

Serras, M. Matos, R. Faísca, P. Comparação do índice de ki-67 obtido através de contagem manual e de análise automatizada (ImmunoRatio) em amostras de tumores mamários caninos, carcinomas mamários felinos e mastocitomas

COMPARAÇÃO DO ÍNDICE DE KI-67 OBTIDO ATRAVÉS DE CONTAGEM MANUAL E DE ANÁLISE AUTOMATIZADA (IMMUNORATIO) EM AMOSTRAS DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS, CARCINOMAS MAMÁRIOS FELINOS E MASTOCITOMAS

COMPARISON BETWEEN KI-67 INDEX OBTAINED BY MANUAL COUNTING AND AUTOMATED ANALYSIS (IMMUNORATIO) IN CANINE MAMMARY TUMORS, FELINE MAMMARY CARCINOMAS AND MAST CELL TUMOR SAMPLES

M. Serras^{1*}, R. Matos¹, P. Faísca¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT), Lisboa, Portugal; *Autor correspondente: pedrofaisca@ulusofona.pt

Resumo: O Ki-67 trata-se de uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular, excepto na fase de repouso, utilizada como marcador de prognóstico em vários tumores.

A contagem manual é um método amplamente utilizado para avaliar o índice de Ki-67, no entanto é moroso e pouco prático. Com este estudo, pretendeu-se comparar a contagem manual com a análise automatizada (ImmunoRatio) no cálculo do índice de Ki-67, definir a melhor metodologia para a análise de amostras através do plug-in ImmunoRatio e ainda verificar a capacidade do ImmunoRatio na análise de imagens de menor ampliação (50x). Foram analisadas um total de 18 amostras (2 mastocitomas, 11 carcinomas mamários felinos e 5 tumores mamários caninos). Em amostras homogéneas foram selecionados cinco campos aleatórios e, em amostras heterogéneas, três campos aleatórios e três campos com um elevado número de células Ki-67-positivas (hotspots). Verificou-se uma correlação forte, positiva e estatisticamente significativa e uma concordância quase perfeita entre a contagem manual e as diferentes análises realizadas no plug-in ImmunoRatio (ImmunoRatio 200x sem estroma, ImmunoRatio 400x sem estroma e ImmunoRatio 200x com estroma). O estudo sugere ainda que a utilização do plug-in em imagens de menor ampliação (50x) permite obter resultados idênticos à média das contagens manuais da mesma amostra.

Pode assim concluir-se que a utilização do ImmunoRatio pode ser uma alternativa viável e rápida à contagem manual. No entanto, sugere-se que nos casos em que se obtenham valores próximos dos valores limite indicativos de agressividade, se reconfirme com a contagem manual.

Palavras-chave: Carcinomas Mamários Felinos, ImmunoRatio, Imunohistoquímica, Ki-67, Mastocitomas, Tumores Mamários Caninos

Abstract: Ki-67 is a nuclear protein expressed in every phase of the cell cycle, except in the resting phase, which is used as a prognostic marker for various types of tumors.

Manual counting is a widely used method to evaluate the Ki-67 index, even though it is a time-consuming and laborious. In this study, the objectives were to compare the method of manual counting with automated analysis (ImmunoRatio)

when determining the Ki-67 index, to define the best methodology for sample analysis through the ImmunoRatio plug-in, and verify its capacity to analyse lower magnification images (50x).

A total of 18 samples were analysed (2 mast cell tumors, 11 feline mammary carcinomas and 5 canine mammary tumors). In homogeneous samples, five random fields were chosen and, in heterogeneous samples, three random fields and three fields with a high number of Ki-67 positive cells (hotspots) were selected.

A strong correlation, positive and statistically significant, and an almost perfect concordance between the manual count and the different analyses performed with the ImmunoRatio plug-in (ImmunoRatio 200x without stroma, ImmunoRatio 400x with stroma and ImmunoRatio 200x with stroma) were verified. This study also suggests that using the plug-in with lower magnification images (50x) allows for identical results to the manual count average for the same sample.

It can thus be concluded that the use of ImmunoRatio can be a viable and faster alternative to manual counting. Nevertheless, it is suggested that, in the cases where approximate values to the aggressiveness indicative limit are obtained, manual counting should be used to confirm these values.

Keywords: Canine Mammary Tumors, Feline Mammary Carcinomas, Immunohistochemistry, ImmunoRatio, Ki-67, Mast Cell Tumors

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a maioria da informação biomédica é adquirida através de imagens (Schindelin *et al.*, 2012). Os avanços na tecnologia em microscopia têm permitido a obtenção cada vez mais rápida, acessível e precisa de imagens biomédicas quantitativas, o que exige técnicas de processamento e de análise de imagens mais avançadas (Schindelin *et al.*, 2015). Assim sendo, os investigadores cada vez mais necessitam, a nível informático, da ajuda de programadores para solucionar determinados problemas, acabando os programadores por ter um grande impacto na investigação científica atual (Schindelin *et al.*, 2012).

O *software* NIH ImageJ, antecessor do atual *software* ImageJ, foi desenvolvido por Wayne Rasband no National Institutes of Health (NIH) em 1987 (Schneider *et al.*, 2012; Schindelin *et al.*, 2015). O imageJ é um *software* Java gratuito, simples e de fácil acesso, sendo que a sua funcionalidade pode ser alterada consoante as necessidades do usuário (Schindelin *et al.*, 2015). A adição de macros (listas de instruções simples que descrevem as ações executadas por um usuário e que o ImageJ interpreta e repete) e *plugins* ao programa, permite acrescentar

diferentes conceitos de análise de imagem (Schindelin *et al.*, 2015).

O *software* Fiji, utilizado no presente estudo, trata-se de uma variante do ImageJ, sendo que a principal diferença é o facto de apresentar os *plugins* do ImageJ já instalados e organizados por categorias, suplementando-o com funcionalidades adicionais (Schindelin *et al.*, 2012).

O ImmunoRatio trata-se de uma aplicação gratuita, desenvolvida pela Universidade de Tampere na Finlândia, que permite a análise automática de imagens histológicas imunocoradas de recetores de estrogénio, recetores de progesterona e Ki-67 (Tuominen *et al.*, 2010).

O ImmunoRatio foi desenvolvido como um *plug-in* para o *software* de análise de imagem ImageJ e é utilizado como um auxiliar de diagnóstico dirigido a técnicos treinados para avaliar amostras imunocoradas, uma vez que os resultados obtidos devem ser sempre interpretados em conjunto com as imagens das lâminas originais. Esta aplicação segmenta os núcleos diaminobenzidina (DAB) e hematoxilina da imagem que se pretende analisar, cria uma imagem na qual estes componentes se encontram corados de diferentes cores e

calcula a percentagem de área nuclear DAB sobre a área nuclear total (Tuominen *et al.*, 2010).

Este *software* apresenta dois modos de utilização, o básico e o avançado. O modo básico consiste na seleção de uma imagem e respetiva análise online, sendo que o utilizador apenas intervém na seleção do tamanho médio dos núcleos. No modo avançado é possível a intervenção do utilizador em diversas funcionalidades, tais como, a utilização de uma imagem em branco para correção do *blankfield* de modo a melhorar irregularidades na luminosidade e no equilíbrio de cores, a especificação manual da escala da imagem original, o ajuste do limiar de hematoxilina (componente azul) e DAB (componente castanho), a análise apenas de uma região de interesse definida a partir da imagem, a utilização da equação de correção de resultados para calibrar a análise e a visualização de uma tabela de resultados (Tuominen *et al.*, 2010).

Na área da Medicina Veterinária têm sido desenvolvidos vários estudos na tentativa de desenvolver métodos menos subjetivos para a previsão do comportamento e prognóstico de vários tumores. Os quatro marcadores de proliferação mais comumente reportados em Medicina Veterinária são o Ki-67, as Regiões Organizadoras Nucleolares Argirofílicas (AgNOR), o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e índice mitótico (Abadie *et al.*, 1999; Scase *et al.*, 2006, Seguin *et al.*, 2006; Romansik *et al.*, 2007). A utilização do Ki-67 como marcador de prognóstico está descrita em vários tumores, nomeadamente, mastocitomas, carcinomas mamários felinos, carcinomas mamários caninos, melanomas e linfomas, uma vez que é possível avaliar o índice de proliferação tumoral através do número de células positivas para Ki-67 na imunohistoquímica (Mukaratirwa, 2005).

2. OBJECTIVOS

A utilização do índice de Ki-67 como fator de prognóstico tem ganho popularidade em Medicina Veterinária, no entanto a contagem manual é um método moroso e

pouco prático. Assim sendo, o presente estudo tem como objetivo avaliar a aplicação do *plug-in* ImmunoRatio no *software* ImageJ, de modo a obter o índice de Ki-67 em amostras de tumores mamários caninos, carcinomas mamários felinos e mastocitomas. Para tal, avaliou-se a correlação e a concordância entre os valores obtidos através da contagem manual e da análise automatizada (ImmunoRatio) a uma ampliação de 200x.

Para além do objetivo principal acima referido, delinear-se-á ainda os seguintes objetivos secundários:

Definir a melhor metodologia para a análise de amostras no ImmunoRatio através da avaliação:

- da correlação e da concordância entre os resultados da contagem manual a uma ampliação de 200x e a análise automatizada a uma ampliação de 400x;
- da correlação e da concordância entre os resultados da análise automatizada com a presença e ausência de estroma a uma ampliação de 200x;
- da correlação e da concordância entre os resultados da contagem manual a uma ampliação de 200x e a análise automatizada com estroma a uma ampliação de 200x;
- da concordância entre as várias contagens manuais de amostras homogéneas e heterogéneas.

Verificar a capacidade de análise do ImmunoRatio em fotografias de menor ampliação (50x) através da avaliação da concordância entre:

- o valor médio da contagem manual a 200x de cada amostra e o valor obtido pela análise automatizada a uma ampliação de 50x.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção e Caracterização da Amostra

Foram analisadas um total de 18 amostras, nomeadamente, onze carcinomas mamários felinos, cinco tumores mamários caninos e dois mastocitomas. As amostras de carcinoma mamário felino foram cedidas pela Dra. Maria João Soares através da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa e as amostras de tumor

Serras, M. Matos, R. Faísca, P. Comparação do índice de ki-67 obtido através de contagem manual e de análise automatizada (ImmunoRatio) em amostras de tumores mamários caninos, carcinomas mamários felinos e mastocitomas

mamário canino e de mastocitoma foram cedidas pela Dra. Inês Carvalho através do DNATech.

Todas as amostras de carcinoma mamário felino foram obtidas a partir de uma área representativa de cada lesão (diâmetro de 0,6 cm) selecionada com o intuito de preparar 5 secções de 3 μ m. Posteriormente as secções foram secas a 60°C durante 1 hora e desparafinadas. A recuperação antigénica foi realizada através da fervura das amostras em panela de pressão (2 atm), durante 2 minutos, em solução tampão de citrato de sódio (0.01M NaCH₃COO, pH 6.0). A análise imunohistoquímica para Ki67 foi realizada com o anticorpo policlonal (Thermo Scientific) numa diluição de 1:500, sendo que este foi incubado à temperatura ambiente durante 60 minutos. A coloração foi obtida através do sistema de visualização método de conjugação modificado estreptavidina-peroxidase Novolink MaxPolymer Detection System (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Por fim, realizou-se o contraste das secções com Hematoxilina de Mayer (Merck, NJ, EUA).

As amostras de tumores mamários caninos e amostras de mastocitomas foram obtidas a partir de uma área representativa de cada lesão, impregnadas em parafina, submetidas a cortes de 3-4 μ m e colocadas em lâminas adesivadas. Posteriormente, os cortes permaneceram na estufa a 37° durante a noite e, no dia seguinte, foram desparafinados. A recuperação antigénica foi realizada no Módulo PT (Thermo Scientific) em solução tampão Tris-EDTA, pH8, durante 10 minutos. A análise imunohistoquímica para Ki67 foi realizada com o anticorpo monoclonal (SP6, Ref. 275R-14, Cell Marque™) numa diluição de 1:50, sendo que este foi incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos. A coloração foi obtida através do sistema de visualização HiDef Detection™ HRP Polymer System (Cell Marque™) e DAB. Por fim, realizou-se o contraste das secções com hematoxilina.

As lâminas foram digitalizadas através do digitalizador de lâminas HAMAMATSU

NanoZoomer-SQ Digital slide scanner C13140-01 com o *software* NDPI view, tendo-se obtido as imagens para posterior contagem manual e automatizada (ImmunoRatio).

Para a realização da contagem manual e da análise automatizada (ImmunoRatio) foram selecionados cinco campos aleatórios em amostras homogéneas e, três campos aleatórios e três campos com um elevado número de células Ki-67-positivas (*hotspots*) em amostras heterogéneas, obtendo-se um total de 102 observações individuais (n=102).

Contagem Manual

A contagem manual foi realizada em imagens com uma ampliação de 200x (\approx 1000 células) por um operador, utilizando o *software* ImageJ com o auxílio do *plug-in* Cell Counter, o qual permite a seleção manual de diferentes tipos de células. Inicialmente, selecionou-se o tipo celular que se tencionava contar e, seguidamente, clicou-se nos elementos da imagem pretendidos, surgindo na imagem um número colorido correspondente ao tipo celular selecionado e obtendo-se uma atualização do contador sempre que se realizou um novo “click”, permitindo, no final, obter um valor total de todos os “clicks” realizados. Neste trabalho utilizou-se o número 1 com cor azul para marcar as células Ki-67 negativas e o número 2 com cor vermelha para marcar as células Ki-67 positivas (Figura 1). O índice de Ki-67 foi obtido através da razão entre as células Ki-67 positivas e o número total de células da imagem.

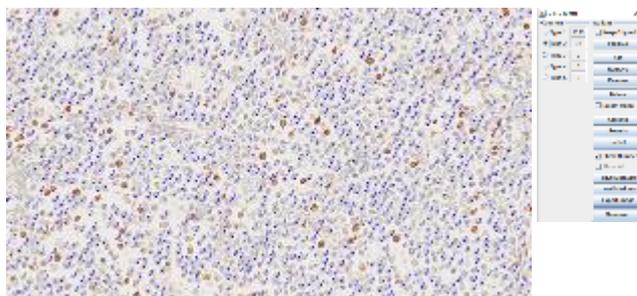


Figura 1 - Mastocitoma 200x - Contagem manual com o auxílio do *plug-in* cell counter no *software* ImageJ. 1 – células negativas para Ki-67; 2 – células positivas para Ki-67.

Análise Automatizada – ImmunoRatio

A análise automatizada foi realizada em imagens com ampliação de 50x, 200x e 400x através do *plug-in* ImmunoRatio, o qual segmenta os núcleos DAB e hematoxilina da imagem que se pretende analisar, cria uma imagem na qual estes componentes se encontram corados de diferentes cores e calcula a percentagem de área nuclear DAB sobre a área nuclear total.

Para eliminação do estroma nas imagens com ampliação de 200x e 400x, foi utilizada a função *Polygon Selection Tool* do ImageJ-Fiji, a qual permitiu criar seleções de formato irregular definidas por uma série de segmentos de linha (Figura 2). As áreas selecionadas foram removidas através de função Ctrl+F.

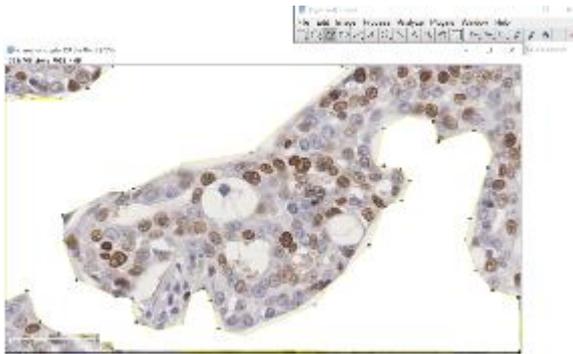


Figura 2 - Carcinoma mamário felino 400x – Exemplo da função *Polygon Selection Tool* do ImageJ-Fiji para eliminação do estroma.

Neste estudo foi utilizado o modo avançado do *plug-in*, o que permitiu a intervenção do operador na correção do *blankfield*, na especificação manual da escala da imagem original e no ajuste do limiar de hematoxilina (componente azul) e DAB (componente castanho). Os resultados obtidos pelo *plug-in* foram interpretados pelo operador em conjunto com as imagens das lâminas originais (Figura 3 e 4), tal como recomendado pelos autores do *plug-in*.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo *software* estatístico IBM SPSS Statistics 25.

Com o intuito de validar a utilização do *plug-in* ImmunoRatio, as diferentes imagens de cada amostra (cinco imagens no caso das

amostras de tumores homogêneos e seis imagens no caso das amostras de tumores heterogêneos) foram avaliadas como observações individuais, obtendo-se um total de 102 observações válidas (n=102). De maneira a comparar a contagem manual (Manual 200x) com o *plug-in* ImmunoRatio em fotografias com uma ampliação de 200x (ImR 200x) foram realizadas duas análises distintas, uma com o objetivo de avaliar correlação e outra com o objetivo de avaliar a concordância.

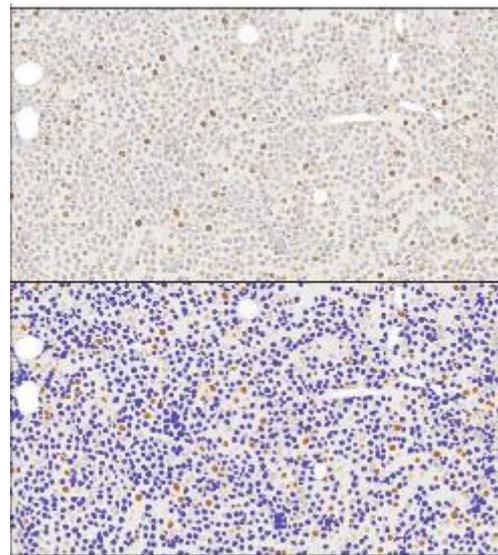


Figura 3 - Mastocitoma 200x - Análise automatizada através do ImmunoRatio. Células a azul – células negativas para Ki-67; células a laranja - células positivas para Ki-67.

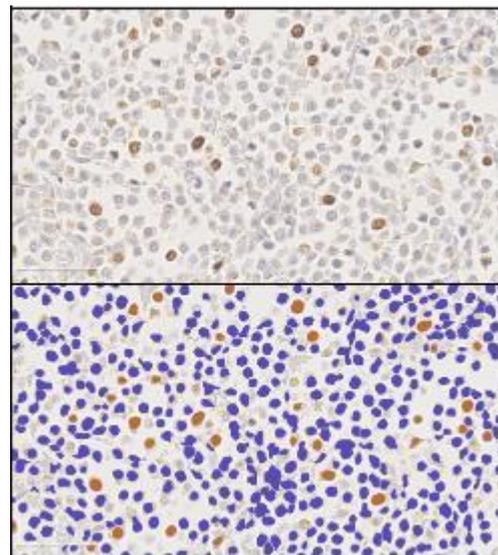


Figura 4 - Mastocitoma 400x - Análise automatizada através do ImmunoRatio. Células a azul – células negativas para Ki-67; células a laranja - células positivas para Ki-67.

Serras, M. Matos, R. Faísca, P. Comparação do índice de ki-67 obtido através de contagem manual e de análise automatizada (ImmunoRatio) em amostras de tumores mamários caninos, carcinomas mamários felinos e mastocitomas

Para a obtenção da correlação recorreu-se à avaliação da normalidade das amostras através do teste de Shapiro-Wilk. Utilizou-se a correlação bivariada para a determinação dos coeficientes de correlação, tendo sido utilizado o teste não paramétrico de Spearman, após verificados os pressupostos para a realização do teste de hipóteses. Para avaliação da concordância calculou-se o coeficiente de correlação intraclasse (ICC). Como nível de significância adotou-se o valor de 5%, admitindo-se existir uma diferença significativa quando o valor de p se apresentasse inferior a 0,05.

O ICC foi estimado com um intervalo de confiança de 95% (IC) recorrendo a modelos mistos de duas vias para avaliar a consistência entre o método manual e as outras metodologias. Um ICC elevado geralmente indica melhor consistência. Uma vez que não existem valores padrão que sejam universalmente aceites para o ICC, neste estudo foram utilizados os valores estabelecidos para o coeficiente Kappa de modo a facilitar a interpretação dos resultados (Fleiss, & Cohen, 1973): 0,00-0,20 foi interpretado como “fraca”; 0,21 a 0,40 como “razoável”; 0,41 a 0,60 como “moderada”; 0,61-0,80 como “forte”; e $> 0,80$ como “quase perfeita” (Landis, & Koch, 1977).

Posteriormente, com o objetivo de verificar qual a melhor metodologia, a correlação e a concordância foram ainda analisadas entre a contagem manual e o ImmunoRatio em fotografias com uma ampliação de 400x (ImR 400x), com o objetivo de verificar se fotografias com uma maior ampliação (400x) são representativas das zonas em análise nas fotografias de 200x. Para avaliar a necessidade da remoção de estroma compararam-se os resultados, tanto da contagem manual como do ImmunoRatio 200x sem estroma (ImR 200x), com o ImmunoRatio 200x com estroma (Estroma ImR 200x). Avaliou-se ainda a concordância entre as diferentes contagens manuais de cada amostra, de modo a verificar a variação do valor de Ki-67 entre as várias imagens. Para esta última análise, as amostras foram

agrupadas em diferentes grupos: amostras homogéneas (4 carcinomas mamários felinos e 2 mastocitomas) e amostras heterogéneas (7 carcinomas mamários felinos e 5 tumores mamários caninos).

Por fim, foi avaliada a concordância entre o valor médio das contagens manuais de cada amostra e o *plug-in* ImmunoRatio em fotografias com uma ampliação de 50x (ImR 50x).

4. RESULTADOS

Média e Desvio padrão do Índice de Ki-67

No caso dos tumores mamários caninos, a média do índice de Ki-67 obtido através do ImR 200x foi de $11,6\% \pm 6,7\%$ e a média do índice de Ki-67 obtido através do método manual 200x foi de $12,1\% \pm 7,0\%$. A média da variação entre os valores de índice de Ki-67 obtidos pelo ImmunoRatio e pelo método manual foi de $1,4\% \pm 1,4\%$. A média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia Estroma ImR 200x foi de $12,0\% \pm 6,1\%$.

Relativamente aos carcinomas mamários felinos, a média do índice de Ki-67 obtido através do ImR 200x foi de $13,9\% \pm 9,1\%$ e a média do índice de Ki-67 obtido através do método manual 200x foi de $15,9\% \pm 10,4\%$. A média da variação entre os valores de índice de Ki-67 obtidos pelo ImmunoRatio e pelo método manual foi de $2,4\% \pm 1,8\%$. A média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia Estroma ImR 200x foi de $13,0\% \pm 8,0\%$.

Nos mastocitomas a média do índice de Ki-67 obtido através do ImR 200x foi de $3,1\% \pm 2,8\%$ e a média do índice de Ki-67 obtido através do método manual 200x foi de $3,5\% \pm 3,5\%$. A média da variação entre os valores de índice de Ki-67 obtidos pelo ImmunoRatio e pelo método manual foi de $0,7\% \pm 0,8\%$. A média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia Estroma ImR 200x foi de $2,9\% \pm 2,7\%$.

Correlação entre as várias metodologias – Coeficiente de correlação de Spearman

Todas as correlações referidas na Tabela 1, são classificadas como positivas e fortes, sendo estas também consideradas estatisticamente muito significativas ($P < 0,001$).

Tabela 1 - Coeficientes de correlação do método Manual 200x com as metodologias ImR 200x e ImR 400x.

n	Correlações	Metodologia	ImR 200x	ImR 400x
102	Rho de Spearman (r_s)	Manual 200x	0,973**	0,942**

** n=102; A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

A metodologia que apresenta a correlação mais forte com o método Manual 200x é o ImR 200x ($r_s=0,973$; $P < 0,001$).

Os gráficos 1, 2 e 3 evidenciam a excelente correlação entre o método Manual 200x e o método automatizado a 200x (ImR 200x) (Gráfico 1 e 2) e a elevada correlação entre o método Manual 200x e o método automatizado a 400x (ImR 400x) (Gráfico 1 e 3), uma vez que todos os pontos se encontram muito próximos da linha de tendência.

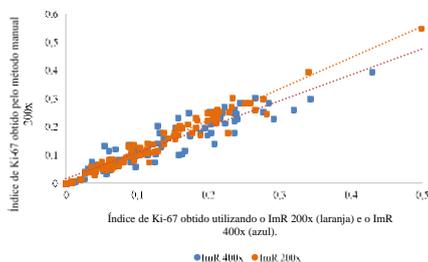


Gráfico 1 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido pelo método Manual 200x e o índice de Ki-67 obtido pelas outras metodologias (ImR 200x, ImR 400x).

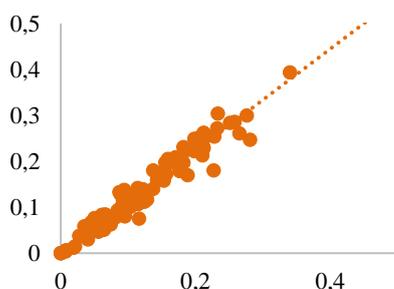


Gráfico 2 - Excelente correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método Manual 200x e no ImR 200x.

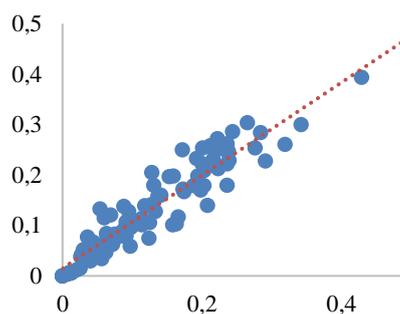


Gráfico 3 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método Manual 200x e no ImR 400x.

Seguindo a tendência verificada na análise global, todas as correlações são classificadas como positivas, fortes e estatisticamente significativas ($P < 0,001$) na análise estratificada (Tabela 2).

Tabela 2 - Coeficientes de correlação do método Manual 200x com as metodologias ImR 200x e ImR 400x estratificados pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).

n	Correlações	Amostra	Metodologia	ImR 200x	ImR 400x
30	Rho de Spearman (r_s)	Tumor mamário canino	Manual 200x	0,971**	0,909**
62	Rho de Spearman (r_s)	Carcinoma mamário felino	Manual 200x	0,971**	0,940**
10	Rho de Spearman (r_s)	Mastocitoma	Manual 200x	0,960**	0,927**

** A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades)

Os tumores mamários caninos e os carcinomas mamários felinos apresentam as correlações mais fortes entre o método Manual 200x e o método ImR 200x ($r_s=0,971$; $P < 0,001$).

Existe uma correlação positiva, forte e estatisticamente significativa tanto entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma ($r_s=0,968$; $P < 0,001$), como entre o método Manual 200x e o método ImR 200x com estroma ($r_s=0,952$; $P < 0,001$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Coeficientes de correlação do método Estroma ImR 200x com as metodologias ImR 200x e Manual 200x.

n	Correlações	Metodologia	Estroma ImR 200x
102	Rho de Spearman (r_s)	ImR 200x	0,968**
102	Rho de Spearman (r_s)	Manual 200x	0,952**

**n=102; A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Serras, M. Matos, R. Faísca, P. Comparação do índice de ki-67 obtido através de contagem manual e de análise automatizada (ImmunoRatio) em amostras de tumores mamários caninos, carcinomas mamários felinos e mastocitomas

Os gráficos 4, 5 e 6 evidenciam a elevada correlação entre o método Estroma ImR 200x e os métodos sem estroma (Manual 200x e ImR 200x), uma vez que todos os pontos se encontram muito próximos da linha de tendência.

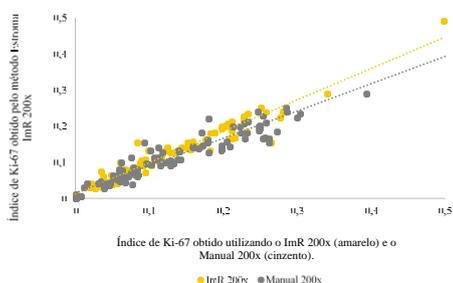


Gráfico 4 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido pelo Estroma ImR 200x e as metodologias sem estroma (ImR 200x e Manual 200x).

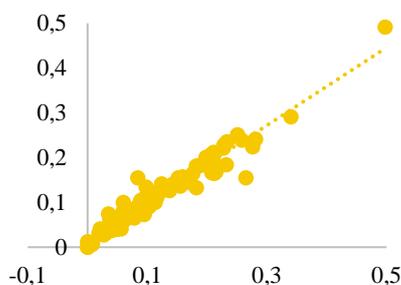


Gráfico 5 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método ImR 200x e no Estroma ImR 200x.

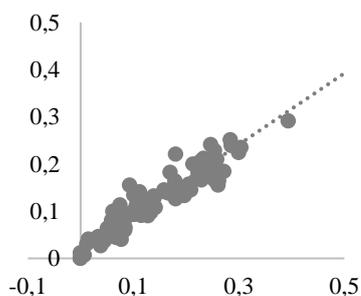


Gráfico 6 - Elevada correlação entre o índice de Ki-67 obtido no método Manual 200x e no Estroma ImR 200x.

Verifica-se na tabela 4 que todas as correlações são classificadas como positivas, fortes e estatisticamente significativas ($P < 0,001$).

Tabela 4 - Coeficientes de correlação do método Estroma ImR 200x com as metodologias ImR 200x e Manual 200x estratificados pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).

n	Correlações	Amostra	Metodologia	Estroma ImR 200X	Manual 200x
30	Rho de Spearman (r_s)	Tumor mamário canino	ImR 200x	0,935**	0,909**
62	Rho de Spearman (r_s)	Carcinoma mamário felino	ImR 200x	0,954**	0,947**
10	Rho de Spearman (r_s)	Mastocitoma	ImR 200x	0,979**	0,985**

** n=102; A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Os mastocitomas são a neoplasia que apresenta o coeficiente de correlação mais elevado entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma ($r_s=0,979$; $P < 0,001$), tal como entre o método Manual 200x e o método ImR 200x com estroma ($r_s=0,985$; $P < 0,001$), seguindo-se os carcinomas mamários felinos e por fim os tumores mamários caninos.

Concordância entre as várias metodologias – ICC

Na Tabela 5 pode observar-se uma concordância quase perfeita ($>0,80$) entre o método Manual 200x e as metodologias ImR 200x e ImR 400x, sendo que o valor de concordância mais elevado é entre o método Manual 200x e o método ImR 200x (ICC=0,972; IC 95% 0,959; 0,981; $P < 0,001$).

Tabela 5 - Concordância entre o método Manual 200x e as metodologias ImR 200x e ImR 400x

n	Metodologia	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
102	ImR 200x	0,972 (0,959; 0,981)	70,641	$< 0,001$
102	ImR 400x	0,952 (0,930; 0,967)	40,747	$< 0,001$

Verifica-se uma concordância quase perfeita ($>0,80$) entre o método Manual 200x e as metodologias ImR 200x e ImR 400x nas várias neoplasias em análise (Tabela 6).

Tabela 6 - Concordância entre o método Manual 200x e as metodologias ImR 200x e ImR 400x estratificada pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).

n	Amostra	Metodologia	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
30	Tumor mamário canino	ImR 200x	0,959 (0,916; 0,980)	47,998	< 0,001
		ImR 400x	0,933 (0,864; 0,967)	28,691	< 0,001
62	Carcinoma mamário felino	ImR 200x	0,975 (0,958; 0,985)	77,450	< 0,001
		ImR 400x	0,954 (0,924; 0,972)	42,195	< 0,001
10	Mastocitoma	ImR 200x	0,951 (0,817; 0,988)	40,029	< 0,001
		ImR 400x	0,916 (0,698; 0,978)	22,679	< 0,001

Os carcinomas mamários felinos apresentam a maior concordância entre o método Manual 200x e o método ImR 200x (ICC=0,975; IC 95% 0,958; 0,985; P<0,001), seguindo-se os tumores mamários caninos (ICC=0,959; IC 95% 0,916; 0,980; P<0,001) e por fim os mastocitomas (ICC=0,951; IC 95% 0,817; 0,988; P<0,001).

Existe uma concordância quase perfeita (>0,80) entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma (ICC=0,964; IC 95% 0,948; 0,976; P<0,001), tal como entre o método Manual 200x e o método ImR 200x com estroma (ICC=0,930; IC 95% 0,898; 0,952; P<0,001) (Tabela 7).

Na Tabela 8 pode verificar-se uma concordância quase perfeita (>0,80) entre os métodos com e sem estroma nos vários tipos de tumor em estudo, sendo que os mastocitomas apresentam o valor de concordância mais elevado, tanto entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma (ICC=0,986; IC 95% 0,946; 0,997; P<0,001), como entre o método Manual 200x e o método ImR 200x com estroma (ICC=0,958; IC 95% 0,843; 0,990; P<0,001).

Tabela 7 - Concordância entre o método Estroma ImR 200x e as metodologias ImR 200x e Manual 200x.

n	Metodologia	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
102	ImR 200x	0,964 (0,948; 0,976)	55,138	< 0,001
102	Manual 200x	0,930 (0,898; 0,952)	27,582	< 0,001

Tabela 8 - Concordância entre o método Estroma ImR 200x e as metodologias ImR 200x e Manual 200x estratificada pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).

n	Amostra	Metodologia	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
30	Tumor mamário canino	ImR 200x	0,962 (0,921; 0,982)	51,414	< 0,001
		Manual 200x	0,937 (0,872; 0,969)	30,656	< 0,001
62	Carcinoma mamário felino	ImR 200x	0,961 (0,936; 0,976)	49,984	< 0,001
		Manual 200x	0,929 (0,884; 0,956)	27,015	< 0,001
10	Mastocitoma	ImR 200x	0,986 (0,946; 0,997)	145,560	< 0,001
		Manual 200x	0,958 (0,843; 0,990)	47,115	< 0,001

Concordância entre as várias contagens manuais de amostras homogêneas e heterogêneas – ICC

Na Tabela 9 verifica-se uma concordância moderada (0,41 e 0,60) entre as várias contagens manuais de cada amostra homogênea (ICC=0,509; IC 95% 0,162; 0,883; P=0,001).

No caso dos mastocitomas obteve-se uma concordância quase perfeita (>0,80) entre as várias contagens manuais de cada amostra (ICC=0,955; IC 95% 0,723; 1,000; P<0,001), sendo que no caso dos carcinomas mamários felinos não foi possível realizar o cálculo do ICC (Tabela 10).

Tabela 10 - Concordância entre as diferentes contagens manuais de amostras homogêneas estratificada pelo tipo de tumor.

n	Amostra	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
4	Carcinoma mamário felino	-----	-----	-----
2	Mastocitoma	0,955 (0,723; 1,000)	106,495	< 0,001

Verifica-se uma concordância moderada (0,41 e 0,60) entre as várias contagens manuais de cada amostra heterogênea (ICC=0,558; IC 95% 0,324; 0,805; P<0,001) (Tabela 11).

Tabela 11 - Concordância entre as diferentes contagens manuais de amostras heterogêneas.

N	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
12	0,558 (0,324; 0,805)	8,579	< 0,001

Serras, M. Matos, R. Faísca, P. Comparação do índice de ki-67 obtido através de contagem manual e de análise automatizada (ImmunoRatio) em amostras de tumores mamários caninos, carcinomas mamários felinos e mastocitomas

Tabela 12 - Concordância entre as diferentes contagens manuais de amostras heterogêneas estratificada pelo tipo de tumor.

n	Amostra	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
5	Tumor mamário canino	0,669 (0,327; 0,949)	13,146	< 0,001
7	Carcinoma mamário felino	0,416 (0,129; 0,810)	5,276	0,001

Na Tabela 12, no caso dos tumores mamários caninos verifica-se uma concordância forte (0,61 a 0,80) entre as várias contagens manuais de cada amostra (ICC=0,669; IC 95% 0,327; 0,949; P<0,001) e no caso dos carcinomas mamários felinos observa-se uma concordância moderada (0,41 a 0,60) entre as várias contagens manuais de cada amostra (ICC=0,416; IC 95% 0,129; 0,810; P=0,001).

Concordância entre a média das contagens manuais a 200x e o método ImR 50x – ICC

Na Tabela 13 observa-se que se obteve uma concordância quase perfeita (>0,80) entre a média das várias contagens manuais a 200x e o método ImR 50x (ICC=0,879; IC 95% 0,706; 0,953; P<0,001).

Tabela 13 - Concordância entre a média das várias contagens manuais a 200x e o método ImR 50x.

n	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
18	0,879 (0,706; 0,953)	15,528	< 0,001

Pode observar-se na Tabela 14 uma concordância quase perfeita (>0,80) entre a média das várias contagens manuais a 200x e o método ImR 50x nos vários tipos de tumor em estudo, sendo que o valor de concordância mais elevado entre estas metodologias foi obtido nos mastocitomas (ICC=0,999; IC 95% 0,555; 1,000; P=0,013).

Tabela 14 - Concordância entre a média das várias contagens manuais a 200x e o método ImR 50x estratificada pelo tipo de tumor (Tumor mamário canino, Carcinoma mamário felino e Mastocitoma).

n	Amostra	ICC (IC 95%)	F-value	P - value
5	Tumor mamário canino	0,841 (0,093; 0,982)	11,574	0,018
11	Carcinoma mamário felino	0,869 (0,586; 0,963)	14,232	< 0,001
2	Mastocitoma	0,999 (0,555; 1,000)	2262,418	0,013

5. DISCUSSÃO

Está descrita a existência de uma relação entre a expressão da proteína Ki-67 e a proliferação celular (Abadie *et al.*, 1999), sendo que em Medicina Humana, o Ki-67 é o marcador de proliferação mais comumente utilizado em tumores mamários (Fitzgibbons *et al.*, 2000). Este é considerado um marcador útil e confiável na obtenção do prognóstico nestes tumores (Yerushalmi *et al.*, 2010; Dowsett *et al.*, 2011), uma vez que a sua expressão demonstrou ter uma correlação positiva com o tamanho do tumor, metastização, expressão de receptores nucleares de estrogénio, morte e baixa taxa de sobrevida (Bouzubar *et al.*, 1989; Brown & Gatter, 1990; Veronese & Gambacorta, 1992). Em Medicina Veterinária, a expressão de Ki-67 pelas células neoplásicas está significativamente associada ao prognóstico de alguns tumores (Peña *et al.*, 1998; Maglennon *et al.*, 2008), nomeadamente, em mastocitomas (Abadie *et al.*, 1999; Scase *et al.*, 2006; Webster *et al.*, 2007; Maglennon *et al.*, 2008), tumores mamários caninos (Peña *et al.*, 1998; Alenza *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2000) e carcinomas mamários felinos (Castagnaro *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2016), os quais foram abordados no presente estudo.

O presente estudo teve como objetivo validar a contagem do índice de Ki-67 através da análise automatizada (ImmunoRatio) de tumores mamários caninos, carcinomas mamários felinos e mastocitomas e comparar os resultados obtidos com os resultados da contagem manual.

O *International Ki67 in Breast Cancer Working Group* recomenda a utilização da contagem manual (preferencialmente de pelo menos 1000 células, sendo o mínimo absoluto 500 células) para a obtenção do índice de Ki-67, no entanto refere que não está estabelecida a superioridade deste método relativamente aos métodos de análise de imagem automatizados (Dowsett *et al.*, 2011). A contagem manual para contabilização do índice de Ki-67 apresenta algumas limitações, por se tratar de um método moroso e pouco

prático (Tuominen *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2016), sendo que alguns estudos referem que o valor de Ki-67 pode ser influenciado pela variação intra-observador e inter-observador (Mikami *et al.*, 2013; Polley *et al.*, 2013; Vörös *et al.*, 2013; Vörös *et al.*, 2014). Em Medicina Humana vários autores reportam a análise automatizada do Ki-67 como uma alternativa atrativa à contagem manual (Tuominen *et al.*, 2010; Fasanella *et al.*, 2011; Konsti *et al.*, 2011; Mohammed *et al.*, 2012; Klauschen *et al.*, 2015; Fulawka & Halon, 2016; Zhong *et al.*, 2016; Yeo *et al.*, 2017), sendo que no presente estudo, para a realização da análise automatizada, se utilizou o ImmunoRatio.

O ImmunoRatio foi desenvolvido como um *plug-in* (disponível online de forma gratuita) para o *software* de análise de imagem ImageJ e é utilizado como um auxiliar de diagnóstico dirigido a técnicos treinados para avaliar amostras imunocoradas (Tuominen *et al.*, 2010). A escolha do ImmunoRatio para a realização da análise automatizada do presente estudo, baseou-se no facto deste *plug-in* estar disponível online, ser de fácil acesso, ser de simples utilização e de estar descrita a sua aplicação em estudos semelhantes em Medicina Humana (Tuominen *et al.*, 2010; Yeo *et al.* 2017).

No presente estudo todas as amostras foram submetidas a imunohistoquímica, sendo que o anticorpo utilizado nas amostras de carcinoma mamário felino foi o Ki-67 *Rabbit Polyclonal Antibody* (Thermo Scientific) e o anticorpo utilizado nas amostras de mastocitomas e de tumores mamários caninos foi o Ki-67 (SP6) *rabbit monoclonal anti-human* (Cell MarqueTM). O *International Ki67 in Breast Cancer Working Group* definiu a imunohistoquímica como o método de eleição para contabilizar e monitorizar a proliferação tumoral e considera como *gold standard* o anticorpo monoclonal MIB-1 (Dowsett *et al.*, 2011). Ainda assim, o grupo sugere a comparação da utilização deste anticorpo com outros anticorpos e com outros métodos de análise de proliferação (Dowsett *et al.*, 2011), uma vez que está descrito que a utilização de

outros anticorpos anti Ki-67 pode ter vantagens adicionais (Wong *et al.*, 2007; Zabaglo *et al.*, 2010). Por exemplo, encontra-se descrito que o anticorpo Ki-67 (SP6) *rabbit monoclonal anti-human*, utilizado neste estudo, reconhece o mesmo epítipo Ki-67 repetido que o MIB-1 e pode providenciar uma maior sensibilidade (Wong *et al.*, 2007) e melhorar a análise quantitativa de imagem (Zabaglo *et al.*, 2010), pelo que a utilização deste anticorpo foi descrita com sucesso nos estudos de Cheang *et al.* (2009) e Niu *et al.* (2010). Também se encontra descrita a aplicação do anticorpo Ki-67 *Rabbit Polyclonal Antibody*, utilizado no presente estudo, no estudo de Soares *et al.* (2016), o qual pretendeu validar a utilização do índice de Ki-67 como marcador de prognóstico em gatas com carcinoma mamário e estabelecer um valor de *cutoff* para o índice de Ki-67. Tal como a contagem manual, o método de imunohistoquímica também apresenta algumas limitações, uma vez que não existe um método validado que permita a sistematização do procedimento. Dois estudos identificaram que alguns fatores pré-analíticos podem diminuir o índice de Ki-67, nomeadamente, o atraso na fixação, a congelação antes da fixação, a utilização de etanol ou solução de Bouin em vez de fixação com formalina neutra tamponada, e a utilização de protocolos com EDTA ou com descalcificação ácida (Benini *et al.*, 1997; Mengel *et al.*, 2002). Assim sendo, o *International Ki67 in Breast Cancer Working Group* propôs *guidelines* para analisar, interpretar e reportar o índice de Ki-67 de modo a reduzir a variabilidade inter-laboratório e melhorar a comparabilidade de resultados inter-estudos (Dowsett *et al.*, 2011).

No estudo de Zhong *et al.* (2016), realizado em Medicina Humana, com o objetivo de comparar a contagem manual com a análise automatizada na contabilização do índice de Ki-67 em Cancro da Mama na mulher, foram selecionados pelo menos 3 campos aleatórios com uma ampliação de 400x no caso de amostras homogéneas e 3 campos aleatórios e 3 *hotspots* com uma

ampliação de 400x no caso de amostras heterogéneas. Com base no estudo acima referido, no presente estudo foram selecionados 5 campos aleatórios com uma ampliação de 200x no caso de amostras homogéneas e 3 campos aleatórios e 3 *hotspots* com uma ampliação de 200x no caso de amostras heterogéneas. No presente estudo optou-se por analisar campos com uma ampliação menor (200x), uma vez que esta ampliação, para além de abranger um maior número de células por campo, tornando cada imagem mais representativa da amostra, é a ampliação considerada ótima para a análise automatizada no ImmunoRatio pelos autores do *plug-in* (Tuominen *et al.*, 2010). Os autores do *plug-in* exigem a média de pelo menos 3 imagens por amostra, tal como na contagem manual o *International Ki67 in Breast Cancer Working Group* recomenda a contagem de pelo menos 3 campos para estabelecer um índice de Ki-67 representativo, no entanto com uma ampliação de 400x.

No presente estudo, como o principal objetivo foi verificar e validar a utilização do *plug-in* ImmunoRatio para contabilização do índice de Ki-67 e não estabelecer um prognóstico aos animais dos quais foram recolhidas as amostras, as imagens obtidas da amostra presente na lâmina digitalizada (5 imagens nos tumores homogéneos e 6 imagens nos tumores heterogéneos) foram analisadas de forma individual (n=102). No entanto, considera-se que no futuro seria interessante a realização de um estudo semelhante, com uma amostra maior, de modo a verificar se a média do índice de Ki-67 das imagens de cada amostra obtido pela contagem manual teria um valor prognóstico idêntico à média do índice de Ki-67 das imagens de cada amostra obtido pelo ImmunoRatio. A média dos índices de Ki-67 das várias imagens de cada amostra obtidos por contagem manual, apenas foi realizada com o intuito desta ser comparada com o resultado do índice de Ki-67 obtido através do ImmunoRatio numa só imagem a 50x, uma vez que a esta ampliação se pode visualizar e

analisar uma grande parte da amostra presente na lâmina digitalizada.

O presente estudo obteve uma correlação positiva, forte e estatisticamente significativa entre o índice de Ki-67 obtido através do método Manual 200x e o índice de Ki-67 obtido através do ImmunoRatio a uma ampliação de 200x ($r_s=0,973$; $P<0,001$) e 400x ($r_s=0,942$; $P<0,001$), ou seja, os valores obtidos nos diferentes métodos, variaram no mesmo sentido. À semelhança destes resultados verificou-se uma concordância quase perfeita ($ICC>0,80$) entre o método manual e as outras metodologias, o que significa que as várias metodologias permitiram aferir resultados idênticos. De acordo com o esperado, a metodologia que apresenta a correlação mais forte e o valor de concordância mais elevado com o método Manual 200x é o ImR 200x, no entanto a correlação e a concordância entre método Manual 200x e o ImR 400x também é muito elevada, evidenciando que, neste estudo, uma imagem com uma ampliação de 400x no ImmunoRatio pode ser representativa de uma área analisada por contagem manual com ampliação de 200x. Assim sendo, à semelhança dos estudos de Tuominen *et al.* (2010) e de Yeo *et al.* (2017), os quais compararam a contagem manual com o *software* ImmunoRatio na obtenção do índice de Ki-67 no cancro da mama na mulher, verifica-se uma excelente correlação e concordância entre o método manual e o ImmunoRatio. Existem vários estudos em Medicina Humana semelhantes ao estudo Yeo *et al.* (2017), os quais reportam com sucesso a análise automatizada face à contagem manual, no entanto utilizam outros *softwares* de análise de imagem (Fasanella *et al.*, 2011; Konsti *et al.*, 2011; Mohammed *et al.*, 2012; Klauschen *et al.*, 2015; Fulawka & Halon, 2016; Zhong *et al.*, 2016).

Na análise estratificada pelo tipo de tumor, os resultados entre o método Manual 200x e o método ImR a uma ampliação de 200x e 400x seguiram a tendência verificada na análise global, ou seja, todas as correlações foram positivas, fortes e estatisticamente

significativas ($P < 0,001$) e todos os valores de ICC foram quase perfeitos. Embora os mastocitomas tenham apresentado valor de concordância ligeiramente mais baixo na análise estratificada pelo tipo de tumor, o valor de ICC obtido foi igualmente promissor, no entanto é preciso ter em conta a impossibilidade do ImmunoRatio em diferenciar eosinófilos e mastócitos, o que se pode refletir numa redução do índice de Ki-67. A elevada concordância entre o ImmunoRatio e a contagem manual nos mastocitomas poderá estar assim enviesada devido à contagem de eosinófilos pelo *plugin* e pelo próprio operador na contagem manual, uma vez que a contagem manual foi realizada com uma ampliação de 200x, o que dificultou também a distinção dos eosinófilos. Assim sendo, de modo a evitar a redução do índice de Ki-67 associada à contagem dos eosinófilos, seria interessante a realização de uma macro no ImageJ que permitisse a distinção entre eosinófilos e mastócitos tendo em conta o tamanho e a forma dos núcleos, uma vez que tal como referido por Yeo *et al.* (2017), o ImmunoRatio, ao contrário de outros programas de *software* de análise de imagens comerciais, não consegue distinguir as células tumorais das células normais através do tamanho.

No presente estudo, tal como num estudo de Medicina Humana de Yeo *et al.* (2017), o estroma foi removido nas imagens submetidas à metodologia ImR 200x e ImR 400x, de maneira a evitar que as células estromais influenciassem o valor final do índice de Ki-67, uma vez que o estudo de Sundara Rajan *et al.* (2013) demonstrou uma concordância moderada entre a contagem manual e a análise automatizada devido à falta de especificidade do algoritmo na diferenciação entre núcleos de células tumorais e não tumorais. A contagem manual tem como vantagem a capacidade do operador em distinguir células tumorais de células estromais na amostra comparativamente com o algoritmo de análise de imagem (Konsti *et al.*, 2011), o que explica o facto da média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia ImR 200x com estroma ser inferior à média

do índice de Ki-67 obtido pelo método manual nos vários tipos de tumores. Ainda assim, no presente estudo, tanto na análise global como na análise estratificada pelo tipo de tumor, obteve-se uma correlação forte, positiva e estatisticamente significativa e uma concordância quase perfeita entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma, tal como entre o método Manual 200x e o método ImR 200x com estroma. Assim sendo, a eliminação das células estromais não influenciou marcadamente os resultados entre os métodos avaliados, ou seja, os valores de correlação e concordância apesar de serem mais elevados entre o método Manual 200x e o método ImR 200x sem estroma, foram também elevados entre estes métodos e o método ImR 200x com estroma.

Na análise estratificada pelo tipo de tumor, os mastocitomas foram o tumor que apresentou os valores mais elevados de correlação e concordância, tanto entre o método ImR 200x sem estroma e o método ImR 200x com estroma ($r_s = 0,979$; $P < 0,001$; ICC = 0,986; IC 95% 0,946; 0,997; $P < 0,001$), como entre o método manual 200x e o método ImR 200x com estroma ($r_s = 0,985$; $P < 0,001$; ICC = 0,958; IC 95% 0,843; 0,990; $P < 0,001$), o que pode ser justificado pelo facto dos mastocitomas serem o tumor mais homogéneo entre os tumores em análise.

A concordância obtida entre o ImR 200x sem estroma e o ImR 200x com estroma foi mais elevada do que a concordância obtida entre o método Manual 200x e o ImR 200x com estroma em todos os tipos de tumor. Esta situação pode ser justificada pelo facto do índice de Ki-67 ser mais reduzido em ambas as metodologias automatizadas em comparação à metodologia manual, uma vez que no método ImR 200x sem estroma, os núcleos Ki-67 positivos fracamente corados podem não ter sido considerados devido ao valor de *threshold* selecionado, reduzindo erradamente o índice de Ki-67 e no método ImR 200x com estroma, para além da não contabilização de núcleos Ki-67 positivos fracamente corados, acresce o facto de ao não se eliminar o estroma, não se eliminarem

células que poderão ser consideradas Ki-67 negativas, reduzindo também o índice de Ki-67. Assim sendo, tal como esperado, nos carcinomas mamários felinos e nos mastocitomas a média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia ImR 200x com estroma foi inferior à média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia manual 200x e da metodologia ImR 200x sem estroma. Contrariamente ao esperado, no caso dos tumores mamários caninos, a média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia ImR 200x com estroma foi superior à média do índice de Ki-67 obtido através da metodologia ImR 200x sem estroma. Este resultado pode ser justificado pela possível contabilização errada de células Ki-67 positivas ao nível do estroma, o qual não foi eliminado na metodologia Estroma ImR 200x.

Nas amostras homogéneas obteve-se uma concordância moderada entre as várias contagens manuais (ICC=0,509; IC 95% 0,162; 0,883; P=0,001), uma vez que na análise estratificada pelo tipo de tumor, embora os mastocitomas tenham apresentado uma concordância quase perfeita (ICC=0,955; IC 95% 0,723; 1,000; P<0,001), não foi possível realizar o cálculo da concordância nos carcinomas mamários felinos. O erro obtido entre as várias contagens manuais dos carcinomas mamários felinos poderá ter ocorrido devido ao facto dos valores entre as imagens da mesma amostra terem uma diferença maior entre si do que os valores obtidos entre as imagens de amostras diferentes, estando este erro assim, associado ao facto destas amostras terem sido consideradas homogéneas de forma errada. Assim sendo, todas as amostras de carcinoma mamário felino deveriam ter sido consideradas amostras heterogéneas, ou seja, nas 4 amostras em que foram considerados 5 campos aleatórios, deveriam ter sido considerados 3 campos aleatórios e 3 campos *hotspot*, uma vez que, tal como referido por Dowsett *et al.* (2011), uma amostra aparentemente homogénea pode apresentar *hotspots*. O resultado de concordância obtido

entre as várias contagens manuais no caso dos mastocitomas (n=2), nos quais foram selecionados 5 campos aleatórios a 200x (cada campo com pelo menos 500 células) sugere que, neste caso, o valor do índice de Ki-67 obtido a partir de uma imagem aleatória a 200x (com pelo menos 500 células) seria representativo do valor do índice de Ki-67 da amostra. Ainda assim, é importante salientar a necessidade da realização de investigações futuras de forma a verificar este resultado, uma vez que no presente estudo a amostra de mastocitomas é bastante reduzida.

Nas amostras heterogéneas obteve-se uma concordância moderada entre as várias contagens manuais (ICC=0,558; IC 95% 0,324; 0,805; P<0,001), sendo que na análise estratificada pelo tipo de tumor, os tumores mamários caninos apresentaram uma concordância forte (ICC=0,669; IC 95% 0,327; 0,949; P<0,001) e os carcinomas mamários felinos apresentaram uma concordância moderada (ICC=0,416; IC 95% 0,129; 0,810; P=0,001). A diminuição dos valores da concordância entre as várias contagens manuais no caso dos tumores heterogéneos relativamente aos tumores homogéneos era de esperar, uma vez que a existência de zonas *hotspot* e zonas não *hotspot* leva à variação dos índices de Ki-67 entre as várias imagens obtidas a partir da mesma amostra. Este resultado evidencia a necessidade da contabilização do índice tendo em conta zonas *hotspot* quando estas estão presentes, permitindo assim uma abordagem que avalie o score médio geral da amostra, tal como referido por Dowsett *et al.* (2011).

No presente estudo obteve-se uma concordância quase perfeita entre o valor médio das contagens manuais e o ImR 50x, tanto na análise global como na análise estratificada pelo tipo de tumor. Estes resultados sugerem que a utilização do *plug-in* ImmunoRatio em fotografias de menor ampliação (50x) é viável e representativa do índice de Ki-67 obtido pela média das contagens manuais. O valor de concordância mais elevado foi obtido nos mastocitomas (ICC=0,999; IC 95% 0,555; 1,000; P=0,013),

seguindo-se o carcinoma mamário felino (ICC=0,869; IC 95% 0,586; 0,963; P<0,001) e por fim o tumor mamário canino (ICC=0,841; IC 95% 0,093; 0,982; P=0,018). Este resultado está de acordo com o previsto, uma vez que sendo o mastocitoma o tumor mais homogêneo, era de esperar que a média dos valores de Ki-67 obtidos nos vários campos selecionados para a realização da contagem manual se aproximasse mais do valor de Ki-67 obtido pelo ImR a uma ampliação de 50x, na qual se pode visualizar e analisar uma grande parte da amostra presente na lâmina digitalizada.

A média do índice de Ki-67 obtido através do ImR 200x foi inferior à média do índice de Ki-67 obtido através do método manual 200x em todos os tipos de tumor, tal como no estudo de Yeo *et al.* (2017). Este resultado poderá estar relacionado com a presença de núcleos Ki-67 positivos fracamente corados, os quais foram contabilizados na contagem manual, mas não foram considerados na análise automatizada devido ao valor de *threshold* selecionado. Ainda assim, o ajuste cuidadoso do *threshold* de azul e castanho nas diferentes amostras, no modo avançado do ImmunoRatio, foi importante para minimizar esta limitação e tornar o resultado o mais fidedigno possível. A média da variação entre os valores de índice de Ki-67 obtidos pelo ImmunoRatio e pelo método manual foi de $1,4\% \pm 1,4\%$ nos tumores mamários caninos, de $2,4\% \pm 1,8\%$ nos carcinomas mamários felinos e $0,7\% \pm 0,8\%$ nos mastocitomas. Assim sendo, sugere-se a realização da contagem manual quando os valores de Ki-67 obtidos pelo ImmunoRatio se encontrem dentro do respetivo intervalo em relação ao valor de *cutoff*.

Um estudo realizado em Cancro da Mama em mulheres recomenda a coloração imunohistoquímica dupla como uma alternativa para contornar as limitações da coloração simples e melhorar a precisão da análise automatizada (Nielsen *et al.*, 2014). Nielsen *et al.* (2014) refere que a utilização combinada do marcador Ki-67 com um marcador epitelial (ex: citoqueratina Pan – clone KL1) pode facilitar e melhorar a

distinção entre células Ki-67 positivas e negativas. Assim sendo, Nielsen *et al.* (2014) verificaram a redução acentuada do índice de Ki-67 aquando a utilização de coloração dupla, devido à interpretação de células proliferativas, linfócitos e células estromais, como células tumorais na coloração simples. Os autores referem ainda que a coloração imunohistoquímica dupla permite o destaque das células Ki-67 negativas, as quais devido à baixa intensidade de coloração podem ser subestimadas com a coloração simples, refletindo-se também na elevação do índice de Ki-67 (Nielsen *et al.*, 2014).

Vários estudos em Medicina Humana, nos quais se utilizou coloração simples, obtiveram resultados promissores na utilização da análise automatizada para obtenção do índice de Ki-67 (Tuominen *et al.*, 2010; Fasanella *et al.*, 2011; Konsti *et al.*, 2011; Mohammed *et al.*, 2012; Klauschen *et al.*, 2015; Fulawka & Halon, 2016; Zhong *et al.*, 2016; Yeo *et al.*, 2017), no entanto seria interessante a realização de estudos semelhantes, mas recorrendo a coloração imunohistoquímica dupla, uma vez que Nielsen *et al.* (2014) referem que esta coloração pode aumentar a precisão do índice, devido à melhor distinção das células proliferativas. Embora a coloração imunohistoquímica dupla pareça ser uma via interessante para melhorar a precisão da análise automatizada, esta não seria uma alternativa viável no ImmunoRatio, uma vez que o programa foi desenvolvido com o intuito de reconhecer a marcação DAB e hematoxilina. Dado que a qualidade da coloração é essencial para uma boa análise de imagem automatizada, no futuro, seria também interessante a uniformização dos protocolos de coloração imunohistoquímica, de modo a sistematizar o procedimento, reduzindo as variações inter e intra-laboratório, permitindo assim, uma comparação mais fidedigna dos resultados de diferentes estudos.

Apesar de todos os estudos referidos serem em amostras de Cancro da Mama na mulher, seria interessante a sua realização a nível da Medicina Veterinária nos diferentes tipos histológicos de tumores em que o Ki-67

Serras, M. Matos, R. Faísca, P. Comparação do índice de ki-67 obtido através de contagem manual e de análise automatizada (ImmunoRatio) em amostras de tumores mamários caninos, carcinomas mamários felinos e mastocitomas

é considerado fator de prognóstico. É ainda importante salientar que apesar do presente estudo se assemelhar aos vários estudos acima referidos, existem vários *softwares* de análise de imagem automatizada e apenas alguns estudos utilizaram o ImmunoRatio.

6. CONCLUSÃO

Com o presente estudo pode concluir-se que o ImmunoRatio pode ser uma alternativa viável e rápida à contagem manual, a qual se trata de um método moroso e pouco prático. A análise realizada sugere ainda que tanto se podem usar imagens com ampliação de 200x como de 400x e que a remoção prévia do estroma não influencia demarcadamente o índice de Ki-67, no entanto considera-se necessária a realização de mais estudos em Medicina Veterinária.

No presente estudo verificou-se ainda uma elevada concordância entre as várias contagens manuais dos mastocitomas (tumor homogéneo), sugerindo que um campo com uma ampliação de 200x (≈ 1000 células) representa a amostra, no entanto a concordância obtida no caso dos tumores heterogéneos evidenciou a importância da inclusão de zonas *hotspot* na contabilização do índice de Ki-67.

Por fim, demonstrou-se a capacidade do ImmunoRatio na contabilização do índice de Ki-67 em imagens a baixas ampliações (50x), dado que se observou uma elevada concordância entre a média das várias contagens manuais de cada amostra e o ImmunoRatio a uma ampliação de 50x, na qual se pode visualizar e analisar uma grande parte da amostra presente na lâmina digitalizada.

De modo a validar os resultados obtidos, sugere-se a realização de mais estudos da mesma natureza em Medicina Veterinária, no entanto que incluam uma amostra maior e um maior número de operadores, tanto na contabilização do índice de Ki-67 através da contagem manual como da análise automatizada.

Apesar das limitações acima referidas, considera-se o presente trabalho interessante,

dado que se trata de um estudo pioneiro em Medicina Veterinária que compara o índice de Ki-67 obtido pela contagem manual com o índice de Ki-67 obtido através de análise automatizada (ImmunoRatio).

REFERÊNCIAS

Abadie, J.J., Amardeilh, M.A., Delverdier, M.E. (1999). Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 215: 1629–1634.

Benini, E., Rao, S., Daidone, M.G., Pilotti, S., Silvestrini, R. (1997). Immunoreactivity to MIB-1 in breast cancer: methodological assessment and comparison with other proliferation indices. *Cell Prolif*, 30(3–4):107–115.

Bouzubar, N., Walker, K.J., Griffiths, K., Ellis, I.O., Elston, C.W., Robertson, J.F., *et al.* (1989). Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer*, 59:943–947.

Brown, D.C., Gatter, K.C. (1990). Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, 17:489–503.

Castagnaro, M., De Maria, R., Bozzetta, E., Ru, G., Casalone, C., Biolatti, B., *et al.* (1998). Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci*, 65(3):223–226.

Cheang, M.C., Chia, S.K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., *et al.* (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101:736–750.

Dowsett, M., Nielsen, T.O., A'Hern, R., Bartlett, J., Coombes, R. C., Cuzick J., *et al.* (2011). Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst*, 103:1656–1664.

Fasanella, S., Leonardi, E., Cantaloni, C., Eccher, C., Bazzanella, I., Aldovini, D., *et al.* (2011). Proliferative activity in human breast

- cancer: Ki-67 automated evaluation and the influence of different Ki-67 equivalent antibodies. *Diagn Pathol*, 6 (suppl 1):S7.
- Fitzgibbons, P.L., Page, D.L., Weaver, D., Thor, A. D., Allred D. C., Clark G. M., *et al.* (2000). Prognostic factors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 124:966–78.
- Fulawka, L., Halon, A. (2016) Proliferation Index Evaluation in Breast Cancer Using ImageJ and ImmunoRatio Applications. *Anticancer Res*, 36:3965-72.
- Klauschen, F., Wienert, S., Schmitt, W.D., Loibl, S., Gerber, B., Blohmer, J.U., *et al.* (2015). Standardized Ki67 Diagnostics Using Automated Scoring—Clinical Validation in the GeparTrio Breast Cancer Study. *Clin. Cancer Res*, 21:3651–3657.
- Konsti, J., Lundin, M., Joensuu, H., Lehtimäki, T., Sihto, H., Holli, K., *et al.* (2011) Development and evaluation of a virtual microscopy application for automated assessment of ki-67 expression in breast cancer. *BMC Clin Pathol* 11: 3.
- Landis, J., & Koch, G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 33(1), 159-174.
- Mengel, M., von Wasielewski, R., Wiese, B., Rudiger, T., Muller-Hermelink, H.K., Kreipe, H. (2002). Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol*, 198(3):292–299.
- Mikami, Y., Ueno, T., Yoshimura, K., Tsuda, H., Kurosumi, M., Masuda, S., *et al.* (2013). Interobserver concordance of Ki67 labeling index in breast cancer: Japan Breast Cancer Research Group Ki67 Ring Study. *Cancer Sci*, 104(11):1539–1543.
- Mohammed, Z.M.A., McMillan, D.C., Elsberger, B., Goings, J.J., Orange, C., Mallon, E., *et al.* (2012). Comparison of Visual and automated assessment of Ki-67 proliferative activity and their impact on outcome in primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*, 106(2):383–388.
- Mukaratirwa, S. (2005). Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance. A review. *Vet Q*, 27(2):52–64.
- Nielsen, P.S., Bentzer, N.K., Jensen, V., Steiniche, T., Jylling, A.M. (2014). Immunohistochemical Ki-67/KL1 double stains increase accuracy of Ki-67 indices in breast cancer and simplify automated image analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 22(8):568–576.
- Nieto, A., Peña, L., Pérezalenza, M.D., Sánchez, M.A., Flores, J.M., Castaño, M. (2000). Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol*, 37(3):239.
- Niu, G., Sun, X., Cao, Q., Courter, D., Koong, A., Le, Q.T., *et al.* (2010). Cetuximab-based immunotherapy and radio-immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 16(7):2095–2105.
- Peña, L.L., Nieto, A.I., Pérez-Alenza, D., Cuesta, P., Castaño, M. (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: Relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest*, 10 (3):237–246.
- Pérez Alenza, M.D., Peña, L., Del Castillo, N. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *J Small Anim Pract*, 41:287–291.
- Polley, M.Y., Leung, S.C., McShane, L.M., Gao, D., Hugh, J.C., Mastropasqua, M.G., *et al.* (2013). An International Ki67 Reproducibility Study. *J Natl Cancer Inst*, 105(24):1897–1906.
- Romansik, E.M., Reilly, C.M., Kass, P.H., Moore, P.F., London, C.A. (2007). Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 44: 335–341.
- Scase, T.J., Edwards, D., Miller, J., Henley, W., Smith, K., Blunden, A., *et al.* (2006) Canine mast cell tumors: correlation of

Serras, M. Matos, R. Faísca, P. Comparação do índice de ki-67 obtido através de contagem manual e de análise automatizada (ImmunoRatio) em amostras de tumores mamários caninos, carcinomas mamários felinos e mastocitomas

apoptosis and proliferation markers with prognosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20: 151–158.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682.

Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C., Eliceiri, K. W. (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 82, 518–529.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–675.

Seguin, B., Besancon, M.F., McCallan, J.L., Dewe, L.L., Tenwolde, M.C., Wong, E.K., *et al.* (2006). Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994–2002). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20: 933–940.

Soares, M., Ribeiro, R., Carvalho, S., Peleteiro, M., Correia, J., Ferreira, F. (2016). Ki-67 as a prognostic factor in feline mammary carcinoma: What is the optimal cutoff value? *Vet. Pathol*, 53:37–43.

Sundara Rajan, S, Horgan, K., Speirs, V., Hanby, A.M. (2013). External validation of the ImmunoRatio image analysis application for ER α determination in breast cancer. *J Clin Pathol*, 67:72–5.

Tuominen, V. J., Ruotoistenmäki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M., Isola J. (2010). ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Research*, 12(4):R5.

Veronese, S.M., Gambacorta, M. (1992). Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer—correlation with clinical and pathologic features. *Am J Clin Pathol*, 95:30–34.

Vörös, A., Csörg, ő. E., Nyári, T., Cserni, G. (2013). An intra- and interobserver reproducibility analysis of the Ki-67 proliferation marker assessment on core biopsies of breast cancer patients and its potential clinical implications. *Pathobiology*, 80(3):111–118.

Vörös, A., Csörg, ő. E., Kóvári, B., Lázár, P., Kelemen, G., Rusz, O., *et al.* (2014). Different Methods of Pretreatment Ki-67 Labeling Index Evaluation in Core Biopsies of Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy and Their Relation to Response to Therapy. *Pathol Oncol Res*, 21(1):147–155.

Wong, S.C., Chan, J.K., Lo, E.S., Chan, A.K., Wong, M.C., Chan, C.M., *et al.* (2007). The contribution of bifunctional SkipDewax pretreatment solution, rabbit monoclonal antibodies, and polymer detection systems in immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*, 131(7):1047–1055.

Yeo, M.K., Kim, H.E., Kim, S.H., Chae, B.J., Song, B.J., Lee, A. (2017). Clinical usefulness of the free web-based image analysis application ImmunoRatio for assessment of Ki-67 labelling index in breast cancer. *J. Clin. Pathol*, 70:715–719.

Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P.M., Hayes, M.M., Gelmon, K.A. (2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*, 11:174–183.

Zabaglo, L., Salter, J., Anderson, H., Quinn, E., Hills, M., Detre, S., *et al.* (2010). Comparative validation of the SP6 antibody to Ki67 in breast cancer. *J Clin Pathol*, 63(9):800–804.

Zhong, F., Bi, R., Yu, B., Yang, F., Yang, W., Shui, R. (2016). A comparison of visual assessment and automated digital image analysis of Ki67 labeling index in breast. *Cancer. PLoS One*, 11(2): e0150505

