brown, 2017a; Brown, 2017b; Knudsen et al., 2021; Webster & Dunstan, 2014).

A estereologia permite a quantificação de vários parâmetros, sendo os mais comuns: o volume, o número, o comprimento e a área de superfície. De todos, o mais simples é a quantificação do volume. Para a quantificação do volume é necessário definir um intervalo de amostragem (T), na qual a primeira seção é feita aleatoriamente (RS) e as secções seguintes são feitas em intervalos regulares de T, ao longo do tecido, de modo a serem obtidos 8 a 10 secções por órgão (Figura 2) (Brown et al., 2017a; Knudsen et al., 2021). Para uma determinação precisa do volume do objeto, o princípio de *Cavalieri* ($V = T \times a/p \times \sum P_i$) é considerado o método mais preciso e livre de viés (Brown, 2017b; Knudsen et al., 2021).

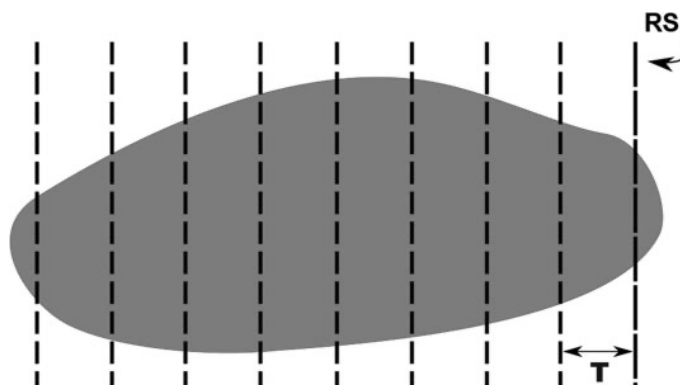


Figura 2: Seccionamento de um órgão por amostragem aleatória uniforme e sistemática, em que (T) é o intervalo de amostragem e (RS) o início aleatório da primeira secção (Brown, 2017b).

A principal vantagem deste método é o facto de utilizar técnicas rigorosas para obter informações detalhadas 3D sobre todo o tecido, complementado a análise tradicional de imagens 2D, e, assim, fornecer resultados precisos e absolutos (Aeffner et al., 2019a; Aeffner et al., 2019b). No entanto, é um método que apresenta algumas limitações, uma vez que é um procedimento demorado que precisa de profissionais, como um patologista com experiência em estereologia e um técnico de histologia treinado para este tipo de preparações das amostras. Além disso, é necessário a utilização de programas de computador específicos, muitos dos quais possuem custos elevados, não estando acessíveis a todos (Aeffner et al., 2019a; Aeffner et al., 2019b; Brown, 2017a; Brown, 2017b).

2.6. Contexto e Objetivos do Estudo

A patologia experimental distingue-se da patologia tradicional principalmente pelo seu objetivo. Enquanto a patologia tradicional foca-se no diagnóstico das lesões presentes no animal, na patologia experimental na maior parte dos casos o diagnóstico já é conhecido, são os investigadores que induzem a doença nos modelos. O objetivo principal aqui é comparar grupos, como o tratado e o não tratado, da forma mais objetiva possível.

No entanto, a avaliação histopatológica associada a estes estudos experimentais, tem algumas problemáticas, como a viés que acontece sempre associado à subjetividade do observador ou entre observadores, a baixa reprodutibilidade, o tempo elevado de cada análise, o que dificulta quando existe uma grande quantidade de amostras e a representatividade através de cortes bidimensionais, especialmente em estudos quantitativos e que pode dar resultados

pouco corretos. Essas limitações destacam a importância de métodos mais objetivos e eficientes que possam melhorar a precisão e a reprodutibilidade e reduzir a subjetividade.

Este estudo combinou duas metodologias: a estereologia, considerada o método de referência para a patologia quantitativa devido aos seus princípios de amostragem e análise de estruturas tridimensionais, e a análise de imagem, uma tecnologia que tem evoluído devido à sua velocidade e reprodutibilidade.

O objetivo deste estudo foi criar uma abordagem que fosse tão precisa quanto a estereologia e tão rápida quanto a análise de imagem, integrando os princípios de amostragem da estereologia para minimizar o viés da amostragem.

Além disso, apesar dos avanços na análise de imagem, a questão da representatividade da amostra continua a ser pouco abordada, e por isso pretendeu-se também verificar se é ou não adequado confiar apenas em secções bidimensionais para representar com precisão uma lesão tridimensional.

O estudo apresentado visa responder às seguintes questões:

- 1) Os classificadores descritos oferecem uma alternativa confiável e acessível para a análise histopatológica automatizada?
- 2) Os classificadores descritos para volume apresentam resultados comparáveis à estereologia, o método de referência para a patologia quantitativa?
- 3) É adequado confiar apenas em secções bidimensionais para representar com precisão uma lesão tridimensional?

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório de histopatologia do Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC). Foram utilizadas lâminas de projetos de investigação realizados anteriormente no departamento, permitindo o reaproveitamento desse material sem a necessidade de adquirir novas lâminas.

Foram analisados cinco murganhos de um projeto de melanoma pulmonar metastático, estudo 1, e cinco murganhos de um projeto de fibrose cardíaca, estudo 2.

Cada pulmão foi fixado em formalina, embebidos em parafina e depois seccionados num intervalo constante e uniforme de 200µm com um início aleatório, produzindo um total de 8 seções de cada pulmão.

Os corações foram fixados em formalina e embebidos em parafina. Foram realizados cortes exaustivos a 5µm e foram colhidos a cada 100 cortes, resultando num total de 10 cortes por coração, separados por 500µm. Todas as seções foram coradas com H&E e Tricrómico de Masson (TM).

3.2. Imagens para Quantificação

As lâminas foram digitalizadas através do digitalizador *NanoZoomer (Hamamatsu)*, de modo a ser obtido uma WSI.

3.3. Estereologia

O procedimento de estereologia foi realizado previamente a este estudo por um patologista experimental, através do programa *Visopharm*, na Unidade de Histopatologia do IGC.

Os volumes pulmonares, os volumes de metástases, a percentagem metástase/pulmão, os volumes do miocárdio ventricular – referido ao longo da dissertação como volume ventricular -, os volumes de fibrose e a percentagem fibrose/ventrículo foram obtidos de acordo com o princípio de *Cavalieri* ($V = T \times a/p \times \sum \pi$). Em que T é o espaçamento entre lâminas, π é o número de pontos na estrutura de interesse e (a/p) é a área associada a cada ponto.

A percentagem de pulmão afetado pela metástase é calculada dividindo o número de pontos que atingiram a metástase pelo número de pontos que atingiram o pulmão ($V =$

π (Metástase)/ π (Pulmão)x100). O mesmo acontece para a percentagem de ventrículo ocupada por fibrose, em que é calculada dividindo os pontos que atingem a fibrose pelos pontos que atingem o ventrículo ($V = \pi$ (Fibrose)/ π (Ventrículo)x100).

3.4. Análise de Imagem

Para o procedimento de análise de imagem utilizou-se o programa gratuito *QuPath*, versão 0.5.0. O *QuPath* foi escolhido para este estudo porque permite uma análise digital de WSI e o treino de classificadores através de *Machine Learning*.

Em ambos os estudos, cada animal foi tratado como um projeto individual. Primeiramente, criou-se uma pasta vazia no ambiente de trabalho, de seguida selecionou-se ‘*Create Project*’ e ‘*Add image*’ para criar um projeto novo e importar todos os WSI de cada caso em questão, respetivamente.

3.4.1. Estudo 1 - Quantificação de Metástases Pulmonares

3.4.1.1. *QuPath*

No estudo 1 foram utilizados WSI de alta resolução, provenientes de secções de tecido de melanoma pulmonar coradas com H&E. As lâminas foram carregadas no *QuPath* como imagens de campo claro (H-H&E).

3.4.1.1.1. Normalização de Cores

A normalização de cores é uma etapa muito importante, uma vez que a avaliação histopatológica utiliza várias técnicas de coloração para identificar componentes celulares ou extracelulares específicos, e esta aplicação não é totalmente uniforme. Embora os patologistas consigam interpretar as variações de coloração, estas podem comprometer o desempenho das ferramentas computacionais. Por isso, este procedimento é fundamental para diminuir as diferenças de coloração e garantir a uniformidade nas imagens (Sucaet & Waelput, 2014, p.45).

Assim, iniciou-se a análise com a normalização de cores automática através do comando ‘*Analyze*’ → ‘*Estimate Stain Vectors*’ para otimizar os vetores de coloração, como ilustrado na figura 3.

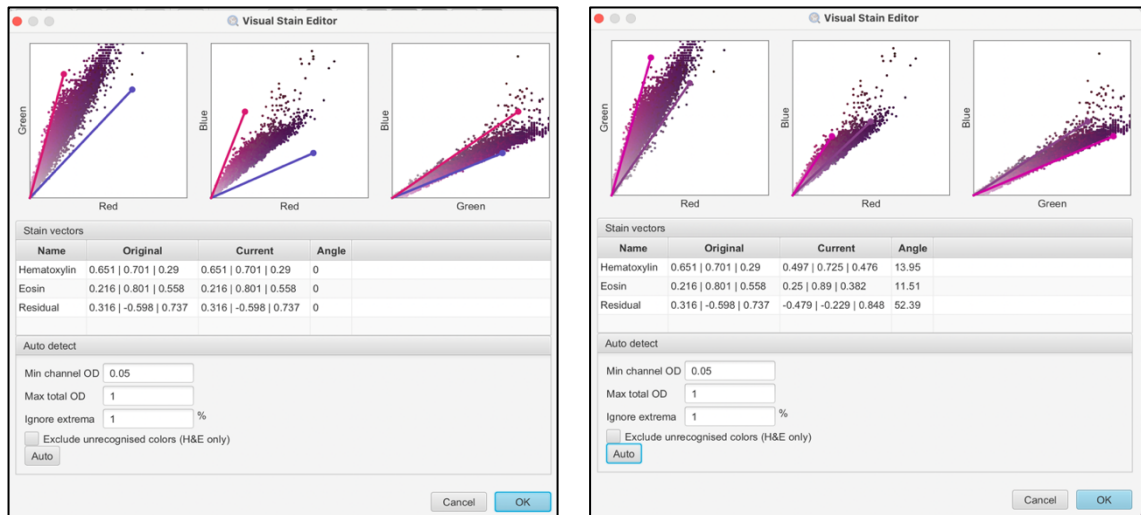


Figura 3: Normalização de cores automática para corrigir a variabilidade de cores entre imagens. Original da autora.

3.4.1.1.2. Desenvolvimento do Classificador para a Região Pulmonar

Através do comando ‘*Classify*’ → ‘*Pixel Classification*’ → ‘*Create Threshold*’ foi criado um classificador baseado em *Thresholds*, ou seja, o utilizador define um limite acima ou abaixo do qual todos os *pixels* da imagem são classificados, neste caso, como pulmão.

Os parâmetros deste classificador foram ajustados conforme representado na tabela 1.

Tabela 1: Configurações para o desenvolvimento do classificador da região pulmonar, utilizando o *QuPath*.

<i>Create Thresholder</i>	
<i>Resolution</i>	<i>Extremely low (32.00 µm/px)</i>
<i>Channel</i>	<i>Red</i>
<i>Prefilter</i>	<i>Guassian</i>
<i>Smoothing Sigma</i>	<i>2</i>
<i>Threshold</i>	<i>211</i>
<i>Above Threshold</i>	<i>Unclassified</i>
<i>Below Threshold</i>	<i>Region</i>
<i>Region</i>	<i>Everywhere</i>

Após o ajuste dos parâmetros o classificador foi guardado com o nome “Região Pulmonar”, de forma a ser aplicado em todo o projeto, garantido consistência e reprodutibilidade na análise.

A partir do classificador todo o tecido pulmonar foi anotado, através da criação de ROIs. Isto permite obter valores na região anotada, como área, intensidade das colorações, perímetros, entre outras.

Como a região pulmonar tem áreas de brônquios e bronquíolos que aparecem a branco, o *QuPath* não os contabiliza na região pulmonar, como se verifica na figura 4A, representado com setas a amarelo. Para corrigir isso, utilizou-se um comando '*Fill Holes*' que permite incluir regiões que, de outra forma não seriam contabilizadas.

Além disso, em algumas lâminas, foi necessário utilizar a funcionalidade '*Split By Line*', que consiste em traçar uma linha sobre a imagem para dividir uma região de interesse em duas ou mais áreas. Ou seja, no caso ilustrado na figura 4, utilizou-se a ferramenta linha, sinalizado a vermelho (D), porque houve a necessidade de dividir a anotação criada em A em três anotações diferentes, uma vez que, numa das seções, seta representada a preto em A, o fundo branco não é brônquio ou bronquíolo. Sem esta funcionalidade ao aplicar o comando '*Fill Holes*', incluiria também áreas de fundo branco.

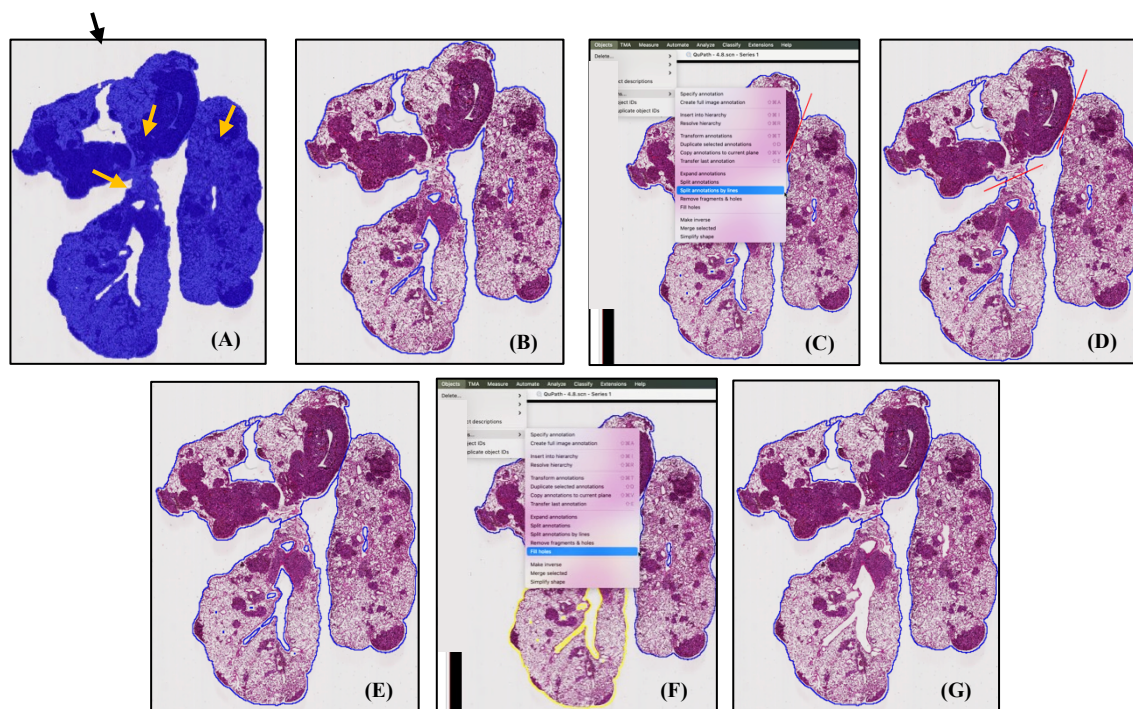


Figura 4: (A) Imagem representativa da aplicação dos parâmetros para a quantificação da área pulmonar. (B) Anotação da área pulmonar. (C) Passos para o comando '*Split by Line*'. (D) Ilustração da zona onde foi aplicado a ferramenta linha. (E) Resultado após o comando '*Split by Line*'. (F) Passos para o comando '*Fill Holes*'. (G) Anotação final da área pulmonar, após a aplicação dos comandos descritos. Original da autora.

3.4.1.1.3. Desenvolvimento do Classificador para a Quantificação de Metástases Pulmonares

Na quantificação de metástases pulmonares, utilizou-se o comando ‘*Classify*’ → ‘*Pixel Classification*’ → ‘*Create Threshold*’ e ajustaram-se os parâmetros da tabela conforme necessário, indicado na tabela 2.

Tabela 2: Configurações para o desenvolvimento do classificador para a quantificação de metástases pulmonares, utilizando o *QuPath*.

<i>Create Threshold</i>	
<i>Resolution</i>	<i>Very low (16.00 $\mu\text{m}/\text{px}$)</i>
<i>Channel</i>	<i>Red</i>
<i>Prefilter</i>	<i>Guassian</i>
<i>Smoothing Sigma</i>	<i>5</i>
<i>Threshold</i>	<i>154</i>
<i>Above Threshold</i>	<i>Stroma</i>
<i>Below Threshold</i>	<i>Tumor</i>
<i>Region</i>	<i>Any Annotation ROI</i>

O classificador criado foi guardado com a designação de ‘Metástases Pulmonares’, de forma a ser aplicado no restante projeto, garantido consistência e reprodutibilidade na análise.

3.4.1.1.4. Automatização do Processo de Detecção e Quantificação de Metástases Pulmonares

O *QuPath* guarda automaticamente todos os comandos realizados num *workflow*, permitindo a criação de um *script* com todos esses passos para posterior utilização e automatização da análise para todo o projeto. Este *script* foi guardado e aplicado nos restantes casos de melanoma pulmonar, utilizando o comando ‘*Automate*’ → ‘*Script Editor*’ → ‘*Run for Project*’, como representado na figura 5.

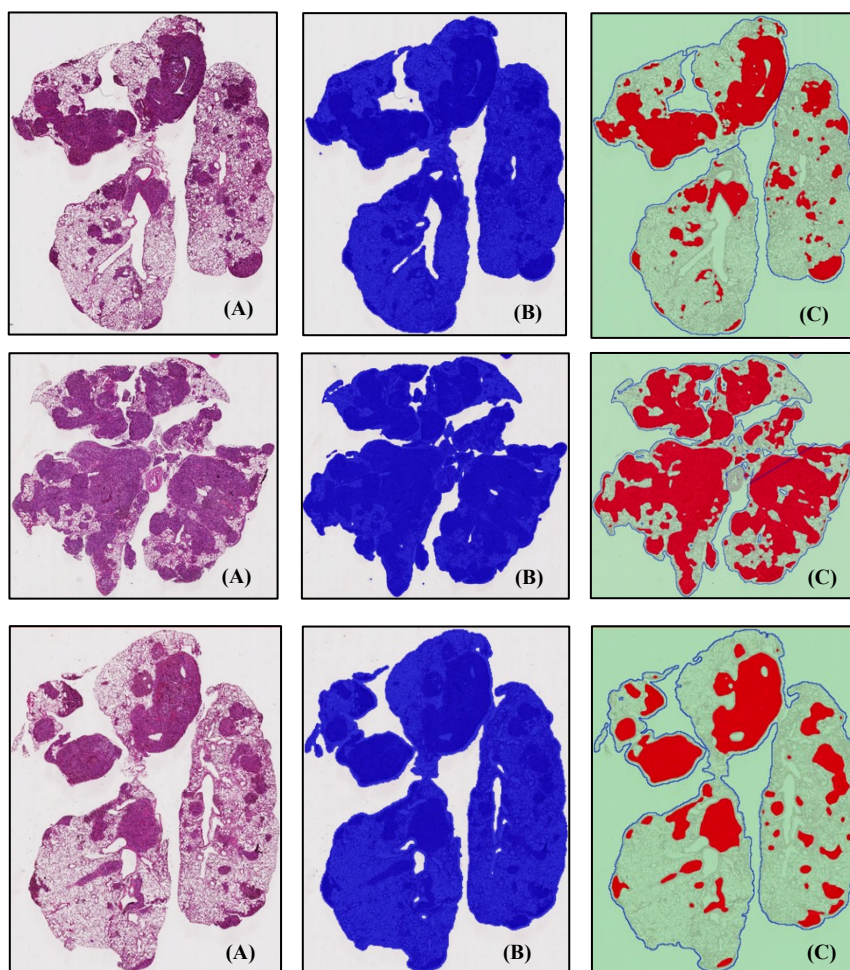


Figura 5: Aplicação do *script* em todo o projeto e nos restantes projetos de melanoma estudados neste estudo. (A) Exemplo de imagens de diferentes projetos. (B) Aplicação do classificador desenvolvido para a quantificação da região pulmonar. (C) Aplicação do classificador desenvolvido para a quantificação de metástases pulmonares. Original da autora.

3.4.2. Estudo 2 - Quantificação de Fibrose Cardíaca

3.4.2.1. *QuPath*

No estudo 2 as lâminas foram carregadas no programa *QuPath* como tipo de imagem ‘*Other*’, uma vez que, a coloração utilizada foi o TM.

Inicialmente, uma nova imagem de treino foi criada manualmente e adicionada ao projeto. A imagem de treino foi criada a partir de 10 regiões representativas de tecido, com tamanho médio de $500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$.

3.4.2.1.1. Normalização de Cores

Utilizando a imagem de treino criada, procedeu-se à normalização automática de cores. Desenhou-se uma pequena anotação com a ferramenta retângulo numa região representativa, de seguida utilizou-se o comando ‘Analyze’ → ‘Estimate Stain Vectors’ para otimizar os vetores, como ilustrado na figura 6.

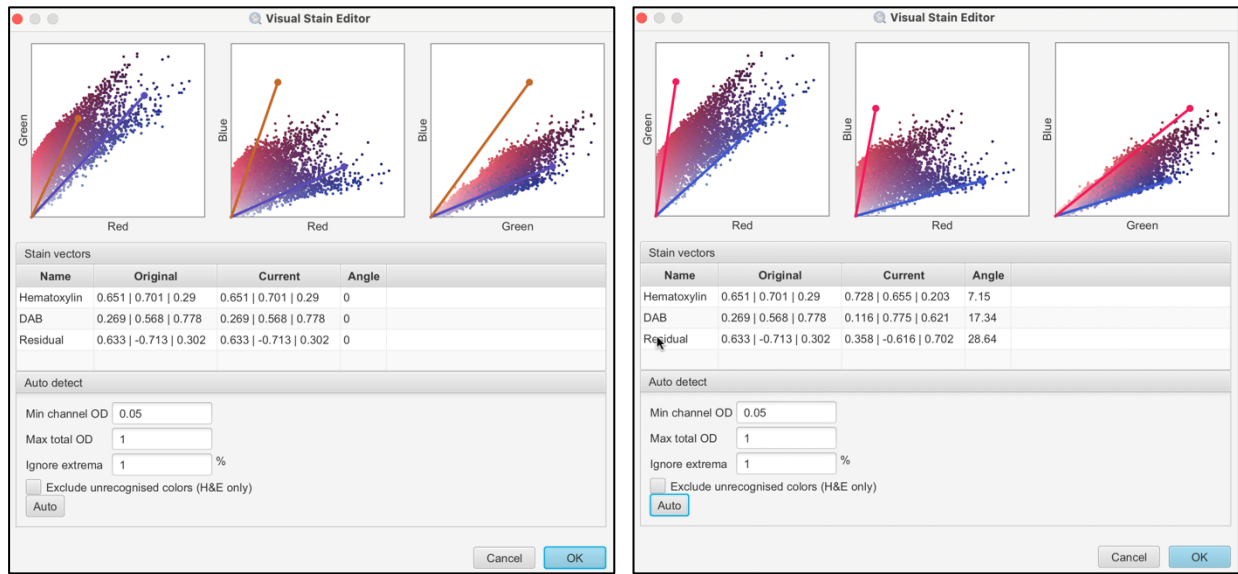


Figura 6: Normalização automática de cores para corrigir a variabilidade de cores entre imagens. Original da autora.

3.4.2.1.2. Desenvolvimento do Classificador para a Quantificação de Fibrose Cardíaca

Para este estudo foi utilizado ML. O classificador de *pixels* criado foi treinado para detetar quatro componentes: 1) Área de tecido constituído por miocárdio normal; 2) Áreas de Fibrose; 3) Núcleos; 4) Fundo branco. Para o treino foi necessário a anotação das componentes até que o classificador fosse capaz de detetá-los visualmente de forma confiável, para isso utilizou-se a ferramenta pontos.

Anotou-se 328 pontos para fibrose, 322 para núcleos, 324 para o miocárdio e 46 para o fundo branco. Depois recorreu-se ao comando ‘Classify’ → ‘Pixel Classification’ → ‘Train Pixel Classifier’. Foi selecionada a imagem correspondente à imagem treino e clicou-se em ‘Live Prediction’, para ser visualizado o que estava a ser detetado.

Posto isto, ajustou-se alguns parâmetros conforme indicado na tabela 3.

Tabela 3: Configurações para o desenvolvimento do classificador para a quantificação de fibrose cardíaca, utilizando o *QuPath*.

<i>Pixel Classifier</i>	
<i>Classifier</i>	<i>Artificial neural network</i>
<i>Resolution</i>	<i>Very High (0.44 μm /px)</i>
<i>Features</i>	<i>Default Multiscale Features</i>
<i>Output</i>	<i>Classification</i>
<i>Region</i>	<i>Everywhere</i>

Depois de concluído o classificador foi guardado como o nome ‘Fibrose Cardíaca’, para ser possível aplicar no projeto, garantido consistência e reprodutibilidade na análise. (Figura 7). De seguida, a imagem de treino utilizada foi fechada.

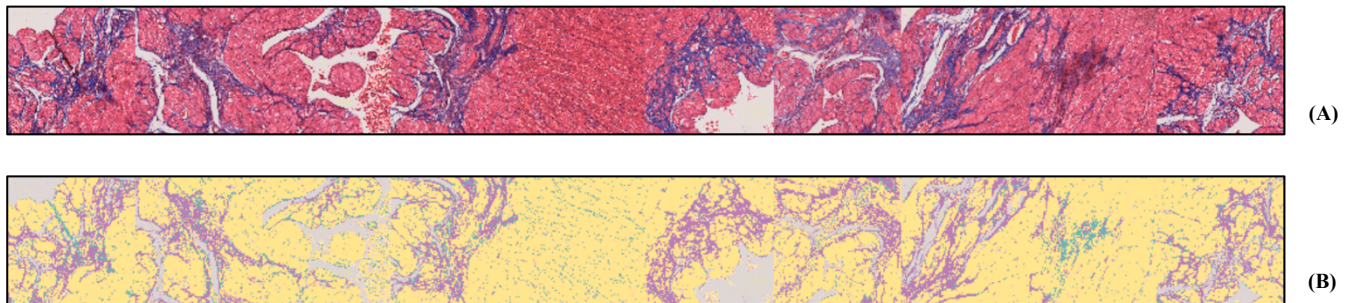


Figura 7: Imagem treino criada no *QuPath*: (A) Imagem original sem aplicação dos parâmetros. Áreas de fibrose estão coradas a azul. (B) A mesma imagem treino após a aplicação dos parâmetros para a identificação de áreas de fibrose/coloração azul. A cor roxa representa a fibrose, a cor azul os núcleos e a cor amarela o miocárdio. Original da autora.

3.4.2.1.3. Desenvolvimento do Classificador para a Região Ventricular

Para se obter a área total de cada ventrículo, utilizou-se os mesmos métodos descritos para o desenvolvimento do classificador para a região pulmonar.

Os parâmetros foram ajustados conforme indicado na tabela 4.

Tabela 4: Configurações para o desenvolvimento do classificador para a região ventricular, utilizando o *QuPath*.

<i>Create Threshold</i>	
<i>Resolution</i>	<i>Extremely low (32.00 μm/px)</i>
<i>Channel</i>	<i>Average Channels</i>
<i>Prefilter</i>	<i>Guassian</i>
<i>Smoothing Sigma</i>	<i>2</i>
<i>Threshold</i>	<i>205</i>
<i>Above Threshold</i>	<i>Unclassified</i>
<i>Below Threshold</i>	<i>Region</i>
<i>Region</i>	<i>Everywhere</i>

O classificador foi guardado como ‘Região Ventricular’ de modo a ser possível aplicar em todo o projeto, garantido consistência e reprodutibilidade na análise.

Posto isto, as detecções feitas pelo classificador foram convertidas em objetos do tipo anotação com o comando ‘*Create Object*’ para ser possível obter os valores de toda a região de pulmão. Definiu-se um tamanho mínimo de objeto, 200000 μm^2 de modo a ignorar objetos mais pequenos que esse valor (Figura 8).

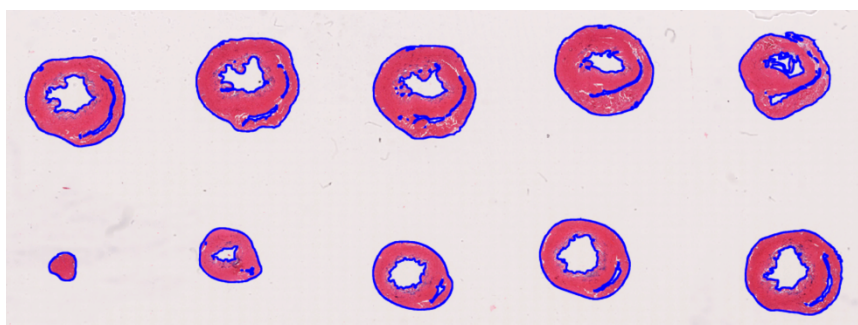


Figura 8: Imagem representativa da aplicação do classificador desenvolvido para a quantificação da região ventricular. Original da autora.

3.4.2.1.4. Automatização do Processo de Detecção e Quantificação de Fibrose Cardíaca

Os mesmos métodos descritos anteriormente foram utilizados para a automatização da análise. O script criado foi aplicado em todas as imagens do projeto.

Para a quantificação da fibrose, houve a necessidade de criar uma região de interesse. Através da ferramenta pincel selecionou-se a zona a ser estudada, como representado na figura 8B. Após a seleção da região de interesse, em todos os cortes, aplicou-se o classificador de *pixels* desenvolvido para a quantificação de fibrose cardíaca, de modo a ser detetado, área de tecido constituído por miocárdio normal; áreas de Fibrose e núcleos, figura 9(C) e figura 10.

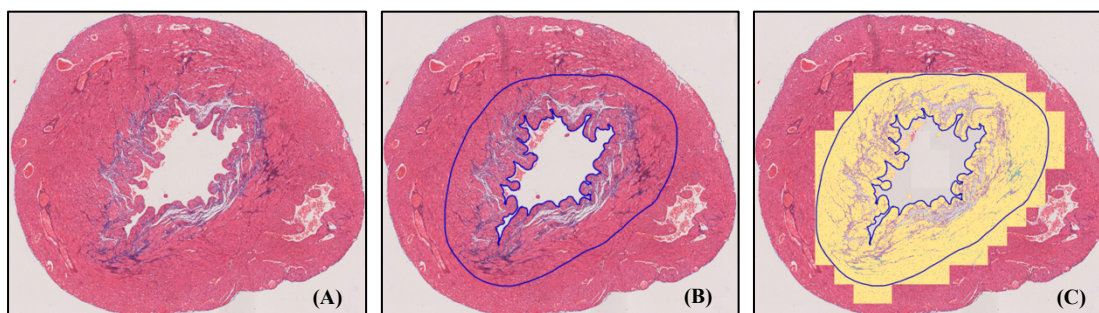


Figura 9: (A) Exemplo de um corte de coração. (B) Seleção da região de interesse. (C) Aplicação do classificador para a quantificação de fibrose.

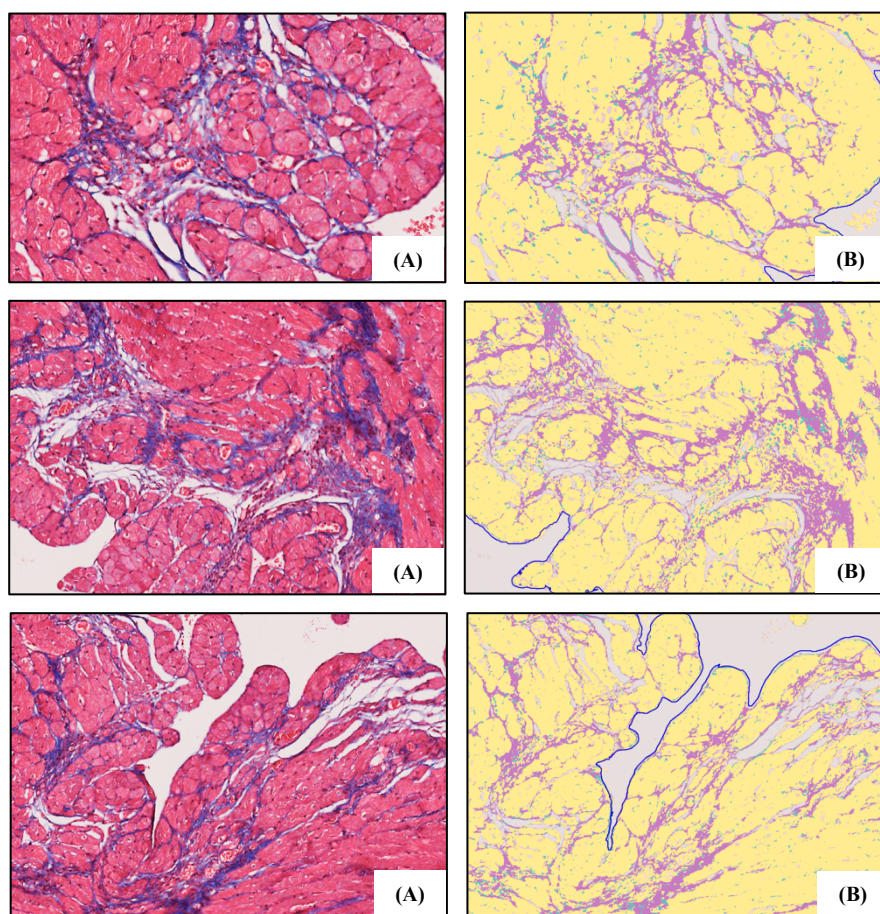


Figura 10: Comparação após aplicação do classificador para a quantificação de fibrose cardíaca. (A) Imagem Original. (B) Aplicação do classificador para a quantificação de fibrose cardíaca. Original da autora.

3.6. Exportação dos resultados do Estudo 1 e 2

Os resultados foram transferidos do *QuPath* através do comando ‘*Measurement*’ → ‘*Export Measurements*’ para o *Microsoft Excel*.

No estudo 1 as estruturas analisadas foram “Metástases Pulmonares” e “Região Pulmonar” e no estudo 2 foram “Fibrose Cardíaca” e “Região Ventricular”.

Como os resultados obtidos pelo método de estereologia são apresentados em milímetros cúbicos (mm^3) e os da análise de imagem em micrômetro quadrado (μm^2), foi necessário converter a unidade de medida de μm^2 para mm^3 para permitir a comparação entre os métodos. Os valores obtidos multiplicaram-se por 10^{-6} e por 0,5 ou 0,2 correspondente à espessura T, respetivamente para o estudo das metástases pulmonares e fibrose cardíaca, para obter um valor tridimensional.

3.6.1. Comparação de Ambas as Metodologias

As áreas de “pulmão” ou “ventrículo” e de “metástases pulmonares” ou “fibrose cardíaca” em todos os cortes de cada de cada animal foram somadas utilizando a função “Soma” do *Microsoft Excel*.

Para calcular a percentagem afetada, dividiu-se os valores de “metástases pulmonares” ou “fibrose cardíaca” obtido sobre o volume total de “pulmão” ou “ventrículo” e multiplicou-se o resultado por 100.

3.6.2. Cortes Individuais

Os resultados foram organizados por animal e pelos cortes correspondentes. Para o cálculo da percentagem afetada, dividiu-se o volume de “metástases pulmonares” ou “fibrose cardíaca” sobre o volume de “pulmão” ou “ventrículo”, de cada lâmina, e multiplicou-se o resultado por 100.

3.7. Análise Estatística

O tratamento estatístico de dados foi realizado através do programa IBM® SPSS Statistics (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 30.0.0, do *GraphPad Prism* versão 10.3.1 e do *Microsoft Excel*.

Os dados foram inseridos numa folha de cálculo no programa *Microsoft Excel* para uma avaliação geral dos resultados obtidos neste estudo. Procedeu-se à análise estatística descritiva analisando-se a média, a mediana, o desvio padrão, o mínimo e o máximo de cada método, para avaliar a distribuição dos dados obtidos pelo programa *QuPath* e pelo método de estereologia. Avaliou-se o volume pulmonar, o volume de metástases, a percentagem metástase/pulmão, o volume ventricular, o volume de fibrose e a percentagem fibrose/ventrículo.

Através do programa SPSS, ambos os métodos, estereologia e análise de imagem, foram analisados estatisticamente quanto à concordância. O teste de *Shapiro-Wilk* foi realizado para avaliar a normalidade. Uma vez que não foram cumpridos os pressupostos para a realização de testes paramétricos e dado o pequeno tamanho da amostra (n=5), realizou-se testes não paramétricos. O teste utilizado foi o teste T de *Wilcoxon* para comparação de medianas

entre os dois métodos. Para além disso, foi realizado o teste de *Spearman* para comparar a correlação entre os dados obtidos no *QuPath* e estereologia.

Para se verificar se é adequado, ou não, confiar apenas em cortes 2D para representar com precisão uma estrutura 3D, calculou-se o coeficiente de variação (CV), através do programa *GraphPad Prism*, que permite avaliar a variabilidade dos dados. Além disso, para identificar a possível presença de *outliers*, foi realizado o método de ROUT.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

De forma a validar o classificador criado para a quantificação de metástases pulmonares e fibrose cardíaca, procedeu-se à comparação dos resultados obtidos com um método de referência na patologia quantitativa, a estereologia. Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos bem como a análise estatística que avalia a correlação entre os dois métodos, de forma a verificar a validade os classificadores propostos.

Serão também apresentados os resultados referentes aos cortes individuais, e a respetiva análise estatística.

4.1. Resultados da Quantificação de Metástases Pulmonares (Estudo 1)

4.1.1. Comparação de Ambas as Metodologias

Foram avaliados o volume pulmonar, o volume de metástases e a percentagem metástase/pulmão para ambos os métodos. Os resultados da análise estatística estão apresentados na tabela 5. Para os parâmetros em estudo, volume pulmonar, volume de metástases e percentagem metástase/pulmão, as médias, as medianas, o mínimo e o máximo, de ambos os métodos, são muito semelhantes. O teste de *Wilcoxon* indicou que os valores de *p* para todos os parâmetros analisados - volume pulmonar, volume de metástases e percentagem metástase/pulmão - são superiores a 0,05. Isto indica que não há diferenças, estatisticamente significativas, entre os dois métodos.

Tabela 5: Comparação da análise estatística dos resultados obtidos pelo programa *QuPath* e pelo método de estereologia, para o volume pulmonar, o volume metástases e a percentagem metástases/pulmão.

	<i>QuPath</i>	Estereologia	Valor p _(a)
Volume Pulmonar			
Média ± Desvio Padrão	136,5±51,9	128,9±59,8	0,080
Mediana	130,3	122,6	
Mínimo	76,9	63,18	
Máximo	215,1	225,2	
Volume Metástase			
Média ± Desvio Padrão	61,4 ± 41,0	59,0±40,8	0,225
Mediana	50,2	52,2	
Mínimo	19,3	16,9	
Máximo	121,6	122,0	

Percentagem Metástase/Pulmão

Média ± Desvio Padrão	41,1±13,9	41,9±12,7	
Mediana	38,5	42,6	
Mínimo	25,0	26,8	0,225
Máximo	56,6	54,6	

a) Os valores de p do teste T de *Wilcoxon* verifica-se a concordância entre os dois métodos ($p > 0,05$).

O coeficiente de correlação de *Spearman* foi calculado para avaliar a existência de uma correlação entre ambos os métodos. Os resultados da correlação de *Spearman* são apresentados na tabela 6. Para o volume pulmonar e o volume de metástases, o coeficiente de *Spearman* foi de 1,000, indicando uma correlação perfeita. O valor de p (inferior a 0,05) confirma que esta correlação é estatisticamente significativa, provavelmente devido ao tamanho da amostra. No caso da percentagem metástases/pulmão, o coeficiente de *Spearman* foi de 0,9000, ou seja, indica uma correlação forte. No entanto, o valor de $p = 0,0833$ ($p > 0,05$) é considerado tangencialmente significativo.

As figuras 11, 12 e 13 ilustram a correlação entre os métodos *QuPath* e estereologia.

Tabela 6: Resultados da correção de *Spearman* entre os métodos *QuPath* e Estereologia para o volume pulmonar, volume de metástases e a percentagem metástases/pulmão.

	Coeficiente <i>Spearman</i> (r)	Valor de p
Volume Pulmonar	1,000	0,0167
Volume de Metástases	1,000	0,0167
Metástases/Pulmão (%)	0,900	0,0833

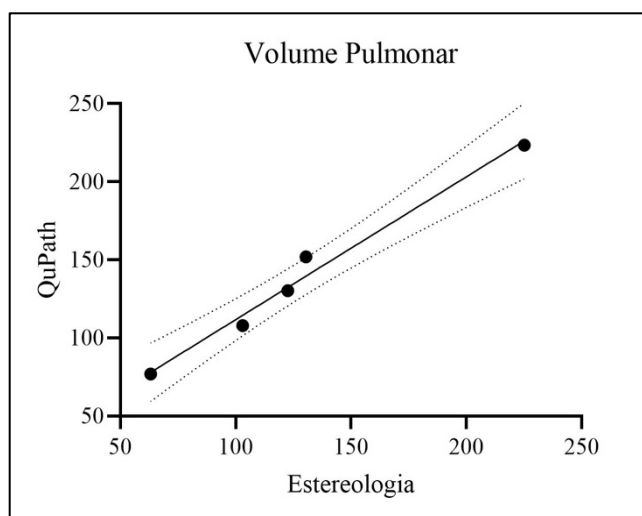


Figura 11: Correlação entre os métodos *QuPath* e Estereologia para o volume de pulmonar. Original da autora.

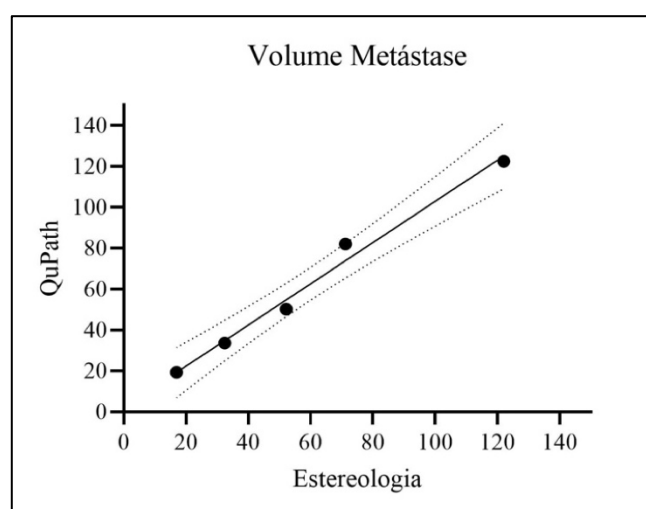


Figura 12: Correlação entre os métodos *QuPath* e Estereologia para o volume de metástase. Original da autora.

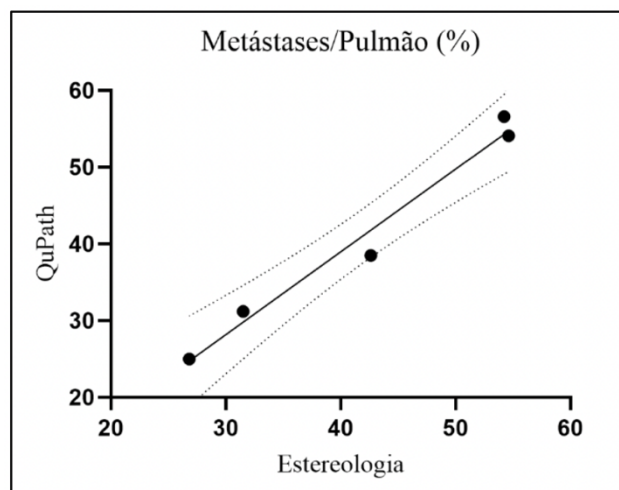


Figura 13: Correlação entre os métodos *QuPath* e *Estereologia* para a percentagem metástase/pulmão. Original da autora.

4.1.2. Cortes Individuais

Para se verificar se é, ou não, adequado confiar apenas em seções 2D para representar com precisão uma estrutura 3D, analisou-se os cortes individuais de cada animal.

A figura 14 apresenta os resultados da análise pelo método ROUT. Relativamente ao volume pulmonar, o animal 2 e 3 apresentam um *outlier* (5,36; 6,74, respetivamente). O animal 1 apresenta um *outlier* (73,5%) em relação à percentagem metástase/Pulmão.

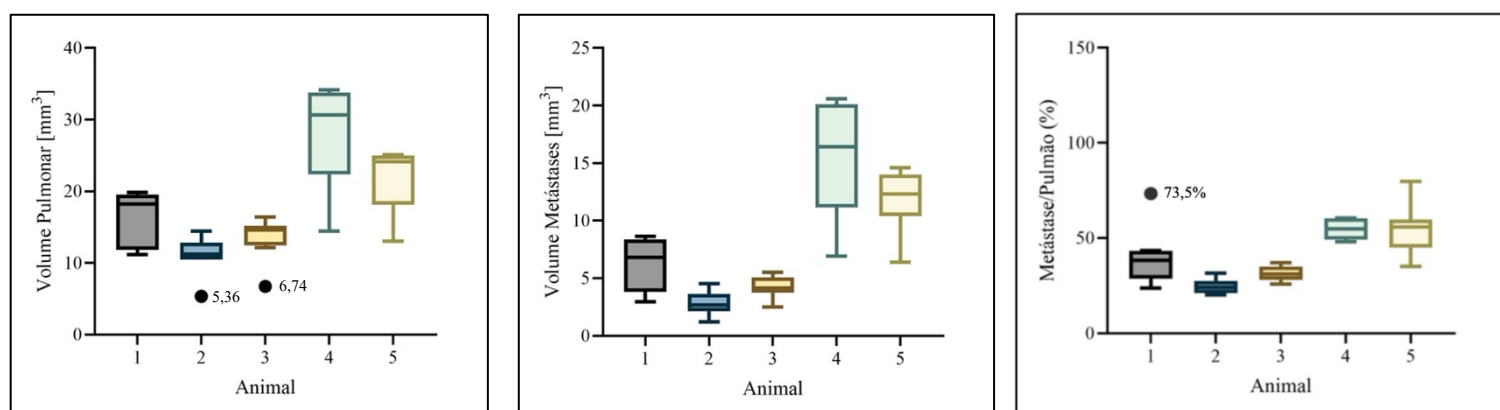


Figura 14: *Outliers* identificados pelo método de ROUT. Da esquerda para a direita: referente ao Volume Pulmonar, Volume de Metástases e percentagem Metástase/Pulmão. Os pontos a preto correspondem aos *outliers* identificados. Original da autora.

Na tabela 7 são apresentados os coeficientes de variação (CV) para cada animal, permitindo avaliar a variabilidade dos dados. O CV do volume pulmonar apresenta uma variabilidade moderada ($>15\%$) e consistente entre os diferentes animais. Por outro lado, os volumes de metástases e a percentagem metástase/pulmão apresentam uma variabilidade moderada (15-30%) e elevada ($>30\%$) e é pouco consistente entre os diferentes animais.

As figuras 15, 16 e 17 representam as variações observadas nos cortes individuais de cada lâmina.

Tabela 7: Resultados do Coeficiente de Variação relativamente ao volume pulmonar, volume de metástase e percentagem metástase/pulmão, de cada animal.

	Coeficiente de Variação (%)		
	Volume Pulmonar	Volume Metástase	Percentagem Metástase/Pulmão
Animal 1	23,52	35,91	37,25
Animal 2	25,59	39,07	15,46
Animal 3	22,39	22,48	12,30
Animal 4	25,90	32,60	9,00
Animal 5	21,14	24,90	23,99

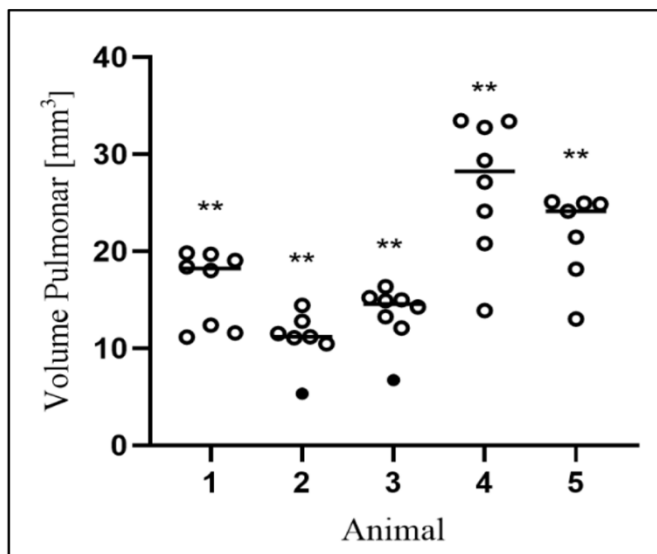


Figura 15: Variação dos cortes individuais de cada animal em relação ao volume pulmonar. A branco corresponde aos valores de cada corte, enquanto a preto os *outliers* identificados pelo método de ROUT. Os ** representa CV: 15%-30% - variabilidade moderada. Original da autora.

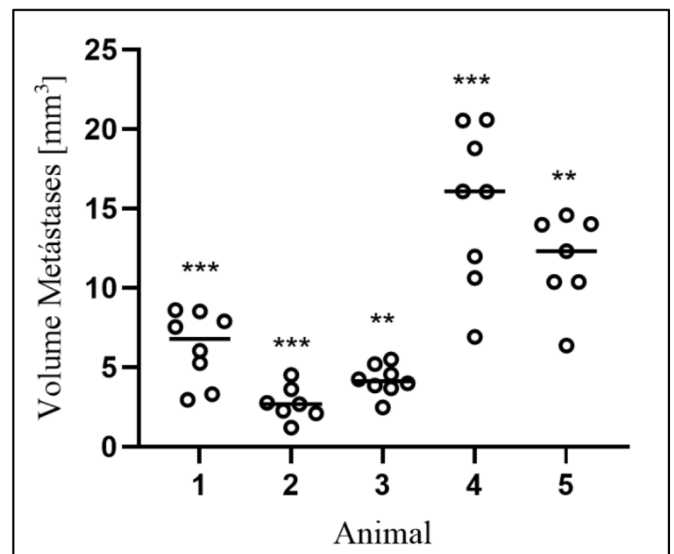


Figura 16: Variação dos cortes individuais de cada animal em relação ao volume de metástases. A branco corresponde aos valores de cada corte. Os ** representa CV: 15%-30% - variabilidade moderada; ***, CV $>30\%$ - variabilidade elevada. Original da autora.

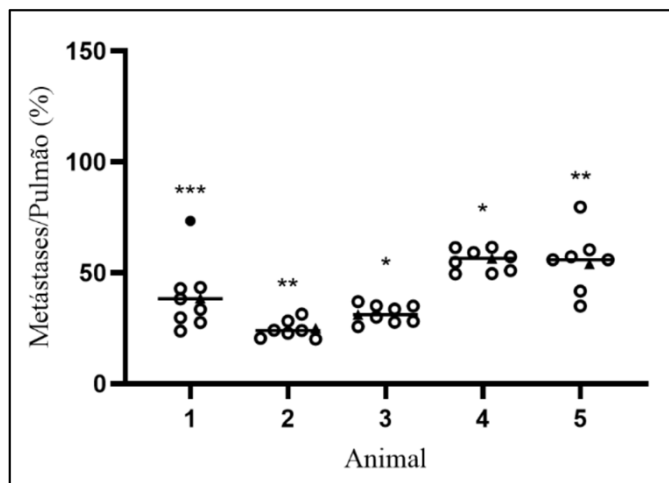


Figura 17: Variação dos cortes individuais de cada animal em relação à percentagem metástase/pulmão. A branco corresponde aos valores de cada corte, enquanto a preto os *outliers* identificados pelo método de ROUT. O * representa CV<15% - baixa variabilidade; **: CV: 15%-30% - variabilidade moderada; ***: CV>30% - variabilidade elevada. O triângulo preto representa o valor total da percentagem metástase/pulmão. Original da autora.

4.2. Resultados da Quantificação de Fibrose Cardíaca (Estudo 2)

4.2.1. Comparação de Ambas as Metodologias

Semelhante ao estudo 1, foram avaliados o volume ventricular, volume de fibrose e a percentagem fibrose/ventrículo, em cada método. Foram avaliados o volume ventricular, o volume de fibrose e a percentagem fibrose/ventrículo para ambos os métodos. Os resultados da análise estatística estão apresentados na tabela 8. Para os parâmetros em estudo, o valor da média, mediana, mínimo e máximo são muito semelhantes em ambos os métodos. O teste de *Wilcoxon* mostrou que os valores de p para todos os parâmetros analisados - volume ventricular, volume de fibrose e percentagem fibrose/ventrículo - são superiores a 0,05, indicando que não há diferenças estatísticas significativas entre os dois métodos.

Tabela 8: Análise estatística dos resultados obtidos pelos métodos *QuPath* e estereologia, para o volume ventricular, o volume de fibrose e a percentagem fibrose/ventrículo.

	<i>QuPath</i>	Estereologia	Valor p _(a)
Volume Ventricular			
Média ± Desvio Padrão	69,3±7,6	69,0±7,9	0,686
Mediana	66,8	67,9	
Mínimo	61,3	58,7	
Máximo	77,6	78,3	
Volume de Fibrose			
Média ± Desvio Padrão	2,5 ± 1,9	2,4±2,3	0,893
Mediana	1,5	1,7	
Mínimo	0,7	0,5	
Máximo	5,6	5,9	

Percentagem Fibrose/Ventrículo			
Média ± Desvio Padrão	3,8±3,2	3,7±3,5	
Mediana	2,2	2,5	
Mínimo	0,9	0,7	0,893
Máximo	8,8	9,0	

a)Os valores de p do teste T de Wilcoxon

Como descrito anteriormente, no estudo 1, calculou-se o coeficiente de correlação de para verificar a existência de uma correlação entre ambos os métodos. Os resultados dessa análise estão apresentados na tabela 9. A análise da correlação de *Spearman* revelou um coeficiente de correlação muito forte entre as medições de ambos os métodos para o volume ventricular, o volume de fibrose e para a relação fibrose/metástases. As figuras 18, 19 e 20 ilustram a correlação entre os métodos *QuPath* e estereologia.

Tabela 9: Resultados da correção de *Spearman* entre os métodos *QuPath* e Estereologia para o volume ventricular, volume de fibrose e a percentagem fibrose/ventrículo.

	Coeficiente <i>Spearman</i> (r)	Valor de p
Volume Ventricular	0,900	0,0833
Volume de Fibrose	1,000	0,0167
Fibrose/Ventrículo (%)	1,000	0,0167

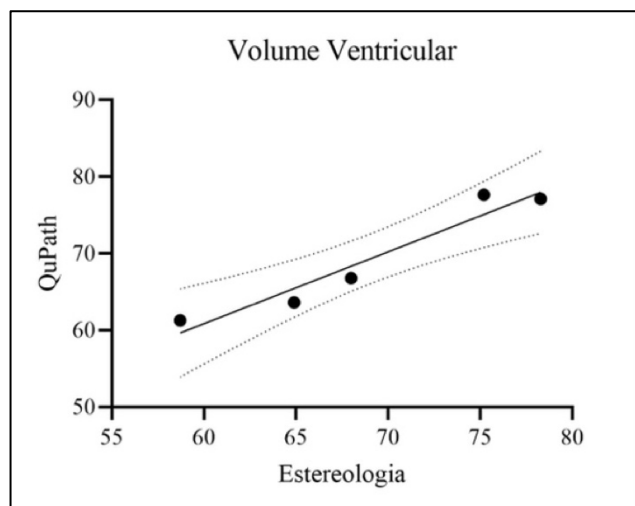


Figura 18: Correlação entre os métodos *QuPath* e Estereologia para o volume ventricular. Original da autora.

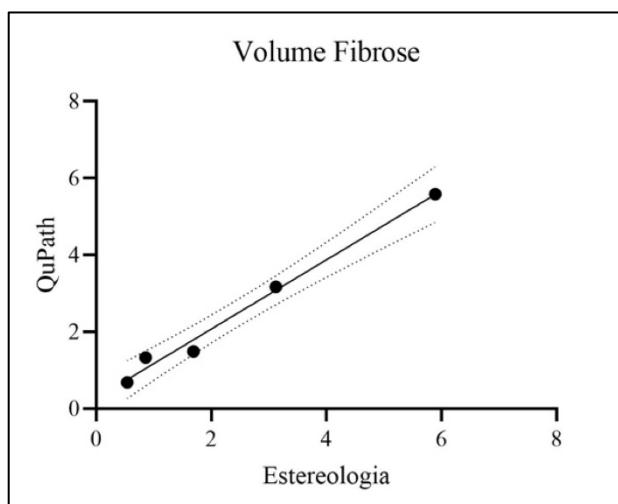


Figura 19: Correlação entre os métodos *QuPath* e Estereologia para o volume de fibrose. Original da autora.

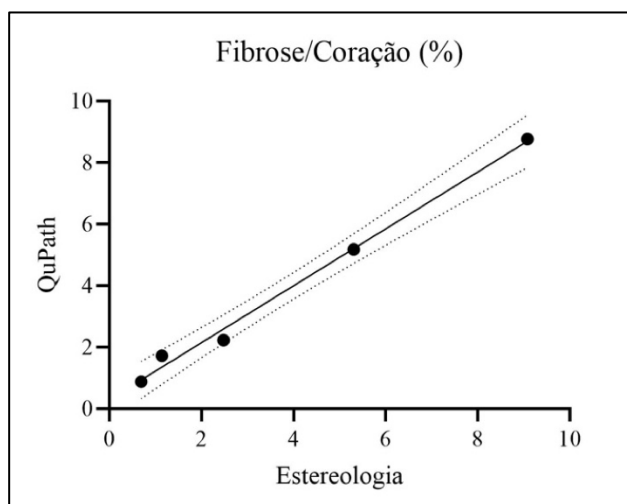


Figura 20: Correlação entre os métodos *QuPath* e Estereologia para a percentagem fibrose/ventrículo. Original da autora.

4.2.3. Cortes Individuais

Para se verificar se é, ou não, adequação confiar apenas em seções 2D para representar com precisão uma estrutura 3D, analisou-se os cortes individuais de cada animal.

A figura 21 apresenta os resultados da análise pelo método ROUT. Apenas o animal 5 apresenta um *outlier* (3,9%), em relação à percentagem de fibrose/ventrículo.

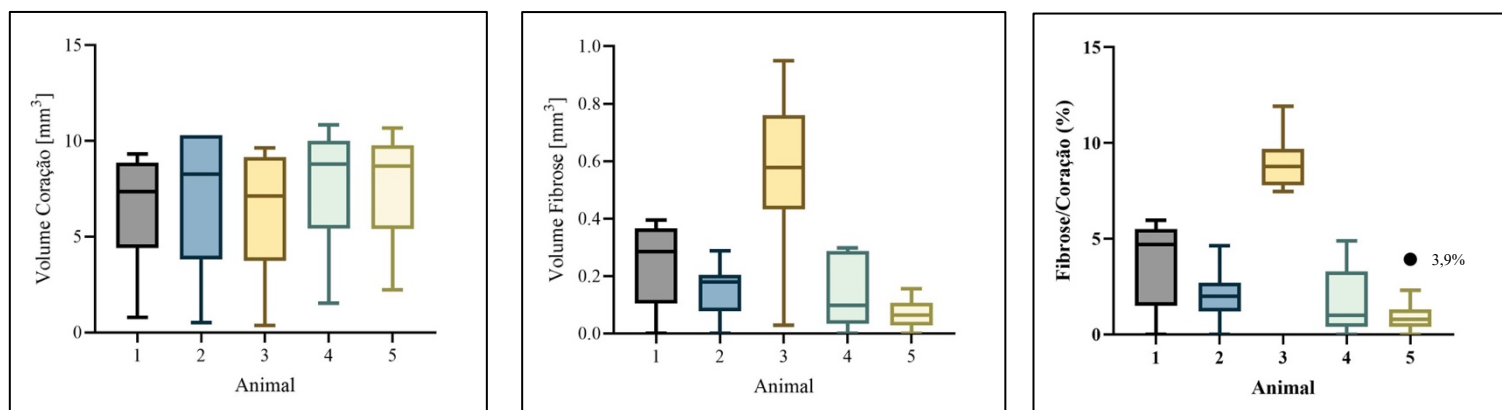


Figura 21: *Outliers* identificados pelo método de ROUT. Da esquerda para a direita: referente ao Volume Pulmonar, Volume de Metástases e percentagem Metástase/Pulmão. Os pontos a preto correspondem aos *outliers* identificados. Original da autora.

A tabela 10 apresenta o coeficiente de variação, que permite avaliar a variabilidade dos dados. A maioria dos resultados indicam uma variabilidade moderada (15%-30%),

enquanto alguns valores mostram uma variabilidade mais elevada (>30%). As figuras 22, 23 e 24 representam as variações observadas nos cortes individuais de cada lâmina.

Tabela 10: Resultados do Coeficiente de Variação relativamente ao volume ventricular, volume de fibrose e percentagem fibrose/ventrículo, de cada animal.

	Coeficiente de Variação (%)		
	Volume Ventricular	Volume de Fibrose	Percentagem Fibrose/Ventrículo
Animal 1	42,86	61,60	59,31
Animal 2	50,56	59,12	64,86
Animal 3	49,89	47,90	15,01
Animal 4	39,04	87,84	92,24
Animal 5	36,53	73,67	99,88

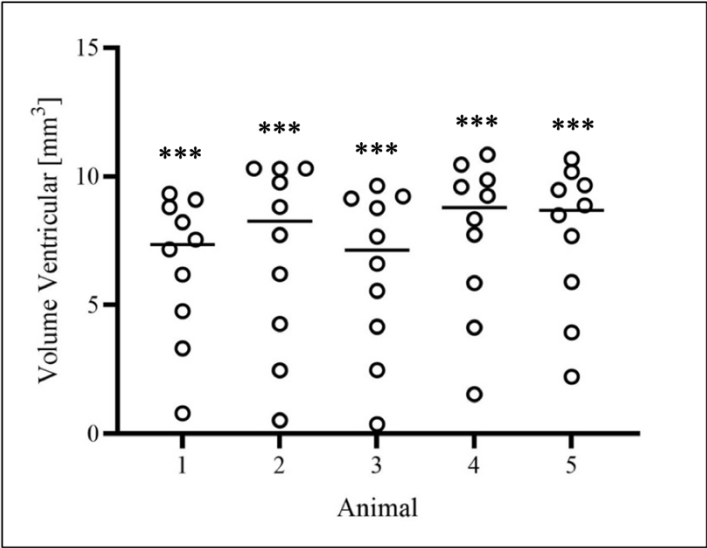


Figura 22: Representação da variação dos cortes individuais de cada animal em relação ao volume ventricular. A branco corresponde aos valores de cada corte. Os *** representam CV>30% - variabilidade elevada. Original da autora.

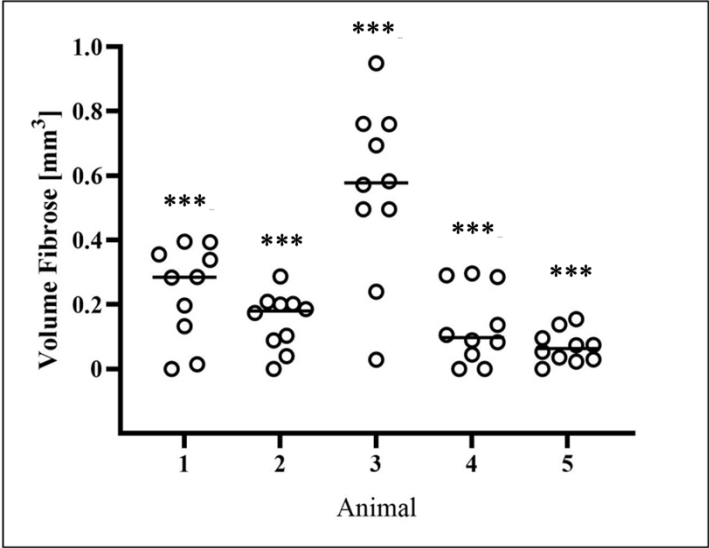


Figura 23: Representação da variação dos cortes individuais de cada animal em relação ao volume de fibrose. A branco corresponde aos valores de cada corte. Os *** representam CV>30% - variabilidade elevada. Original da autora.

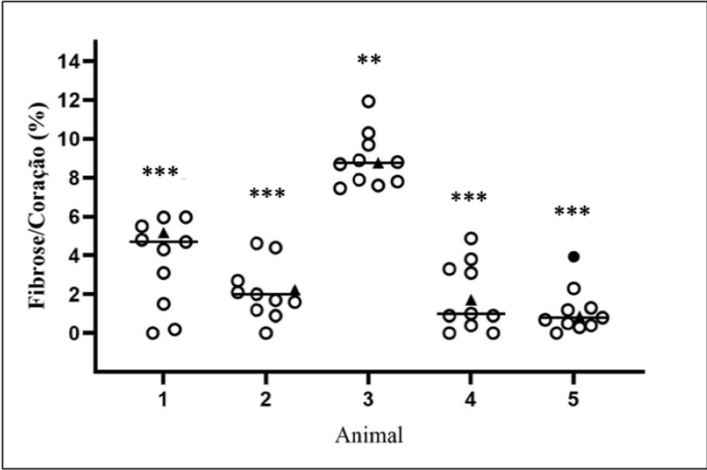


Figura 24: Representação da variação dos cortes individuais de cada animal em relação à percentagem fibrose/ventrículo. A branco corresponde aos valores de cada corte, enquanto a preto o outlier identificado pelo método de ROUT. Os ** representam CV: 15%-30% - variabilidade moderada; ***: CV>30% - variabilidade elevada. O triângulo preto representa o valor total da percentagem fibrose/ventrículo. Original da autora.

CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO

A avaliação histopatológica, como abordado ao longo deste estudo, apresenta desafios como a subjetividade, a variabilidade inter e intraobservadores, a baixa reprodutibilidade, em estudos quantitativos, e o tempo necessário para as medições quantitativas (Bertram & Klopffleisch, 2017; Horai et al., 2019; Webster & Dunstan, 2014).

Tendo em conta essas limitações, este estudo propõe um método simples, rápido e com maior reprodutibilidade dos dados histopatológicos, para a quantificação de metástases pulmonares e fibrose cardíaca. Para isso, foi utilizado o programa *QuPath*, recorrendo apenas às suas ferramentas integradas, sem a necessidade de programação adicional.

5.1. Escolha dos Métodos – *QuPath* e Estereologia

Grande parte dos estudos que validam novos classificadores de quantificação baseiam-se em comparações com a avaliação visual realizada por patologistas, como nos estudos de Usman e Abidin (2021) e de Abecasis et al. (2023). No entanto, este método é semi-quantitativo e sujeito a variabilidade (Gonciar et al., 2024). De acordo com Daunoravicius et al. (2014) e Gonciar et al., (2024) a validação de novos métodos deve ser realizada com abordagens mais objetivas, como a estereologia, que é considerada o método de referência para a patologia quantitativa (Knudsen et al., 2021). Contudo, é um método que apresenta complexidade, exige um tempo de análise elevado e necessita de sistemas dispendiosos, não estando acessíveis a todos (Aeffner et al., 2019a; Aeffner et al., 2019b; Brown et al., 2017a).

O programa *QuPath* foi escolhido para este estudo por ser uma plataforma de análise de imagem intuitiva, de fácil utilização e por estar disponível gratuitamente. Além disso, destaca-se pela capacidade de criar e aplicar análises semelhantes de forma automática e eficiente em várias imagens, permitindo também a aplicação de técnicas de ML sem necessidade de conhecimentos de programação (Brahmadhi & Ningrom, 2023; Abecasis et al., 2023). Adicionalmente, ao permitir a análise de imagens WSI, o programa *QuPath* reduz o viés associado à seleção manual de campos, uma vez que a análise é realizada para a lâmina completa.

5.2. Escolha dos Métodos para a Quantificação - *QuPath*

O programa *QuPath* disponibiliza várias funcionalidades, permitindo adaptar os métodos ao objetivo principal de cada estudo. No caso das metástases pulmonares o objetivo foi quantificar as metástases e determinar a percentagem do pulmão afetada. Para isso, optou-se pelo método de classificação de *pixels* baseado em *thresholds*. Este é um método simples, muito utilizado para definir regiões de interesse sem necessidade de anotar todas as áreas manualmente, o que facilita o processamento de grandes volumes de imagens e aumenta a reprodutibilidade dos resultados. É útil para imagens com regiões de intensidades de coloração claramente diferentes, como neste estudo, onde o contraste das metástases pulmonares permitiu a aplicação desta funcionalidade.

Relativamente à quantificação da fibrose, inicialmente considerou-se o método de classificação por pixels baseado em *thresholds*, devido ao contraste entre a fibrose, corada de azul, e o tecido normal, corado de vermelho. No entanto, este método apenas permite a classificação de duas classes e devido à presença de núcleos celulares corados com hematoxilina no tecido normal, houve a necessidade de os classificar também. Estes núcleos dificultavam a segmentação precisa por *thresholding*, uma vez que era quantificado como áreas de fibrose. Assim, optou-se por uma abordagem mais avançada, o classificador de pixels através de ML. Esta abordagem já tinha sido aplicada no estudo de Abecasis et al. (2023), o primeiro estudo a abordar o uso do programa *QuPath* e ML na quantificação de fibrose cardíaca, com o objetivo de melhorar a reprodutibilidade das medições. O *QuPath* demonstrou ter uma forte correlação com o valor obtido de três patologistas, considerados nesse estudo o método de referência. No entanto, não avaliou a exatidão do método automático, o que exigiria um estudo de concordância, como a comparação com estereologia, para validar o classificador desenvolvido (Abecasis et al. 2023).

Deste modo, o presente estudo pretendeu validar os classificadores desenvolvidos, avaliando a concordância com a estereologia.

5.2. Discussão dos Resultados

5.2.1. Comparação de ambos os métodos

Com base nos resultados obtidos é possível verificar que as hipóteses do estudo foram confirmadas: o classificador desenvolvido no programa *QuPath* conseguiu quantificar, de

forma eficaz, as metástases pulmonares e fibrose cardíaca em todas as amostras. E apresentam resultados concordantes com os valores obtidos na estereologia para volume e respetivos rácios.

5.2.2. Cortes Individuais

A análise de cortes individuais revelou uma variabilidade significativa tanto no estudo das metástases pulmonares como na fibrose cardíaca. Para o estudo das metástases pulmonares, o CV do volume pulmonar apresenta uma heterogeneidade moderada, mas consistente entre animais. Estes resultados são expectáveis, uma vez que os cortes do pulmão não têm a mesma dimensão e os animais analisados possuem características semelhantes entre si. Por outro lado, em relação ao volume de metástases e a percentagem de metástases/pulmão, observou-se uma maior heterogeneidade. Os animais 1 e 2 apresentam uma heterogeneidade elevada no volume de metástases, enquanto na percentagem metástases/pulmão, o animal 1 é o que apresenta uma maior heterogeneidade. Neste caso, os animais 3 e 4 têm efetivamente uma heterogeneidade considerada baixa, mas não conseguimos prever com exatidão essa variabilidade nem com precisão o corte que seja representativo do que se está a passar no órgão. No caso da fibrose cardíaca, a análise é semelhante. No volume ventricular, os CV são mais elevados, mas consistentes entre os vários animais. No volume de fibrose cardíaca e percentagem fibrose/ventrículo, os animais 4 e 5 destacaram-se pela elevada heterogeneidade, tanto no volume de fibrose cardíaca como na percentagem fibrose/ventrículo.

Para uma análise mais completa procedeu-se à identificação de possíveis *outliers*, utilizando o método de ROUT. Foram identificados *outliers* na análise do volume pulmonar, percentagem afetada metástase/pulmão e fibrose/ventrículo. Estes valores foram considerados discrepantes quando comparados com os restantes valores das lâminas de cada animal, indicando uma variabilidade entre as amostras analisadas.

Estes resultados mostram que a elevada variabilidade observada nos cortes individuais torna difícil prever com exatidão essa variabilidade ou determinar com precisão o plano de secção ideal para obter uma lâmina verdadeiramente representativa. Este problema demonstra que confiar numa única secção 2D não é suficiente para refletir com precisão a realidade tridimensional das lesões. Por este motivo, torna-se impraticável confiar apenas numa única secção 2D para representar com precisão uma estrutura 3D (Brown, 2017b).

Conclui-se que, a combinação do princípio de amostragem estereológica com a análise de imagem é essencial para garantir que os cortes 2D sejam representativos das estruturas 3D, reduzindo os erros associados à heterogeneidade. Além disso, o *QuPath* permite a análise

automática para várias lâminas, e dada a sua acessibilidade, rapidez e reprodutibilidade, não há motivo para não aplicar os princípios da amostragem estereológica na análise de imagem.

5.3. Limitações e Desafios da Investigação

O principal desafio deste projeto foi a curva de aprendizagem associada ao programa *QuPath*, uma vez que a autora não tinha conhecimentos básicos em análise de imagem nem experiência em ferramentas de patologia digital. Inicialmente, começou por explorar o programa com a ajuda de tutoriais disponíveis, o que lhe permitiu compreender as suas principais funcionalidades. O processo de aprendizagem foi muito desafiante, com uma curva de aprendizagem evolutiva, marcada por tentativa e erro, com alguns momentos de frustração. No entanto, a persistência e a prática constante permitiram-lhe dominar o programa e as suas funcionalidades, conseguindo adaptar o programa às necessidades do seu projeto, dando-lhe a autonomia e confiança necessária.

Para além disso, o estudo apresenta algumas limitações relacionadas com a capacidade do computador durante o processamento das imagens, resultando em tempos de análises mais prolongados, o que podia ser otimizado com recursos computacionais mais robustos. Outro ponto a destacar é a dimensão da amostra ($n=5$), que representa uma limitação significativa, uma vez que pode ter limitado a estatística dos dados.

5.4. Projetos Futuros

Para projetos futuros, seria de interesse aplicar esta metodologia, tanto na quantificação de metástases como na quantificação de fibrose, para um maior número de animais, o que poderia permitir uma distribuição mais adequada dos dados e uma análise mais detalhada.

Os métodos propostos neste projeto, também poderiam ser aplicados em imagens de outras localizações anatómicas, como, por exemplo, fibrose no fígado ou nos rins (Gonciar et al, 2024). Além disso, seria de valor explorar mais o programa *QuPath*, uma vez que é uma ferramenta gratuita, reduzindo os custos associados à investigação, e que mostrou ser uma ferramenta confiável para análise quantitativa.

Um estudo interessante seria comparar os valores dos cortes individuais com o valor total da estrutura tridimensional para identificar se algum corte é mais representativo, e assim reduzir amostragem, ou seja, este estudo indicou que os 8 cortes são ideais, mas seria possível obter uma representação igualmente precisa com um número menor de cortes (<8 cortes)?

CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO

Com a análise dos resultados obtidos neste projeto de estudo, é possível concluir que os classificadores desenvolvidos e descritos oferecem uma alternativa confiável e acessível para análise histopatológica automatizada. O programa *QuPath* é uma ferramenta “gratuita” que mostra ser eficaz na quantificação de metástases pulmonares e fibrose cardíaca de WSI, com uma elevada concordância com a estereologia, considerada o método de referência na patologia quantitativa.

Além disso, os resultados confirmam a inadequação de confiar apenas numa única seção bidimensional para representar com precisão uma lesão tridimensional, evidenciando a necessidade de integrar abordagens mais sofisticadas, como a amostragem estereológica.

Embora o estudo tenha algumas limitações, como o tamanho da amostra a ser estudada, os resultados obtidos apoiam a utilização de métodos automatizados, para melhorar a eficiência e a precisão da análise histopatológica.

Este projeto termina com a seguinte reflexão: Será que os patologistas poderão ser substituídos por inteligência artificial? O Harry Adams (2020) afirma que "*AI will not replace pathologists, but pathologists who know how to use AI will replace pathologists who do not*". Esta afirmação reforça a ideia de que a IA tem maior probabilidade de auxiliar os patologistas do que os substituir. Depreende-se que a evolução crescente da IA será uma prática cada vez mais comum na patologia e na sociedade dos próximos anos.

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecasis, J., Cortez-Dias, N., Pinto, D. G., Lopes, P., Madeira, M., Ramos, S., et al. (2023). Quantitative assessment of myocardial fibrosis by digital image analysis: an adjunctive tool for pathologist “ground truth”. *Cardiovascular Pathology*, v.65, 107541. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2023.107541>

Abels, E., Pantanowitz, L., Aeffner, F., Zarella, M. D., Van der Laak, J., Bui, M., et al. (2019). Computational pathology definitions, best practices, and recommendations for regulatory guidance: a white paper from the Digital Pathology Association. *Journal of Pathology*, v. 249, p. 286-294. DOI: [10.1002/path.5331](https://doi.org/10.1002/path.5331)

Acs, B., Rantalainen, M., & Hartman, J. (2020). Artificial intelligence as the next step towards precision pathology. *Journal of internal medicine*, v.288(1), p.62-81. <https://doi.org/10.1111/joim.13030>

Adams, H. (2020). Could pathologists soon be replaced by robots? *Royal College of Pathology*.

Aeffner F., Adissu H., A, Boyle M. C., Cardiff R. D., Hagendorn E, Hoenerhoff MJ, et. al. (2019a). Digital Microscopy, Image Analysis, and Virtual Slide Repository. *ILAR Journal*, v.59(1), p.66-79. DOI: [10.1093/ilar/ily007](https://doi.org/10.1093/ilar/ily007)

Aeffner, F., Zarella, M. D., Buchbinder, N., Bui, M. M., Goodman, M. R., Hartman, D. J., et al. (2019b). Introduction to digital image analysis in whole-slide imaging: A white paper from the digital pathology association. *Journal of Pathology Informatics*. DOI: [10.4103/jpi.jpi_82_18](https://doi.org/10.4103/jpi.jpi_82_18)

Bankhead, P. (2022), Developing image analysis methods for digital pathology. *The Journal Pathology*, v.257, p.391-402. <https://doi.org/10.1002/path.5921>

Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J., A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P., D., et. al. (2017). QuPath: Open-source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*. [10.1038/s41598-017-17204-5](https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5)

Barisoni, L., Lafata, K. J., Hewitt, S. M., Madabhushi, A., Balis, U. G. (2020). Digital pathology and computational image analysis in nephropathology. *Nature Reviews Nephrology*, v.16, p. 669–685. DOI: [10.1038/s41581-020-0321-6](https://doi.org/10.1038/s41581-020-0321-6)

Baxi, V., Edwards, R., Montalto, M. & Saha S. (2022). Digital pathology and artificial intelligence in translational medicine and clinical practice. *Modern Pathology*, v.35, p.23–32. DOI: [10.1038/s41379-021-00919-2](https://doi.org/10.1038/s41379-021-00919-2)

Bera, K., Schalper, K. A., Rimm, D.L., Velcheti V. & Madabhushi A. (2019). Artificial intelligence in digital pathology - new tools for diagnosis and precision oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v.16, p.703–715. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0252-y>

Berbís, M.A., McClintock, D.S., Bychkov, A., Van der Laak, J., Pantanowitz, L., Lennerz, J. K., et al. (2023). Computational pathology in 2030: a Delphi study forecasting the role of AI in pathology within the next decade. *EBioMedicine*, v.88:104427. Doi: [10.1016/j.ebiom.2022.104427](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104427)

Bertram, C. A., Klopffleisch R. (2017). The Pathologist 2.0: An Update on Digital Pathology in Veterinary Medicine. *Veterinary Pathology*, v. 54(5), p.756-766. [10.1177/0300985817709888](https://doi.org/10.1177/0300985817709888)

Brahmadhi, A., & Ningrom, I. C. (2023). Comparative Analysis of Kidney Histomorphometry Utilizing Two Distinct Image Processing Software. *Journal of Biomedicine and Translational Research*, v.9(3), p.104-110. <https://doi.org/10.14710/jbtr.v9i3.18554>

Brown, D. L. (2017a). Bias in image analysis and its solution: unbiased stereology. *J Toxicol Pathol*, 30(3), 183-191. Doi: [10.1293/tox.2017-0013](https://doi.org/10.1293/tox.2017-0013).

Brown, D. L. (2017b). Practical Stereology Applications for the Pathologist. *Veterinary Pathology*. V.54(3), p.358-368. <https://doi.org/10.1177/0192623319854746>

Bui, M. M., Asa, S. L., Pantanowitz, L., Parwani, A., van der Laak, J., Ung, C., et al. (2019). Digital Pathology: Bringing the Future into Focus. *Journal of Pathology Informatics*, 10:10. DOI: [10.4103/2153-3539.255259](https://doi.org/10.4103/2153-3539.255259)

Cho, W. C., (2022). Digital Pathology: New Initiative in Pathology, v.12(9), p.1314. DOI: [10.3390/biom12091314](https://doi.org/10.3390/biom12091314)

Cui, M., & Zhang, D. Y. (2021). Artificial intelligence and computational pathology. *Laboratory Investigation*, v. 101(4), p. 412-422. DOI: [10.1038/s41374-020-00514-0](https://doi.org/10.1038/s41374-020-00514-0)

Daunoravicius, D., Besusparis, J., Zurauskas, E., Laurinaviciene, A., Bironaite, D., Pankuweit, S., *et al.* (2014). Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology. *Diagnostic Pathology*, v. 9, p.114. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-9-114>

Dawson, H. (2022). Digital pathology - Rising to the challenge. *Frontiers in Medicine*, v.9, p.888896. DOI: [10.3389/fmed.2022.888896](https://doi.org/10.3389/fmed.2022.888896)

Go H. (2022). Digital Pathology and Artificial Intelligence Applications in Pathology. *Brain Tumor Research and Treatment*, v.10(2), p.76-82. DOI: [10.14791/btrt.2021.0032](https://doi.org/10.14791/btrt.2021.0032)

Gonciar D, Berciu A-G, Danku AE, Lorenzovici N, Dulf E-H, Mocan T, Nicula S-M, Agoston-Coldea L. (2024). The Quantification of Myocardial Fibrosis on Human Histopathology Images by a Semi-Automatic Algorithm. *Applied Sciences*, v.14(17), 7696. <https://doi.org/10.3390/app14177696>

Hanna M. G., Ardon O. (2023). Digital pathology systems enabling quality patient care. *Genes Chromosomes Cancer*, v.62(11), p.685-697. <https://doi.org/10.1002/gcc.23192>

Heinz, C. N., Echle, A., Foersch, S., Bychkov, A., Kather, J. N. (2022). The future of artificial intelligence in digital pathology - results of a survey across stakeholder groups. *Histopathology*, v. 80, p. 1121-1127. DOI: [10.1111/his.14659](https://doi.org/10.1111/his.14659)

Horai Y., Kakimoto T., Takemoto K., Tanaka M. (2017). Quantitative analysis of histopathological findings using image processing software. *J Toxicol Pathol*, v.30(4), p.351-358. DOI: [10.1293/tox.2017-0031](https://doi.org/10.1293/tox.2017-0031)

Ibrahim, A., Gamble, P., Jaroensri, R., Abdelsamea, M. M., Mermel, C. H., Chen, P. C., *et al.* (2019). Artificial intelligence in digital breast pathology: Techniques and applications. *The Breast*, v.49, p.267-273. DOI: [10.1016/j.breast.2019.12.007](https://doi.org/10.1016/j.breast.2019.12.007)

Jahn, S. W.; Plass, M.; Moinfar, F. (2020). Digital Pathology: Advantages, Limitations and Emerging Perspectives. *Journal Clinical Medicine*, 9(11):3697. DOI: [10.3390/jcm9113697](https://doi.org/10.3390/jcm9113697)

Jan, M., Spangaro, A., Lenartowicz, M., Usaj, M. M. (2024). From pixels to insights: Machine learning and deep learning for bioimage analysis. DOI: [10.1002/bies.202300114](https://doi.org/10.1002/bies.202300114)

Kiehl, T.-R. (2022). Digital and Computational Pathology: A Specialty Reimagined. In book: *The Future Circle of Healthcare: AI, 3D Printing, Longevity, Ethics, and Uncertainty Mitigation*, p. 227-250. DOI: [10.1007/978-3-030-99838-7_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-99838-7_12)

Knudsen, L., Brandenberger, C., Ochs, M. (2021). Stereology as the 3D tool to quantitate lung architecture. *Histochemistry and Cell Biology*, v.155, p.163-181. Doi: [10.1007/s00418-020-01927-0](https://doi.org/10.1007/s00418-020-01927-0)

Kumar, N.; Gupta, R.; Gupta, S. (2020). Whole Slide Imaging (WSI) in Pathology: Current Perspectives and Future Directions. *Journal of Digital Imaging*, v. 33, p. 1034-1040. DOI: [10.1007/s10278-020-00351-z](https://doi.org/10.1007/s10278-020-00351-z)

Levet, F., Carpenter, A. E., Eliceiri, K. W., Kreshuk, A., Bankhead, P., Haase, R. (2021). Developing open-source software for bioimage analysis: opportunities and challenges. DOI: [10.12688/f1000research.52531.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.52531.1)

Litjens, G., Bandi, P., Bejnordi, E. B., Geessink, O., Balkenhol, M., Bult, P., et al. (2018). 1399 H&E-stained sentinel lymph node sections of breast cancer patients: the CAMELYON dataset. v.7, p.1-8 DOI: [10.1093/gigascience/giy065](https://doi.org/10.1093/gigascience/giy065)

Loughrey, M. B., Bankhead, P., Coleman, H. G., Hagan, R. S., Craig, S., McCorry, A. M. B. (2018). Validation of the systematic scoring of immunohistochemically stained tumour tissue microarrays using QuPath digital image analysis. *Histopathology*, v.73(2), p.327-338. <https://doi.org/10.1111/his.13516>

Madabhushi, A., & Lee, G. (2016). Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Medical image analysis*, v.33, p.170-175. [10.1016/j.media.2016.06.037](https://doi.org/10.1016/j.media.2016.06.037)

Nam, S., Chong, Y., Jung, C. K., Kwak, T. Y., Lee, J. Y., Park, J., et. al. (2020). Introduction to digital pathology and computer-aided pathology. *Journal of pathology and translational medicine*, v.54, p.125-134. DOI: [10.4132/jptm.2019.12.31](https://doi.org/10.4132/jptm.2019.12.31)

Niazi, M. K. K.; Oarwani, A. V.; Gurcan, M. N. (2019) Digital pathology and artificial intelligence. *Lancet Oncology*, v. 20, p.253-261. DOI: [10.1016/S1470-2045\(19\)30154-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30154-8)

O'Dowd, G., Bell, S., & Wright, S. (2020). *Wheater's pathology: A text, atlas and review of histopathology* (6thEd., pp. 15, 23). Elsevier.

Pavone, A. M., Giannone, A. G., Cabibi, D., D'Aprile, S., Denaro, S., Salvaggio, G., et al. (2024). Digital Pathology: A Comprehensive Review of Open-Source Histological Segmentation Software. *BioMedInformatics*, v.4, p.173–196. [10.1038/s41374-020-00514-0](https://doi.org/10.1038/s41374-020-00514-0)

Pantanowitz, L., Sharma, A., Carter, A. B., Kurc, T., Sussman, A., Saltz, J. (2018). Twenty Years of Digital Pathology: An Overview of the Road Travelled, What is on the Horizon, and the Emergence of Vendor-Neutral Archives. *Journal of Pathology Informatics*, v.9, p.40. DOI: [10.4103/jpi.jpi_69_18](https://doi.org/10.4103/jpi.jpi_69_18)

Porter, R. J., Din, S., Bankhead, P., Oniscu, A., Arends, M. J. (2023). QuPath Algorithm Accurately Identifies MLH1-Deficient Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers in a Tissue Microarray. *Diagnostics*. V.13(11), 1890. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13111890>

Rakha, E. A., Toss, M., Shiino, S., Gamble, P., Jaroensri, R., Mermel, C. H., Chen, P.C. (2021). Current and future applications of artificial intelligence in pathology: a clinical perspective. *Journal of Clinical Pathology*, v. 74, p. 409-414. DOI: [10.1136/jclinpath-2020-206908](https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206908)

Robertson, S., Azizpour, H., Smith, K., Hartman, J. (2018). Digital image analysis in breast pathology-from image processing techniques to artificial intelligence *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. V. 194, p.19-35. DOI: [10.1016/j.trsl.2017.10.010](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.10.010)

Sakamoto, T., Furukawa, T., Lami, K., Pham, N., Uegami, W., Kuroda, K., et al., (2020). A narrative review of digital pathology and artificial intelligence: focusing on lung cancer, v.9(5), p.2255-2276. DOI: [10.21037/tlcr-20-591](https://doi.org/10.21037/tlcr-20-591)

Sikpa, D., Fouquet, J.P., Lebel, R. et al. (2019). Automated detection and quantification of breast cancer brain metastases in an animal model using democratized machine learning tools. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53911-x>

Sucaet, Y., Waelput, W. (2014). Digital Pathology. In *SpringerBriefs in Computer Science*. Springer. DOI: [10.1007/978-3-319-08780-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08780-1)

Wang, A., Yan, X., & Wei, Z. (2018). ImagePy: an open-source, Python-based and platform-independent software package for bioimage analysis. *Bioinformatics*, v.34(18), p.3238-3240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty313>

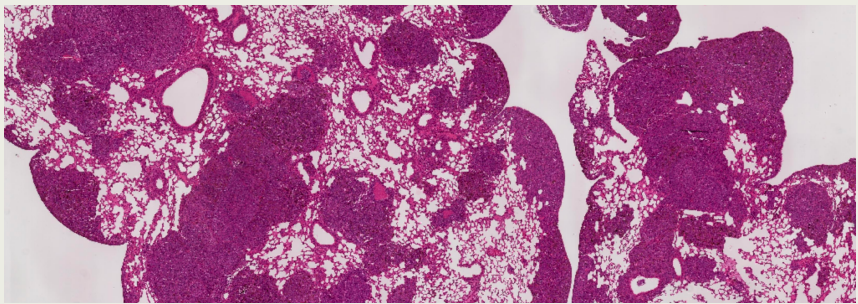
Webster, J. D., Dunstan, R. W. (2014). Whole-slide imaging and automated image analysis: considerations and opportunities in the practice of pathology. *Veterinary pathology*, v.51(1), p. 211-223. DOI: [10.1177/0300985813503570](https://doi.org/10.1177/0300985813503570)

Usman, H. A., Abidin, F. A. Z. (2021). Digital image analysis of immunohistochemistry KI-67 using QuPath software in breast cancer. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, p.34-43. DOI: [10.20885/JKKI.Vol12.Iss1.art7](https://doi.org/10.20885/JKKI.Vol12.Iss1.art7)

Zuraw A, Aeffner F. (2022). Whole-slide imaging, tissue image analysis, and artificial intelligence in veterinary pathology: An updated introduction and review. *Veterinary Pathology*, v.59(1), p.6-25. <https://doi.org/10.1177/03009858211040484>

CAPÍTULO 8: ANEXOS

Anexo A - Formadora e Coorganizadora do Workshop sobre o programa *QuPath* (1ª Edição), Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa



WORKSHOP PRESENCIAL

QuPath,



UM SOFTWARE DE CÓDIGO ABERTO PARA ANÁLISE DE IMAGEM EM PATOLOGIA DIGITAL

ORADORES
Maria Razões
Pedro Faisca
Beatriz Saraiva

DATA
16 de Março 2024

HORÁRIO
09:00h - 12:00h/ 13:30h-17h

LOCALIZAÇÃO
Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa

25€

**QUER CONTAR CÉLULAS?
QUER SABER QUANTIFICAR A ÁREA DE UM TUMOR?
QUER QUANTIFICAR UMA ÁREA DE LESÃO?**

Então, este curso é para si
Contacte-nos para mais informações

CONTACTO
sec.medvet@ulusofona.pt



Figura A1: Poster da Formação realizada presencialmente na Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa.

WORKSHOP



QUPATH,
Um Software de Código Aberto para
Análise de Imagem em Patologia
Digital

PROGRAMAÇÃO

16 DE MARÇO

9:00 - 10:30 **Introdução ao QuPath**
Funções, Gestão de Imagem e Conceitos Gerais

..... **COFFEE BREAK**

10:45 - 12:00 **Análise de imagem**
Contagem de células
- Exemplo prático: Quantificação do Índice de Proliferação Celular (Ki67)

..... **ALMOÇO**

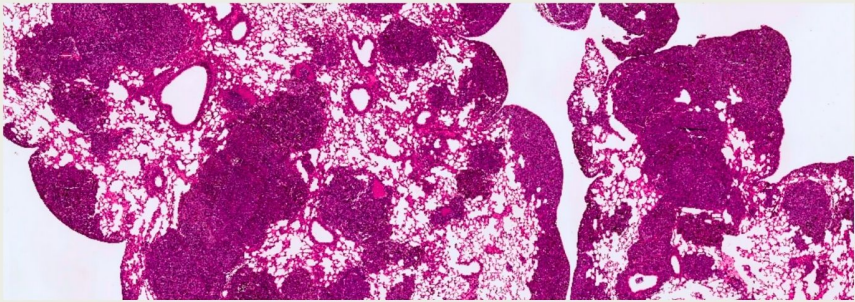
13:30 - 14:45 **Análise de imagem**
Criação de Thresholder
- Exemplo prático: Quantificação de Fibrose

..... **COFFEE BREAK**

15:00 - 17:00 **Análise de imagem**
Machine Learning
- Exemplo prático: Quantificação de Metástases
Classificação por Pixel
- Exemplo prático: Quantificação de Áreas de Necrose

Figura A2: Conteúdos programáticos abordados na Formação realizada presencialmente na Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa.

Anexo B – Formadora e Coorganizadora do Workshop sobre o programa *QuPath* (2ª Edição) da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal e da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias



WORKSHOP ONLINE

QuPath,



UM SOFTWARE DE CÓDIGO ABERTO PARA ANÁLISE DE IMAGEM EM PATOLOGIA DIGITAL

FORMADORES
Maria Razões
Mariana Monteiro

ORGANIZAÇÃO:
Pedro Faísca
Tânia Carvalho
Maria dos Anjos Pires

Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias
Sociedade Portuguesa de Patologia Animal

DATA
Online
11 e 12 de Julho 2024

Horário
9h às 13h

25€ Inscrição aqui: 

CONTACTO
spcv.pt@gmail.com



Sociedade Portuguesa de
PATOLOGIA ANIMAL

Figura 1B: Poster da Formação realizada remotamente da SPPA e da SPCV.

WORKSHOP

QUPATH,
Um Software de Código Aberto para Análise de Imagem em Patologia Digital

PROGRAMAÇÃO
11 DE JULHO

9:00 - 10:00 **Introdução ao QuPath**
Funções, Gestão de Imagem, Conceitos Gerais

10:00 - 10:30 **Exercícios**

COFFEE BREAK

10:45 - 11:30 **Análise de imagem**
• Contagem de células
Ex_Prático: Quantificação do Índice de Proliferação Celular (Ki67)
• Classificadores de Objectos e Pixels (Threshold)
Ex_Prático: Quantificação de Metástases
• Exportar Resultados

11:30 - 12:00 **Exercícios**

12:00 - 13:00 **Apresentações de Projetos**
Questões

12 DE JULHO

9:00 - 10:00 **Análise de Imagem**
• Classificadores de Objectos e Pixels (Machine Learning)
Ex_Prático: Quantificação de Fibrose
• Mapas de Densidade e Hotspots

10:00 - 10:30 **Exercícios**

COFFEE BREAK

10:45 - 11:30 **Análise de imagem**
• Workflows
Criar e editar um workflow
• Extensões
Stardist, imageJ, SAM, WSInfer

11:30 - 12:00 **Exercícios**

12:00 - 13:00 **Apresentações de Projetos**
Questões



Sociedade Portuguesa de
PATOLOGIA ANIMAL

Figura 2B: Conteúdos programáticos abordados na Formação realizada remotamente da SPPA e da SPCV.

Anexo C – Resumo da apresentação do Seminário sobre o Programa *QuPath*, realizada no CBIOS, na Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

QUPATH, SOFTWARE DE CÓDIGO ABERTO PARA ANÁLISE DE IMAGEM EM PATOLOGIA DIGITAL

Maria Carolina Razões

Faculdade de Medicina Veterinária

Universidade Lusófona- Centro Universitário de Lisboa

Campo Grande, 376

Lisboa, Portugal

A avaliação histopatológica em estudos experimentais está associada a subjetividade e viés intra e interobservador. A patologia quantitativa com recurso a métodos de *machine learning* e inteligência artificial é uma realidade e necessidade atual. A maioria dos softwares comerciais são extramente caros e acessíveis a poucos, pelo que o aparecimento de softwares de código aberto como o *QuPath* está a democratizar a utilização destas ferramentas.

Este estudo teve como objetivo a exploração deste software para o desenvolvimento de algoritmos de quantificação de modo a poder responder a questões reais de um laboratório de histopatologia experimental tais como a quantificação de metástases pulmonares; fibrose cardíaca e o rácio de proliferação celular Ki-67.

Para a quantificação de metástases pulmonares, utilizou-se o algoritmo *threshold* enquanto para a fibrose cardíaca utilizou-se o método de *machine learning* e ambas foram comparadas com os resultados obtidos por estereologia. Para o ki-67, utilizou-se o plugin deteção de células positivas e o H-score e comparou-se com o software Fiji.

A curva de aprendizagem é rápida e está suportada por tutoriais e fóruns disponíveis na internet de forma gratuita. O desenvolvimento dos algoritmos é simples e intuitivo, e a quantificação permite obter resultados reproduzíveis e equivalentes aos obtidos por outros métodos considerados o *gold standard*.

Com base nos resultados, verifica-se que a implementação dos algoritmos descritos oferece uma alternativa confiável e acessível para análise histopatológica automatizada.

Anexo D – Submissão de Resumo Científico, sobre o Tema da Dissertação de Mestrado, no III Encontro de Investigação da FMV na Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ESTEREOLOGIA E ANÁLISE DE IMAGEM
PARA QUANTIFICAÇÃO RÁPIDA E PRECISA EM PATOLOGIA
EXPERIMENTAL**

Maria Razões^{2,3}, David Ramilo¹, André Pereira¹, Patrícia Rodrigues², Pedro Faisca^{1,2}

1- CEVAC - Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Lusófona Centro Universitário de Lisboa, Portugal

2- Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal

3- Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Lusófona Centro Universitário de Lisboa, Portugal

Objetivos: A análise de imagem, representa um avanço na avaliação quantitativa em patologia, proporcionando métodos mais rápidos e reprodutíveis. Os programas de código aberto, como o *Qupath*, democratizam a utilização destas ferramentas, mas a sua precisão e exatidão podem variar, e inferir estruturas tridimensionais a partir de estruturas bidimensionais pode induzir em erro. Este estudo combinou a estereologia, considerado o método de referência com análise de imagem para criar uma abordagem tão precisa quanto a estereologia e tão rápida quanto a análise de imagem.

Materiais e Métodos: Foram utilizados 5 camundongos de um estudo com melanoma pulmonar metastático e 5 com fibrose cardíaca. Cada órgão foi seccionado de forma sistemática e uniforme gerando 8-10 cortes por órgão. Para a quantificação por estereologia utilizou-se o programa *Visiopharm*. Para a quantificação por análise de imagem, usou-se o programa *QuPath*, utilizando o algoritmo *threshold* para as metástases pulmonares, e o método de *machine learning* para a fibrose cardíaca.

Resultados: Não foram identificadas diferenças estatísticas entre os métodos para volumes pulmonares, metástase e % metástase/pulmão ($p > 0,05$), com coeficiente de correlação forte ($r = 0,9$; $p = 0,083$). Para volumes de coração, fibrose e % fibrose/coração, também não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$), com coeficiente de correlação muito forte ($r = 0,999$; $p < 0,001$). Ao comparar as % de metástases/pulmão e fibrose/coração entre lâminas individuais no mesmo

animal, foram encontrados vários animais com lâminas com valores discrepantes, com coeficientes de variação superior a 10% e, em alguns casos, ultrapassando 40% e 60%, respectivamente, indicando heterogeneidade moderada a forte.

Conclusão: Os algoritmos descritos oferecem uma alternativa confiável e acessível para análise histopatológica automatizada, com estimativas de volume altamente precisas, reprodutíveis e comparáveis à estereologia. Além disso, o estudo confirma a inadequação de confiar apenas em uma única seção 2D para representar com precisão uma estrutura 3D.

Palavras-Chaves: Patologia Digital; Análise de Imagem; *QuPath*, Inteligência Artificial; *Machine Learning*.

Anexo E – Submissão de Resumo Científico, sobre o Tema da Dissertação de Mestrado, no 5º Congresso Europeu de Patologia (European Society of Veterinary Pathology), em Madrid

Combining Stereology and Image analysis for accurate and fast quantification in experimental pathology

Pedro Faísca^{1,2}, Maria Razões^{2,3}, David Ramilo¹, André Pereira¹, Patrícia Rodrigues²

1 CEVAC- Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Lusófona Centro Universitário de Lisboa, Portugal

2- Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal

3- Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Lusófona Centro Universitário de Lisboa, Portugal

Background: Though stereology is the gold standard in quantitative pathology, it's seen as complex, time-consuming, and demanding specialized equipment. Image analysis is trending due to its speed and reproducibility. Yet, precision and accuracy differ, and inferring 3D from 2D data alone can be misleading.

Our aim is to merge both methodologies, integrating stereology's sampling principles with the image analysis capability to swiftly process a large number of images, and propose a new approach as accurate as stereology and as fast as image analysis for volume and ratio estimations.

Materials and Methods: 5 mice from metastatic lung melanoma project were studied. Each lung was sectioned at uniform constant intervals, yielding 8 sections/organ. Lung volumes, metastasis volumes, and the metastasis/lung ratio were measured using the Cavalieri principle (Volume=Area x Thickness). Stereology used the Visiopharm stereology software, while image analysis used QuPath.

Results: Regarding lung volumes, metastasis volumes, and metastasis/lung ratios no statistical differences were identified between the 2 methods ($p>0,05$), with a very strong correlation coefficient ($r=0,9$; $p=0.083$).

When comparing metastasis/lung ratios between individual slides in the same animal, some outliers were found across, and the coefficient of variation was always above 10% and reached more than 40%, indicating moderate to strong heterogeneity.

Conclusions: Our findings demonstrate that on volume estimations, integrating the sampling principles of stereology with the quantification methods of image analysis yields highly accurate volume estimations comparable to stereology. This study also confirms the inadequacy of relying solely on a single 2D section to accurately represent a 3D lesion.

Acknowledgements: The authors would like to thank the Angiogenesis Lab, CCUL@RISE for providing their slides and the Histopathology and Advanced Imaging Facility of IGC for technical contributions.