



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

GUILHERME DE SOUSA VELOZO

**INTEGRAÇÃO DA PATOLOGIA DIGITAL: DA DIGITALIZAÇÃO DE LÂMINAS
HISTOLÓGICAS À GENÔMICA DE ALTA PRECISÃO**

FORTALEZA

2025

GUILHERME DE SOUSA VELOZO

INTEGRAÇÃO DA PATOLOGIA DIGITAL: DA DIGITALIZAÇÃO DE LÂMINAS
HISTOLÓGICAS À GENÔMICA DE ALTA PRECISÃO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Patologia. Área de
concentração: Oncologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Tavora.

Coorientador: Dr^a. Juliana Cordeiro.

FORTALEZA

2025

GUILHERME DE SOUSA VELOZO

INTEGRAÇÃO DA PATOLOGIA DIGITAL: DA DIGITALIZAÇÃO DE LÂMINAS
HISTOLÓGICAS À GENÔMICA DE ALTA PRECISÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Oncologia.

Aprovado em: 18/08/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Nicholas Costa Barroso Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edson Luiz Cetira Filho
Centro Universitário Christus

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V535i Velozo, Guilherme de Sousa.
 Integração da patologia digital: da digitalização de lâminas histológicas à genômica de alta
 precisão / Guilherme de Sousa Velozo. – 2025.
 108 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
 Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2025.
 Orientação: Prof. Dr. Fabio Tavora.
1. Patologia Digital . 2. Inteligência Artificial. 3. Câncer de Pulmão. 4. Sequenciamento de
 Nova Geração. 5. Implementação. I. Título.

CDD 571.9

A Deus.
Aos meus pais.
A mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mover todas as conjunturas ao meu favor.

À minha família, por todo amor incondicional emanado a mim. Nada disso faria sentido se não fosse por vocês.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos Prof. Dr. Fábio Távora e Dr^a. Juliana Cordeiro, pela excelente orientação e ensinamentos que ultrapassam o âmbito profissional.

Aos participantes da banca examinadora, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Universidade Federal do Ceará, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, por me conceder a oportunidade de ser um aspirante a cientista.

Ao Laboratório Argos, pela excelência em ser (e por todo o apoio essencial).

A todos os professores que me ensinaram lições maravilhosas durante esse curso, em especial ao Prof. Dr. Francisco Belmino Romero, por me mostrar que é possível ser gentil no mundo da ciência.

“Numa terra deserta ele o encontrou, numa região árida e de ventos uivantes. Ele o protegeu e dele cuidou; guardou-o como a menina dos seus olhos, como a águia que desperta a sua ninhada, paira sobre os seus filhotes, e depois estende as asas para apanhá-los, levando-os sobre elas.”

Mosheh 609 a.C.

RESUMO

A integração entre Patologia Digital (PD), Inteligência Artificial (IA) e análise genômica representa um novo paradigma na anatomia patológica moderna, especialmente em cenários de recursos limitados. Este estudo teve como objetivo implementar e validar um fluxo de trabalho em patologia digital, desde a digitalização de lâminas histológicas e citológicas até a aplicação de sequenciamento de nova geração (NGS), com foco em câncer de pulmão de não pequenas células. Foram realizados dois eixos complementares de investigação: (1) a implementação da PD em um laboratório de referência no Nordeste do Brasil, com validação diagnóstica por meio de 384 lâminas HE e 99 lâminas citológicas digitalizadas, o que demonstra alta concordância diagnóstica ($\kappa = 0,96$); e (2) a aplicação de IA para quantificação automatizada da composição celular e tecidual em 47 casos de câncer de pulmão, e a correlação entre características histológicas, qualidade molecular (DNA/RNA), variantes genéticas (VAF) e dados genômicos extraídos por NGS. Observou-se correlação significativa entre a quantidade de DNA e o número de células tumorais ($p = 0,59$; $p < 0,001$), bem como entre fibroblastos e concentração de DNA ($p = 0,57$; $p < 0,001$). A frequência alélica de variantes correlacionou-se positivamente com o DNA ($p = 0,41$; $p = 0,020$). A análise do microambiente tumoral revelou maior infiltração linfocítica e granulocítica em tumores com alta expressão de PD-L1 (TPS $\geq 50\%$), o que sugere perfis imunológicos distintos. Os resultados validam o uso de IA para estimativa objetiva da celularidade tumoral e reforçam a importância da seleção morfológica criteriosa para maximizar o rendimento e a acurácia das análises moleculares. Esta abordagem integrada, viável mesmo em contextos com infraestrutura limitada, pode contribuir para a expansão da oncologia de precisão em países em desenvolvimento.

Palavras-chave: Patologia Digital; Inteligência Artificial; Câncer de Pulmão; Sequenciamento de Nova Geração.

ABSTRACT

The integration of digital pathology, Artificial Intelligence (AI), and genomic analysis represents a new paradigm in modern anatomic pathology, particularly in resource-limited settings. This study aimed to implement and validate a digital pathology workflow—from whole slide imaging (WSI) of histological and cytological specimens to next-generation sequencing (NGS)—with a focus on non-small cell lung cancer (NSCLC). Two complementary axes were explored: (1) implementation of digital pathology in a reference laboratory in Northeastern Brazil, including diagnostic validation of 384 HE and 99 cervical cytology slides, which demonstrated high diagnostic concordance ($\kappa = 0.96$); and (2) application of AI-based algorithms for automated quantification of cellular and tissue composition in 47 lung cancer cases and correlation of histological features, molecular quality (DNA/RNA), variant allele frequency (VAF), and genomic data obtained via NGS. A significant correlation was observed between DNA concentration and the number of tumor cells ($p = 0.59$; $p < 0.001$), as well as between fibroblast density and DNA concentration ($p = 0.57$; $p < 0.001$). VAF was positively associated with DNA yield ($p = 0.41$; $p = 0.020$), but not with specific cellular composition. Analysis of the tumor microenvironment revealed higher lymphocytic and granulocytic infiltration in tumors with elevated PD-L1 expression (TPS $\geq 50\%$), suggesting distinct immunological profiles. These findings validate the use of AI for objective tumor cellularity estimation and underscore the importance of histological selection to optimize yield and accuracy in molecular testing. This integrated approach—feasible even in low-resource settings—may contribute to the broader implementation of precision oncology in developing countries.

Keywords: Digital Pathology; Artificial Intelligence; Lung Cancer; Next-Generation Sequencing; VAF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Disponibilidade de tecido de interesse em diferentes tipos de amostras de câncer de pulmão.....	22
Figura 2: Processo geral do fluxo do material, desde a coleta até a análise molecular.	24
Figura 3: Fluxo de implementação de Patologia Digital em um laboratório de patologia.	36
Figura 4: Fluxo de gerenciamento de dados e impacto da melhoria da qualidade dos slides.....	37
Figura 5: Fluxo de especialidade de exames e compartilhamento de imagens.	39
Figura 6: Curva ROC que demonstra a sensibilidade e especificidade entre a análise feita por meio de lâmina digital e física.	41
Figura 7: Curvas ROC para desempenho da avaliação digital em relação à física..	48
Figura 8: Caracterização das amostras: procedimento de coleta, gênero, tipo histológico e distribuições de idade.....	49
Figura 9: Distribuição de PD-L1 e alterações moleculares nos casos.	50
Figura 10: Distribuição percentual dos subtipos histológicos.	50
Figura 11: Detecção celular e diferenciação dos tipos celulares.....	51
Figura 12: Distribuição da quantificação celular e proporção de tipos celulares na amostra.	52
Figura 13: Caracterização percentual dos tipos de tecido na amostra.....	53
Figura 14: Frequência das principais alterações genéticas identificadas por NGS em amostras de pacientes com câncer de pulmão.	54
Figura 15: Frequência de alterações genéticas por subtipo histológico.	55
Figura 16: Comparação entre procedimentos de coleta para variáveis histológicas e moleculares.....	55
Figura 17: Comparação entre o tempo de armazenamento dos blocos de parafina (FFPE) as concentrações de DNA e RNA.....	57
Figura 18: Comparação celular entre subtipos histológicos pulmonares.	57
Figura 19: Comparação da quantificação celular entre grupos de PD-L1.....	58
Figura 20: Análise comparativa morfológica entre casos com e sem alterações moleculares.....	60
Figura 21: Distribuição dos tipos celulares segundo a presença de mutações em TP53, EGFR e KRAS.....	60
Figura 22: Distribuição dos tipos celulares entre subtipos de adenocarcinoma pulmonar.	61
Figura 23: Perfis genômicos médios por subtipo histológico tumoral.....	63
Figura 24: Correlação entre a frequência de variantes alélicas (VAF) e concentrações de DNA e RNA.	63
Figura 25: Correlação entre proporção de células tumorais e parâmetros de quantificação molecular.....	64
Figura 26: Correlação entre a idade dos blocos FFPE e as concentrações de DNA e RNA.....	65

Figura 27: Relação entre o número de reads e a proporção de células tumorais. ... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Síntese de apresentações dos resultados.	35
Tabela 2: Caracterização dos casos discordantes na análise por meio de lâminas de vidro e lâminas digitais.	40
Tabela 3: Resultados do questionário de confiança diagnóstica e tempo.	42
Tabela 4: Taxa geral de precisão diagnóstica de leituras de lâminas cervicovaginais físicas e digitais dos três avaliadores.	44
Tabela 5: Concordância intraobservador (Kappa e Spearman) conforme subtipos de espécime: microscopia óptica vs. imagem de lâmina inteira.	46
Tabela 6: Correlação entre características teciduais e parâmetros moleculares.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Significado
IA	Inteligência Artificial
HE	Hematoxilina e Eosina
NGS	Sequenciamento de Nova Geração (Next-Generation Sequencing)
FFPE	Formalina-Fixado e Parafina-Embutido (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded)
PD-L1	Ligante de Morte Programada 1 (Programmed Death-Ligand 1)
TPS	Tumor Proportion Score
VAF	Frequência de Variante Alélica (Variant Allele Frequency)
CPNPC	Câncer de Pulmão Não Pequenas Células (Non-Small Cell Lung Cancer)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
CEC	Carcinoma de Células Escamosas
κ	Estatística Kappa (índice de concordância)
WSI	Imagem de Lâmina Inteira (Whole Slide Imaging)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Patologia Digital	13
1.2 Validação da Patologia Digital na prática clínica	15
1.3 Aplicação de Inteligência Artificial na Patologia Digital	17
2. JUSTIFICATIVA.....	25
2.1 Implementação da Patologia Digital	25
2.2 Validação da Patologia Digital	25
2.3 Aplicação da Patologia Digital e Tecnologias Associadas	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. HIPÓTESE	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1 Validação de imagens de lâminas inteiras de HE	29
5.2 Validação de imagens de lâminas inteiras de Citologia	29
5.3 Digitalização das lâminas	30
5.3 Aplicação de IA em amostras de pulmão	31
5.4 Análises estatísticas	33
5.5 Apoio na Redação Científica.....	34
5.6 Ética	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Implementação da Patologia Digital	35
6.2 Validação da Patologia Digital	40
6.3 Aplicação de Inteligência Artificial à Patologia Digital	49
7.1 Implementação e Validação da Patologia Digital	68
7.2 Aplicação de IA à Patologia Digital.....	72
8. CONCLUSÃO	81
9. REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE I.....	95

APÊNDICE II.....	96
-------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1 Patologia Digital

O termo Patologia Digital (PD) foi introduzido pela primeira vez em 1986 por Weinstein et. al. (Weinstein, 1986), que pode ser definida como ferramenta de diagnóstico ou de pesquisa realizados à distância, ou por substituição da microscopia ótica por monitor, com Imagens de Lâminas Inteiras (Whole Slide Imaging - WSI) por meio de um link de dados ou repositório digital em servidor local. Na mesma década, os primeiros scanners de lâminas digitais tornaram-se comercialmente disponíveis ao mercado, o que levou a maiores oportunidades de compartilhamento e ensino de WSIs. Patologia Digital compreende não apenas a digitalização de lâminas por scanners, mas também o uso de softwares para navegação e anotação, algoritmos de inteligência artificial para análise morfológica automatizada, integração com sistemas laboratoriais e plataformas de ensino, além de aplicações em telepatologia, pesquisa translacional e diagnóstico remoto (Gilks; Prat, 2009; Pantanowitz et al., 2011a). Essa abordagem tem revolucionado o campo da patologia ao promover ganhos em padronização, reprodutibilidade, arquivamento, acesso remoto e análise quantitativa, além de possibilitar a integração com dados genômicos e clínicos no contexto da medicina personalizada.

A digitalização de lâminas histológicas é um processo que converte amostras coradas montadas em lâminas de vidro em arquivos digitais de alta resolução, o que permite sua visualização e análise em ambiente virtual. O procedimento é realizado por scanners automatizados que utilizam câmeras de alta performance e sistemas ópticos precisos para percorrer toda a extensão da lâmina, capturando sucessivas imagens em campos adjacentes que são posteriormente reconstruídos em um único arquivo contínuo (Pantanowitz et al., 2011b). Um aspecto técnico essencial nesse processo é o controle do plano Z, ou seja, o ajuste da profundidade de foco (Habermehl; Ko, 2019a; Volynskaya et al., 2018). Como as lâminas histológicas não são perfeitamente planas e as células podem estar distribuídas em diferentes planos, o scanner realiza um mapeamento topográfico da lâmina e executa o foco dinâmico por campo — chamado de *foco por tile* — o que garante que cada área esteja em seu plano focal ideal. Alguns sistemas mais avançados permitem a digitalização com múltiplos níveis de foco (Z-stack), criando imagens tridimensionais navegáveis que

reproduzem a variação de foco do microscópio tradicional. Esse refinamento é especialmente útil para amostras espessas, como esfregaços citológicos, materiais com sobreposição celular ou artefatos topográficos (Ahuja; Zaheer, 2025; Carretero-Barrio et al., 2024; Madabhushi; Lee, 2016a; Pantanowitz et al., 2011a). A qualidade final da imagem digital depende de vários fatores, entre as quais resolução óptica (geralmente 20x ou 40x), balanço de cor, uniformidade de iluminação, algoritmos de reconstrução de imagem e calibração do sistema. O produto é uma lâmina virtual que pode ser acessada remotamente, integrada a sistemas laboratoriais, analisada por inteligência artificial e arquivada com segurança, o que promove maior reprodutibilidade, rastreabilidade e inovação no diagnóstico anatomopatológico.

A PD oferece diversas vantagens para laboratórios de anatomia patológica, impactando positivamente a qualidade diagnóstica, a eficiência operacional e a integração com tecnologias emergentes (Pantanowitz et al., 2011b). A digitalização de lâminas permite maior padronização e reprodutibilidade diagnóstica, o que reduz variações inter e intraobservador, especialmente em avaliações morfológicas subjetivas (Hanna et al., 2020). Além disso, facilita o arquivamento e o resgate rápido de casos, eliminando o desgaste físico das lâminas de vidro e otimizando o espaço físico (Kelleher et al., 2023). A possibilidade de acesso remoto às imagens possibilita a prática da telepatologia, o que promove discussões clínicas multidisciplinares, segunda opinião diagnóstica e atuação colaborativa entre instituições (Rizzo et al., 2022). A PD também potencializa o ensino e a formação médica, o que permite o uso de lâminas digitais em plataformas educacionais.

Atualmente, o campo da patologia está cada vez informatizado, o que alimenta a evolução da tecnologia da PD; desde o uso de Inteligência Artificial (IA) nas WSIs, desde a contagem de células e identificação de atipias celulares (Azam et al., 2021a), à previsão de marcadores moleculares por meio apenas de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (Prelaj et al., 2024). Esses algoritmos de análises de alta profundidade detectam milhões de células de uma única lâmina e têm a capacidade de cálculos morfométricos extensos e minuciosos com variáveis não detectáveis pelo humano.

É inegável o fato de que a PD aponta para a disruptura da patologia diagnóstica, principalmente no uso de softwares de análise digital. Esses softwares

têm grande potencial para resolver o problema de confiabilidade e variabilidade na análise por meio de lâminas físicas (Shafi; Parwani, 2023). Uma vez treinados, os algoritmos conseguem fornecer resultados consistentes, uma vez que os dados de entrada são fornecidos (Al-Janabi; Huisman; Van Diest, 2012; Ibrahim et al., 2020; Landau; Pantanowitz, 2019). Em 2019, a organização mundial da saúde (OMS) divulgou um documento oficial intitulado “Recomendações sobre intervenções digitais para o fortalecimento do sistema de saúde”, reconhecendo que a inteligência artificial e as tecnologias digitais têm potenciais para oferecer possibilidades ilimitadas para avançar na gestão e nas conquistas da saúde (Organização Mundial da Saúde, 2020).

A Patologia Digital também facilita o compartilhamento de imagens entre patologistas, o que é especialmente relevante em países como o Brasil, onde há pouco mais de 3.800 patologistas registrados — apenas 0,8% dos médicos brasileiros (CFM-Brasil, 2023). No estado do Ceará, por exemplo, existem apenas 114 patologistas (CFM-Brasil, 2023), muitos dos quais não atuam diretamente com patologia cirúrgica. Assim, a PD pode representar uma estratégia efetiva para superar as limitações de disponibilidade de especialistas em regiões com poucos recursos (Silas et al., 2022a).

O surgimento de tecnologias baseadas em Patologia Digital também tem catalisado novos modelos para o ensino da patologia, otimizado fluxos de trabalho e criado oportunidades para o desenvolvimento de ferramentas de análise de imagem e técnicas avançadas de inteligência artificial (Pallua et al., 2020). Embora ainda em evolução, essas tecnologias oferecem soluções inovadoras para a prática clínica e a pesquisa; essencial que sejam incorporadas de forma racional, segura e validada nos modelos atuais de atuação em patologia.

1.2 Validação da Patologia Digital na prática clínica

A maioria das preparações histológicas pode ser digitalizada (como lâminas coradas por HE, imuno-histoquímica e colorações especiais, por exemplo) (Jahn; Plass; Moinfar, 2020). No entanto, existem diversas limitações para o uso de lâminas escaneadas na prática clínica de rotina. Tais incluem o tempo necessário para o diagnóstico, a qualidade da imagem gerada, a familiaridade dos patologistas com o sistema de visualização digital, a aceitação da tecnologia pelos avaliadores, bem

como desafios relacionados à sobreposição celular, à espessura e densidade de esfregaços, à presença de células em diferentes planos focais e à interferência de materiais estranhos que podem obscurecer a visualização. Além disso, a necessidade de calibragem periódica dos scanners para garantir a fidelidade da imagem, a exigência de infraestrutura tecnológica robusta (como servidores de alta capacidade, rede estável e monitores com resolução apropriada) e a capacitação de pessoal técnico-operacional para manter os fluxos digitais funcionais representam obstáculos adicionais à implementação plena da patologia digital em ambientes de rotina. (Donnelly et al., 2013; Hanna et al., 2017).

A validação da leitura de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) e de preparações citológicas é um passo fundamental para a adoção segura da patologia digital na prática diagnóstica. Diferentes tipos de amostras apresentam características morfológicas específicas que exigem avaliação criteriosa da qualidade da imagem digital, da capacidade de focalização e da fidelidade na reprodução de detalhes celulares e teciduais essenciais ao diagnóstico (Habermehl; Ko, 2019b). A interpretação morfológica de lâminas HE exige imagens com alta resolução espacial, que permitam a visualização clara de estruturas como contornos nucleares, nucléolos e limites celulares, bem como contraste cromático suficiente para diferenciar adequadamente os componentes celulares e da matriz extracelular. Já nas lâminas citológicas, a sobreposição celular, a variação na espessura do esfregaço e a presença de artefatos tornam o processo ainda mais desafiador. Por isso, é imprescindível realizar estudos de validação que comparem de forma sistemática os diagnósticos realizados em lâminas físicas e digitais, assegurando que a acurácia diagnóstica seja mantida e que a nova tecnologia possa ser integrada de maneira confiável ao fluxo de trabalho laboratorial.

No contexto do câncer do colo do útero, a validação da leitura digital de lâminas citológicas torna-se ainda mais relevante, ao se considerar a importância do rastreamento citopatológico como estratégia central para a detecção precoce da doença. Como a citologia cervical, tradicionalmente realizada por meio da análise de esfregaços em lâminas físicas, envolve a identificação de alterações sutis em células escamosas e glandulares, a transição para a leitura digital exige comprovação de que

essas alterações podem ser reconhecidas com igual precisão em imagens digitalizadas.

O câncer do colo do útero, embora amplamente prevenível e tratável quando identificado precocemente, ainda representa uma importante causa de mortalidade feminina, especialmente em regiões com acesso limitado a serviços de saúde especializados (Colpani et al., 2020). A alta prevalência de infecção por HPV na população brasileira torna ainda mais urgente a ampliação e eficiência dos programas de rastreamento (Colpani et al., 2020). Um dos fatores limitantes para a oferta nacional dos exames é o número de profissionais capacitados para avaliar as lâminas e emitir os diagnósticos. Nesse cenário, a digitalização de WSIs e o fluxo de trabalho digital surgem como propostas para otimizar tempo e espaço (Chain et al., 2019; Kim et al., 2022). Além de possibilitar maior agilidade na emissão dos laudos, essa abordagem contribui para a padronização das análises e pode ser integrada a sistemas de inteligência artificial, o que promove um rastreamento mais eficiente, equitativo e sustentável do câncer cervical no Brasil.

1.3 Aplicação de Inteligência Artificial na Patologia Digital

Atualmente, diversos modelos de programas baseados em inteligência artificial aplicando *machine learning* e *deep learning* mostram resultados promissores na sensibilidade e especificidade de análises digitais de lâminas anatomopatológicas (Madabhushi; Lee, 2016b).

Tais softwares de análise já mostraram promissores resultados em análises de regiões tumorais (Liu et al., 2017; Wang et al., 2016, 2018) e metástases linfonodais (Ehteshami Bejnordi et al., 2017) e em preparações de citologia (Azam et al., 2021b; Madabhushi; Lee, 2016c). A combinação de software de análise de imagem à análise microscópica convencional oferece uma oportunidade de transformar uma avaliação tradicionalmente qualitativa em uma análise quantitativa mais sensível e específica.

No contexto da prática clínica rotineira, os patologistas fundamentam seus diagnósticos histológicos no reconhecimento visual, na semiquantificação e na integração de múltiplas características morfológicas das amostras analisadas, ao se considerar também o contexto da doença subjacente. O avanço das metodologias de análise de imagem baseadas em inteligência artificial (IA) na área de patologia e

oncologia visam aprimorar a precisão diagnóstica e identificar novas estratégias de biomarcadores para a oncologia de precisão (Bera et al., 2019).

A integração desses softwares de IA à patologia digital tem se mostrado uma ferramenta valiosa no contexto do câncer de pulmão, especialmente quando associada à análise molecular por Sequenciamento de Nova Geração (NGS - Next-Generation Sequencing) (Kludt et al., 2024). Esses algoritmos avançados são capazes de identificar e quantificar com precisão a área tumoral em lâminas digitalizadas, fornecendo uma estimativa mais acurada da celularidade neoplásica (Bera et al., 2019) — um dado crítico para a viabilidade e a sensibilidade dos testes de NGS. Em amostras pequenas e heterogêneas, como biópsias endobrônquicas ou punções aspirativas, a seleção manual das áreas tumorais pode ser subjetiva e variável entre observadores (Madabhushi; Lee, 2016c). A IA, nesse cenário, atua como suporte ao patologista, oferecendo maior padronização na seleção de regiões tumorais, o que reduz o risco de subestimação da quantidade de DNA/RNA tumoral. Essa sinergia entre patologia digital e NGS fortalece a acurácia diagnóstica e o sucesso na identificação de biomarcadores acionáveis, o que contribui diretamente para a definição de terapias-alvo em pacientes com câncer de pulmão.

O câncer é uma doença genética e resultado do acúmulo de mutações somáticas, que vão desde variantes de nucleotídeo único (SNVs), inserções/deleções (indels) de alguns nucleotídeos, até variações no número de cópias (CNVs) e grandes variantes estruturais (SVs) (Awada; Neyns, 2022; Bhai et al., 2023). Devido às reduções contínuas de custo e aumento no rendimento, o NGS se tornou abordagem clínica promissora para compreensão e diagnóstico do câncer (Bhai et al., 2023). Portanto, a análise do perfil molecular de tumores tornar-se uma prática essencial no diagnóstico médico, prognóstico e planejamento terapêutico de pacientes com câncer.

O câncer de pulmão se apresenta como um dos cânceres mais comuns no mundo, com alta taxa de morbidade e mortalidade (Forde et al., 2022). De acordo com a histologia das células cancerosas, o câncer de pulmão pode ser classificado principalmente em dois tipos: câncer de pequenas células (CPPC) e câncer de células não pequenas (CPCNP) (Abdelaziz et al., 2018). O CPCNP é o subtipo mais frequente, representando entre 85% e 90% de todos os casos de câncer de pulmão;

dentro do CPCNP, existem diversos subtipos histológicos, como o adenocarcinoma de pulmão (DALP), o carcinoma escamoso de pulmão e o câncer de pulmão de grandes células (Abdelaziz et al., 2018).

A compreensão global da epidemiologia do câncer de pulmão passou por uma significativa transformação, destacando-se o reconhecimento da diversidade da doença. Isso significa que o câncer de pulmão não pode mais ser visto de forma simplista como uma condição que afeta exclusivamente homens mais velhos e fumantes (Bade; Dela Cruz, 2020). O câncer de pulmão não resulta da transformação repentina do epiteloma brônquico, mas do estágio final da carcinogênese em múltiplos estágios, com alterações genéticas e epigenéticas gradualmente crescentes (Wadowska et al., 2020), o que evidencia que mutações são uma característica inerente do desenvolvimento do câncer de pulmão, e sua detecção tem um significado tanto no diagnóstico quanto no tratamento da doença.

Antes, a abordagem terapêutica era baseada principalmente no tipo histológico (carcinoma de pequenas células ou não pequenas células) e no estágio da doença, com a quimioterapia como principal recurso (J. Saller; Boyle, 2022). No entanto, com os avanços da genômica e da biologia molecular, descobriu-se que muitos tumores pulmonares apresentam alterações genéticas específicas que podem ser alvo de medicamentos precisos, inaugurando uma nova era na oncologia: a medicina de precisão.

Assim, os métodos moleculares se apresentam como fundamentais no diagnóstico e no direcionamento terapêutico do câncer de pulmão. A imunohistoquímica (IHQ) é amplamente utilizada para a caracterização do tumor, o que permite a diferenciação entre adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas, além da avaliação de biomarcadores prognósticos e preditivos. Um exemplo é a detecção da expressão de PD-L1, que orienta o uso de imunoterápicos como inibidores de checkpoint imunológico (Beasley, 2024). Outra técnica importante é a hibridização in situ por fluorescência (FISH), usada para identificar rearranjos gênicos, como no gene da proteína ALK, presente em uma pequena porcentagem dos pacientes com adenocarcinoma pulmonar e indicativo de resposta a inibidores de tirosina quinase (Damuzzo et al., 2025; Solomon et al., 2014).

Além disso, o RT-PCR (transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) permite a detecção de fusões gênicas, como aquelas envolvendo ROS1 e NTRK, também relevantes para a escolha de terapias-alvo (Imyanitov; Iyevleva; Levchenko, 2021). Com a evolução da genômica, o NGS tornou-se essencial para a análise abrangente do perfil molecular do tumor, o que permite a detecção simultânea de múltiplas alterações genéticas em genes como EGFR, KRAS, BRAF, MET e TP53, além de avaliar a carga mutacional do tumor (TMB) e a instabilidade de microssatélites (MSI), que também podem influenciar a escolha do tratamento (Imyanitov; Iyevleva; Levchenko, 2021; J. Saller; Boyle, 2022; Wadowska et al., 2020).

A escolha do método depende da necessidade clínica e da disponibilidade da amostra de tecido e o NGS é a abordagem mais abrangente para identificar alterações genéticas acionáveis e personalizar o tratamento do câncer de pulmão, otimizando as chances de resposta e melhorando o prognóstico dos pacientes.

Enquanto os testes moleculares tradicionais focam na análise isolada de mutações específicas desses pacientes, o advento do NGS possibilita a avaliação simultânea de painéis de múltiplos genes. Isso reduz significativamente os custos dos testes e de tempo de resposta, com estudos recentes que demonstram a eficácia da tecnologia na caracterização molecular de diversos tipos de câncer (Ettinger et al., 2021); as abordagens médicas atuais para pacientes com tumores em estágio avançado para alguns tipos de câncer podem envolver tratamento com terapias-alvo que podem demonstrar uma melhor sobrevida (Benson et al., 2021; El-Deiry et al., 2019; Hanahan; Weinberg, 2000).

A implementação de protocolos padronizados para triagem genômica tem proporcionado impactos significativos no manejo de pacientes oncológicos (Ettinger et al., 2021), e o perfil molecular tornou-se indispensável para quase todos os casos de tumores sólidos metastáticos. As metodologias e diretrizes para essa prática estão em constante revisão, acompanhando o surgimento de novas tecnologias e biomarcadores de importância clínica. Entretanto, a escolha entre painéis direcionados a doenças específicas ou painéis abrangentes representa um desafio, ao se considerar fatores como custo, tempo de resposta e otimização de recursos em diferentes contextos clínicos (Nakagawa; Fujita, 2018), principalmente em ambientes de baixo recurso.

A utilização de amostras fixadas em formol e embebidas em parafina (FFPE) é uma prática padrão na patologia diagnóstica, o que garante a preservação dos tecidos para análises posteriores (Berrino et al., 2020). No entanto, essas amostras apresentam desafios específicos para o NGS, principalmente devido à degradação e fragmentação do DNA e RNA induzidas pelo processo de fixação. A qualidade do material extraído é um fator crítico que impacta a eficiência do sequenciamento e a interpretação dos resultados (Berrino et al., 2020).

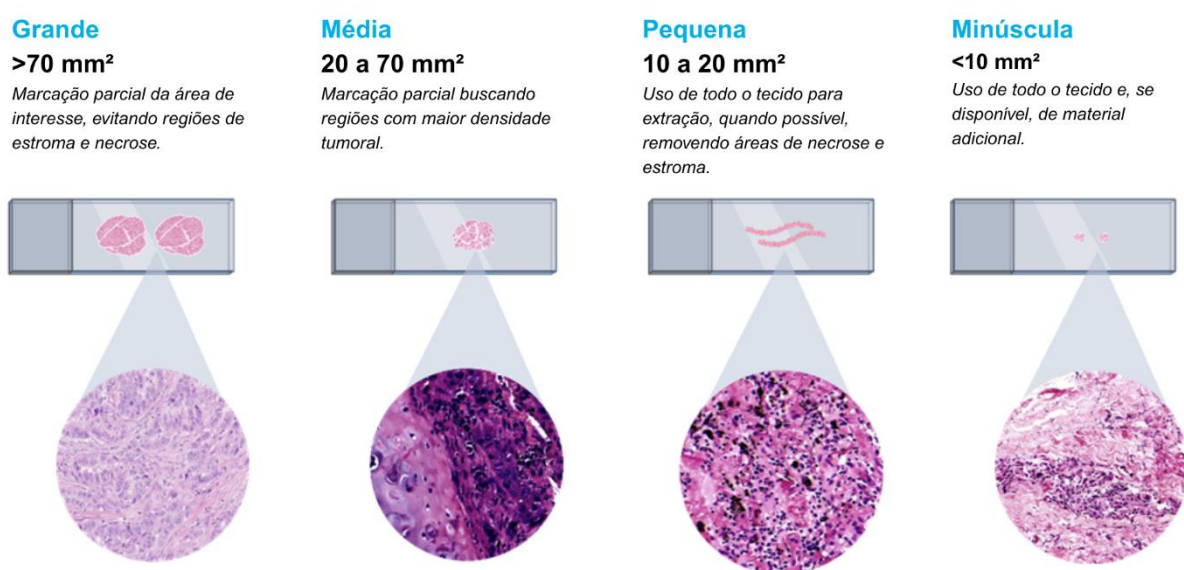
Entre os desafios técnicos associados ao uso de blocos de parafina, a extração de ácidos nucleicos íntegros é um dos mais relevantes. O tempo de fixação, a qualidade do formol utilizado e as condições de armazenamento influenciam diretamente a integridade do DNA e RNA (Berrino et al., 2020). Métodos otimizados de extração, purificação e quantificação são fundamentais para garantir um rendimento adequado para o sequenciamento. Estratégias como a amplificação de alvos específicos, uso de painéis de genes otimizados para amostras degradadas e a bioinformática avançada para correção de artefatos são frequentemente empregadas para contornar essas limitações (Salgkamis et al., 2024).

A análise de amostras de câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) através de NGS em tecidos FFPE requer rigorosa quantificação da frequência alélica de variantes (VAF) e profundidade de reads para garantir resultados clinicamente confiáveis. A detecção eficaz de mutações com frequência alélica $\geq 5\%$ exige cobertura $>500x$ (Jiang et al., 2020) e é essencial a caracterização precisa da celularidade tumoral nas lâminas histológicas, uma vez que o VAF representa a porcentagem de reads que correspondem a uma variante específica dividida pela cobertura total naquele *locus* (Strom, 2016). A implementação de inteligência artificial na patologia digital tem revolucionado essa abordagem, o que permite diagnósticos mais rápidos, de maior qualidade e precisão através de algoritmos avançados de IA e técnicas de diagnóstico assistido por computador (Shafi; Parwani, 2023). Sistemas de IA aumentam a revisão histopatológica por meio de análise de imagem para otimizar o rendimento de DNA de lâminas FFPE (Osinski et al., 2022), facilitando a identificação automatizada de áreas tumorais e a estimativa da pureza tecidual. Esses parâmetros são cruciais para a interpretação adequada dos valores de VAF. Isso assegura que os reads de NGS reflitam fidedignamente o perfil molecular do tumor.

Os fatores pré-analíticos impactam diretamente a qualidade das análises moleculares no câncer de pulmão. A isquemia fria deve ser minimizada para evitar degradação do RNA e DNA, o tempo de fixação em formol deve ser entre 6 e 48 horas para preservar a integridade molecular, a descalcificação com agentes agressivos compromete ácidos nucleicos e proteínas, afetando testes como IHQ e NGS, além disso, blocos de parafina armazenados por longos períodos podem sofrer degradação (Bass et al., 2014a). A seleção da amostra deve priorizar regiões com boa representatividade tumoral, evitando áreas extensas de necrose e fibrose (Souza da Silva et al., 2022b). Métodos como macrodissecção e microdissecção aumentam a sensibilidade dos testes, o que garante resultados mais precisos para o manejo clínico.

Diferentes métodos de biópsia podem modificar a quantidade e a integridade do DNA e do RNA disponíveis para a análise, bem como a proporção de células tumorais na amostra (figura 1). A otimização dos protocolos de coleta, fixação em formol, inclusão em parafina e extração de DNA e de RNA é essencial para garantir resultados confiáveis, o que permite uma melhor aplicação da medicina de precisão no câncer de pulmão.

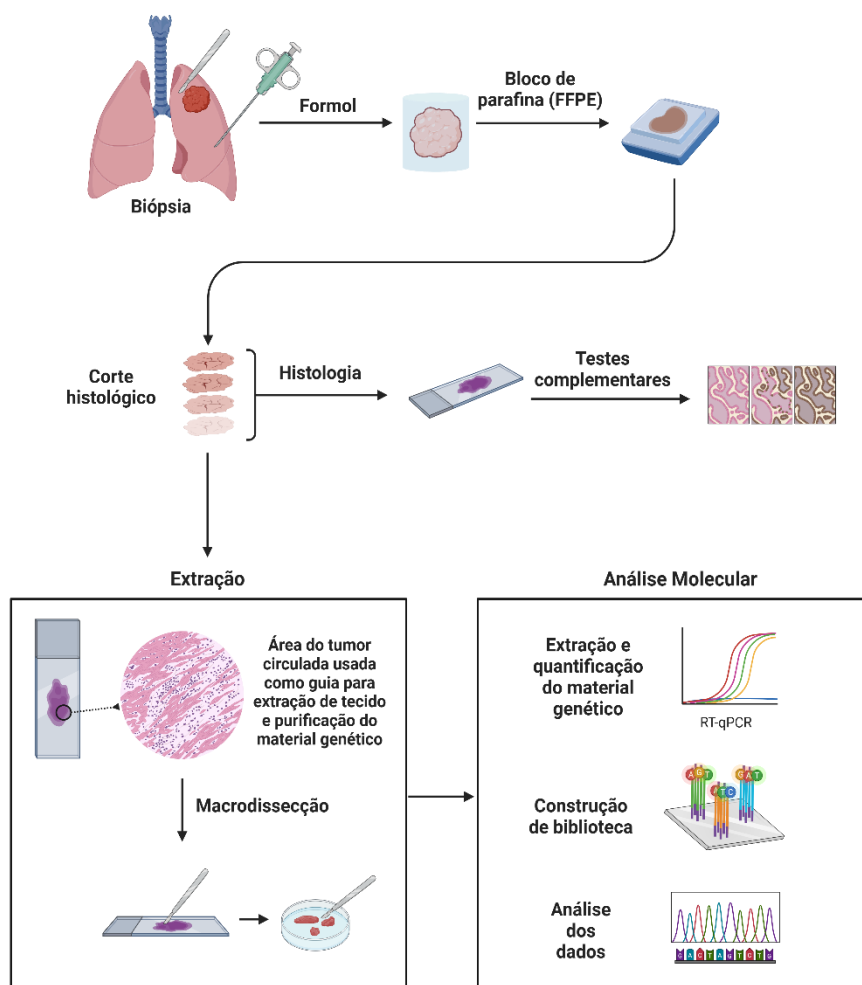
Figura 1: Disponibilidade de tecido de interesse em diferentes tipos de amostras de câncer de pulmão.



Legenda: As amostras foram categorizadas em quatro grupos com base na área tumoral mensurada: Grande ($>70 \text{ mm}^2$), com marcação parcial evitando estroma e necrose; Média ($20\text{--}70 \text{ mm}^2$), com marcação parcial priorizando regiões tumorais densas; Pequena ($10\text{--}20 \text{ mm}^2$), com uso de todo o tecido disponível, excluindo áreas de necrose e estroma quando possível; e Minúscula ($<10 \text{ mm}^2$), com uso integral do tecido e de material adicional, quando disponível.

Estudos mostrando o uso bem-sucedido de NGS na identificação de mutações de malignidades hematológicas, tumores sólidos e espécimes citológicos são esparsos na discussão de fatores pré-analíticos ou de requisitos mínimos de tecido que podem influenciar a taxa de sucesso de NGS (Goswami et al., 2016). Além disso, uma proporção considerável de espécimes de tumores sólidos é obtida por biópsias pequenas (biópsias por agulha) ou por aspiração por agulha fina (PAAF), e a quantidade de tecido disponível para análise de NGS é frequentemente limitada (figura 2).

Figura 2: Processo geral do fluxo do material, desde a coleta até a análise molecular.



Apesar dos desafios, o NGS aplicado a amostras de FFPE apresenta vantagens significativas. A possibilidade de avaliar simultaneamente múltiplas mutações, fusões gênicas e variações no número de cópias permite uma caracterização abrangente do perfil molecular tumoral (Noji et al., 2022). Além disso, a ampla adoção desse método na prática clínica impulsionou o desenvolvimento de protocolos validados que aumentam a confiabilidade dos resultados, possibilitando a tomada de decisões terapêuticas mais precisas (Hunt et al., 2025; Roy et al., 2018).

2. JUSTIFICATIVA

A presente proposta está estruturada em três eixos complementares: (1) implementação da Patologia Digital em um laboratório de anatomia patológica situado em contexto de recursos limitados, enfrentando desafios tecnológicos, operacionais e estruturais; (2) validação da acurácia diagnóstica da leitura digital em comparação à análise convencional de lâminas físicas, com foco em amostras histopatológicas, citopatológicas e genômicas; e (3) aplicação da tecnologia integrada a ferramentas de inteligência artificial e ao NGS, visando otimizar a seleção de áreas tumorais e qualificar a interpretação molecular no contexto do câncer de pulmão, o que contribui para a consolidação da patologia de precisão.

2.1 Implementação da Patologia Digital

A constante evolução das tecnologias diagnósticas tem impulsionado transformações significativas na prática da anatomia patológica, especialmente com o advento da PD. Essa abordagem, baseada na digitalização de lâminas histológicas por meio de sistemas de varredura, viabiliza a análise de imagens em alta resolução em ambientes digitais, o que promove avanços em termos de acessibilidade, reprodutibilidade e integração com ferramentas computacionais, entre os quais algoritmos de inteligência artificial. No entanto, no contexto brasileiro — particularmente em regiões com recursos limitados —, a adoção da PD ainda é incipiente, em razão de barreiras estruturais como o alto custo dos equipamentos, a necessidade de infraestrutura tecnológica robusta e a escassez de protocolos padronizados e validados. Apesar desses desafios, a implementação da PD representa uma oportunidade concreta de modernização, possibilitando otimização dos fluxos laboratoriais, ampliação do acesso à segunda opinião diagnóstica, atuação remota de patologistas e integração com áreas emergentes como a genômica e a medicina personalizada.

2.2 Validação da Patologia Digital

Diante da crescente adoção da PD, torna-se essencial validar sua aplicabilidade em condições reais de prática laboratorial, especialmente em ambientes de recursos restritos. Neste estudo, propõe-se a implementação e avaliação da Patologia Digital em um laboratório de anatomia patológica, com foco em análises histopatológicas, citopatológicas e genômicas. O objetivo é comparar a

acurácia diagnóstica da leitura digital frente à microscopia óptica convencional, explorando também os limites e benefícios da tecnologia quanto a aspectos operacionais, técnicos e econômicos. A validação da PD em cenários como esse é fundamental para garantir a confiabilidade diagnóstica, promover a adesão institucional e oferecer subsídios para a expansão segura da tecnologia no sistema de saúde.

2.3 Aplicação da Patologia Digital e Patologia Molecular

Para além da digitalização em si, a Patologia Digital oferece um campo promissor de aplicação quando integrada à genômica e à inteligência artificial. Essa convergência é especialmente relevante no câncer de pulmão, uma neoplasia de alta mortalidade, marcada por ampla heterogeneidade histológica e molecular. O avanço das terapias-alvo e da imunoterapia nas últimas décadas tornou imprescindível a caracterização genômica dos tumores e o sequenciamento de nova geração (NGS) é uma ferramenta essencial para a identificação simultânea de múltiplas alterações com valor diagnóstico, prognóstico e preditivo. Nesse cenário, a integração entre a análise morfológica assistida por IA e a genotipagem molecular configura uma estratégia inovadora para padronizar a seleção de áreas tumorais, aumentar a eficiência da análise e qualificar a interpretação dos dados genômicos. A incorporação de ferramentas automatizadas para caracterização celular quantitativa visa aprimorar a seleção de amostras e reduzir a variabilidade interobservador, o que promove uma abordagem diagnóstica mais robusta, reprodutível e alinhada ao modelo da medicina de precisão. Além disso, sua viabilidade em contextos com recursos limitados pode representar um avanço concreto na democratização do acesso à oncologia de precisão no Brasil.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Implementar e avaliar a Patologia Digital em um laboratório de anatomia patológica, integrando-a às rotinas diagnósticas e à análise genômica, com foco na acurácia, aplicabilidade e potencial de ampliar o acesso a diagnósticos de qualidade.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Descrever o processo de implementação da Patologia Digital (PD) em um laboratório localizado no Nordeste do Brasil;
- ii. Investigar os impactos da digitalização de lâminas na rotina laboratorial, bem como a otimização do fluxo de trabalho;
- iii. Avaliar os critérios de controle de qualidade aplicados às lâminas digitalizadas, bem como as ações corretivas realizadas para garantir imagens de alta qualidade e diagnósticos consistentes.
- iv. Avaliar o desempenho do escaneamento digital de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) e lâminas citológicas cervicais (Papanicolau), por meio da mensuração da qualidade técnica das imagens obtidas;
- v. Investigar o nível de confiança dos avaliadores na interpretação de lâminas digitalizadas, por meio de uma escala de pontuação e correlacionando com o tempo de diagnóstico.
- vi. Caracterizar a composição celular das amostras, quantificando células tumorais e não tumorais;
- vii. Correlacionar a proporção de células tumorais (identificadas por IA) com a quantidade de DNA/RNA extraído;
- viii. Avaliar a relação entre a proporção de tecido tumoral e a frequência alélica de variantes (VAF);
- ix. Investigar o impacto de fibrose, inflamação e necrose na qualidade das análises de NGS;
- x. Verificar se o tipo de procedimento (biópsia vs. peça cirúrgica) influencia a concentração de material genético e o sucesso do sequenciamento;
- xi. Analisar a associação entre a porcentagem tumoral e o número de *reads* obtidos no NGS.

4. HIPÓTESE

A implementação da Patologia Digital (PD) em um laboratório com recursos limitados permite a realização de diagnósticos mais rápidos e confiáveis, com níveis de concordância comparáveis aos das lâminas físicas. A aplicação subsequente de inteligência artificial (IA) contribui para uma estimativa mais precisa da celularidade tumoral, impactando positivamente na qualidade e no rendimento das análises moleculares por NGS.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Validação de imagens de lâminas inteiras de HE

As diretrizes do Colégio Americano de Patologistas (CAP) recomendam um mínimo de 60 lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) e pelo menos 20 lâminas adicionais para cada técnica auxiliar. Para garantir uma avaliação imparcial pelo mesmo avaliador (período de “washout”), o intervalo entre a comparação digital e a comparação com lâminas físicas deve ser de, no mínimo, 2 semanas. Um total de 64 casos com laudos (384 lâminas) foi selecionado aleatoriamente dos arquivos do laboratório de referência e utilizado no estudo de validação. As lâminas foram escaneadas com ampliação de 40x e consideradas satisfatórias pelos patologistas. Esses casos correspondiam a 384 lâminas coradas com hematoxilina e eosina, todas do ano de 2022. Dois patologistas experientes (A e B) participaram do estudo, diagnosticaram os casos por meio de lâminas digitais e, posteriormente, receberam as mesmas lâminas físicas de forma cega. As lâminas físicas foram agrupadas por caso, e suas identificações (nome do paciente e código de barras 2D) foram ocultadas. Os dados clínicos necessários dos pacientes estavam disponíveis por meio de uma plataforma web (Google Forms®). Em seguida, os patologistas receberam as lâminas físicas e foram encarregados de emitir um diagnóstico. Os diagnósticos das lâminas digitais e físicas foram comparados, e um patologista externo participou da comparação dos laudos, realizando a padronização dos diagnósticos. As lâminas digitais utilizadas foram laudadas pelos mesmos patologistas que participaram do estudo; assim, foram realizadas análises de concordância interobservador.

5.2 Validação de imagens de lâminas inteiras de Citologia

Um total de 100 lâminas de citologia vaginal de um laboratório de referência no Nordeste do Brasil foi selecionado retrospectivamente a partir de um banco de casos diagnosticados com lâminas físicas padrão. Foram incluídas lâminas sequenciais com atipias epiteliais, ou seja, lesões intraepiteliais escamosas (ASCUS – Atipias de Significado Indeterminado em Células Escamosas; LSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau; ASC-H – Atipia de Células Escamosas, não se pode excluir lesão de alto grau; HSIL – Lesão Intraepitelial de Alto Grau) e lâminas sem alterações celulares epiteliais. Dentro de cada grupo, as lâminas foram selecionadas aleatoriamente no mesmo período. Esses 100 casos foram digitalizados, e todas as

imagens das lâminas foram disponibilizadas de forma cega para os mesmos avaliadores que haviam lido as lâminas físicas. Os casos foram processados por meio de preparação líquida, baseada no sistema SurePath, seguindo procedimentos padrão. Cada lâmina recebeu uma numeração não identificável, cega para os citotécnicos. Três citotécnicos experientes participaram da análise por meio de imagens digitais completas. O diagnóstico previamente estabelecido na lâmina de vidro foi considerado o padrão-ouro. Um patologista experiente participou do delineamento do estudo e da análise dos dados.

As imagens digitalizadas foram compartilhadas com os avaliadores por meio de um sistema online, no qual cada citotécnico teve acesso individual aos 100 casos. As telas utilizadas para visualização apresentavam resolução de 1280 x 1084 pixels.

As lâminas físicas foram avaliadas em um microscópio Olympus CX22®, por meio de lentes objetivas de 20x e 40x, com ocular de 10x. Todas as lâminas que apresentaram algum grau de atipia celular foram revisadas por um patologista experiente, e os diagnósticos foram confirmados antes da emissão dos laudos. Os avaliadores tiveram o prazo de uma semana para realizar a leitura das lâminas digitais. Antes da análise das imagens digitalizadas, os avaliadores passaram por um treinamento básico no sistema de visualização. Para cada caso, o avaliador preenchia um formulário no GoogleForms® contendo o diagnóstico com base na classificação de Bethesda vigente. Ao final da análise, foi gerado um relatório geral. Uma das lâminas apresentou imagem corrompida e, por isso, foi excluída do estudo.

5.3 Digitalização das lâminas

Todas as lâminas foram escaneadas no equipamento MoticEasyScan Infinity 100 (Motic, Vancouver, CA). O scanner é um sistema de digitalização de lâminas de alta performance, projetado para atender às demandas crescentes da patologia digital em ambientes clínicos e acadêmicos. Equipado com objetivo apocromático de 20 e 40×, o equipamento atinge resolução de até 0,13 µm/pixel, o que permite a visualização precisa de detalhes morfológicos subcelulares, como nucléolos, membranas e estruturas citoplasmáticas delicadas. Seu sistema de autofocus em tempo real, aliado aos modos de varredura com Z-stack e Extended Depth of Field (EDF), possibilita a digitalização de amostras espessas ou com topografia irregular —

como esfregaços citológicos ou tecidos com sobreposição celular — o que garante foco uniforme e reprodutibilidade diagnóstica. A câmera integrada de 12 megapixels, combinada com iluminação LED de alta durabilidade, assegura nitidez, contraste cromático e estabilidade de cor ao longo do tempo. O sistema conta ainda com bandeja automatizada e tecnologia *Smart Tray*, que organiza as lâminas, agiliza o escaneamento e reduz o tempo de manipulação manual. Com alta capacidade de processamento, o EasyScan Infinity é capaz de digitalizar mais de 1.000 lâminas por semana.

5.3 Aplicação de IA em amostras de pulmão

5.3.1 Seleção dos casos

Este estudo prospectivo utilizou amostras de tecido de pacientes com câncer de pulmão de uma única instituição de forma sequencial de 2023 a 2024 e incluiu 47 pacientes. Amostras de tecido tumoral foram coletadas por meio de procedimentos cirúrgicos e biópsias, seguindo protocolos padronizados para fixação em formalina e inclusão em parafina (FFPE).

5.3.2 Sequenciamento de Nova Geração

A primeira etapa consistiu na análise do patologista para escolha do bloco com maior porcentagem tumoral e menos interferentes (necrose, inflamação ou mucina), as amostras foram submetidas ao corte histológico resultando em 6 cortes de dois micrômetros. Após o corte, as amostras foram desparafinizadas com xilol e etanol e, posteriormente, tratadas com enzima proteinase K para viabilizar a degradação de proteínas e exposição do material genético. A extração do DNA e RNA foi realizada por meio do kit MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante.

Após a extração, as amostras foram quantificadas por meio de qPCR para determinar regiões amplificáveis de DNA e RNA. A amplificação foi realizada seguindo as etapas: desnaturação a 95°C por 3 min e 39 ciclos a 95°C por 10 segundos seguidos de 55°C a 30 segundos. A quantificação foi realizada com sondas de hidrólise TaqMan com kit personalizável fornecido pela Thermo Fisher. As concentrações de DNA e RNA foram calculadas por regressão linear, por meio de

curva de calibração de DNA (genomic standard, Thermo Fisher) e RNA (HL-60, Thermo Fisher) com concentrações de 50 – 0,01 ng/ul.

O sequenciamento direcionado das amostras foi realizado por meio do Ion Torrent™ Genexus™ Integrated Sequencer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com o painel (OPA Oncomine™ Precision Assay GX, (Thermo Fisher Scientific). O Ion Torrent™ Genexus™ é um sistema totalmente automatizado de NGS que integra as etapas de preparação da biblioteca, amplificação do template, sequenciamento e análise de dados. Variantes somáticas e transcritos de fusão foram identificados pelo software Ion Reporter, por meio de arquivos BED específicos e filtros apropriados. As variantes identificadas foram verificadas no Integrative Genomic Viewer (IGV), versão 2.3 ou superior, para detectar leituras curtas com possíveis eventos de erro de pareamento de primers. Para o relatório final, as sequências foram alinhadas com o genoma de referência hg19, por meio do software Oncomine™ Knowledgebase Reporter (Thermo Fisher Scientific). O limiar de frequência de mutação foi definido em 5%, com profundidade de cobertura mediana superior a 500X.

5.3.3 Caracterização de tecido baseada em inteligência artificial

As imagens de HE foram adquiridas e carregadas na plataforma de IA AISight Clinical Trials (v3.3.1), um sistema de gerenciamento de WSI baseado em nuvem.

A análise das imagens foi realizada por um sistema de inteligência artificial (IA) integrado à plataforma, responsável pela caracterização da composição tecidual das amostras. Para cada imagem de WSI, a IA quantificou a porcentagem de tecido total, tecido tumoral, necrose e estroma. Esses dados foram gerados automaticamente e disponibilizados para revisão de um patologista. O patologista avaliou os resultados da IA e classificou a análise como aprovada ou rejeitada. Nos casos de rejeição, o sistema realizou uma reanálise automatizada da imagem. Esse processo iterativo garantiu que a caracterização tecidual fosse validada antes da inclusão dos dados na análise final do estudo.

A IA utilizada neste estudo emprega algoritmos de *deep learning* para segmentação e classificação de tecidos em lâminas digitalizadas. O modelo foi previamente treinado em um extenso conjunto de imagens anotadas por patologistas,

o que permite que a rede neural convolucional (CNN) identificasse padrões morfológicos característicos de diferentes componentes teciduais. Durante a análise, a IA processa cada imagem em alta resolução, aplicando técnicas de pré-processamento, como normalização de cor e ajuste de contraste, para minimizar variações entre as amostras. A segmentação é então realizada por um modelo de aprendizado supervisionado, que classifica as regiões da lâmina como tecido tumoral, necrose, estroma ou fundo não tecidual. A IA gera mapas de calor e relatórios quantitativos com as proporções de cada componente, que são disponibilizados para revisão do patologista. Se a análise for rejeitada, a IA pode ajustar seus parâmetros ou utilizar modelos alternativos para refinar a segmentação, o que garante maior confiabilidade na caracterização tecidual.

5.4 Análises estatísticas

Para a análise da concordância diagnóstica entre a leitura digital e a leitura física das lâminas citológicas, foi utilizado o coeficiente Kappa de Cohen. Essa métrica quantifica o grau de concordância além do que seria esperado por acaso e é interpretada conforme os critérios de Landis e Koch: valores de Kappa <0 indicam ausência de concordância; entre 0,01–0,20, concordância leve; 0,21–0,40, razoável; 0,41–0,60, moderada; 0,61–0,80, substancial; e 0,81–1,00, quase perfeita. Adicionalmente, foi construída uma curva ROC (Receiver Operating Characteristic) para avaliar o desempenho da leitura digital em relação ao padrão-ouro (leitura física). O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizada para examinar as relações entre a composição celular e o material genético. O teste de Mann-Whitney U foi utilizado para avaliar a significância estatística das diferenças entre grupos. Além disso, curvas de regressão linear foram geradas para modelar a relação entre os dados de caracterização celular e os dados genômicos. Foram calculadas estatísticas descritivas, bem como médias, desvios-padrão e intervalos de medida, e a significância estatística foi determinada por meio de testes paramétricos e não paramétricos apropriados, por meio do software GraphPad Prism e códigos em Python executados em ambiente Jupyter Notebook. As análises estatísticas também foram realizadas por meio dos softwares SPSS Statistics® (versão 25, IBM) e GraphPad Prism® (versão 10) e considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$.

5.5 Apoio na Redação Científica

Partes deste trabalho foram redigidas com o apoio da ferramenta de inteligência artificial ChatGPT (OpenAI), utilizada de forma ética para revisão linguística, organização textual e aprimoramento da clareza científica, sempre com curadoria crítica do autor, além de servir como suporte ao leiaute para os gráficos. Todo o conteúdo técnico, analítico e interpretativo reflete exclusivamente a autoria e responsabilidade do pesquisador.

5.6 Ética

O estudo recebeu aprovação do comitê de ética institucional. Todos os pacientes forneceram termo de consentimento informado para a coleta e análise das amostras.

CAAE: 86254625.1.0000.5049

6. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho se desdobram em três frentes complementares (tabela 1):

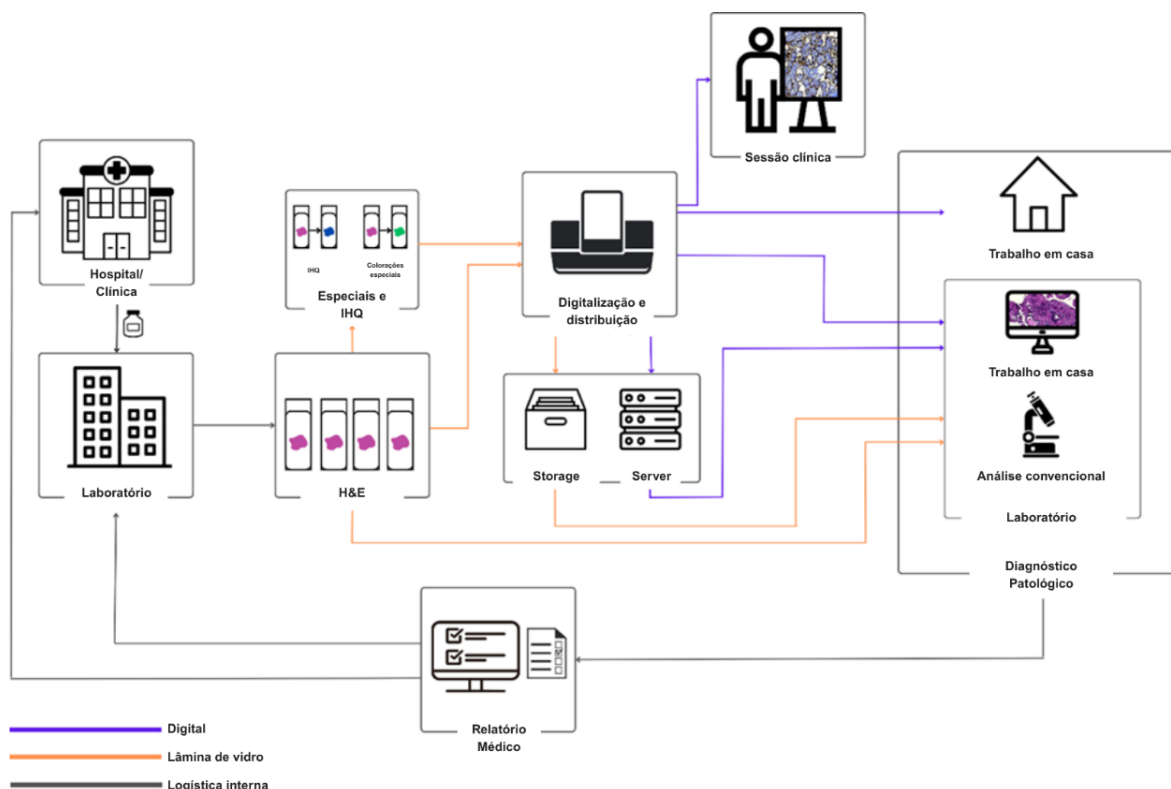
Tabela 1: Síntese de apresentações dos resultados.

Eixo	Descrição	Status
Implementação da Patologia Digital (PD)	Introdução da PD em laboratório do Nordeste, bem como a implementação do scanner, fluxo de trabalho e validação	Manuscrito submetido e em análise editorial
Validação da Patologia Digital em citologia cervicovaginal	Comparação entre leitura digital e física de lâminas de citologia	Artigo publicado em periódico científico (DOI: 10.1002/dc.2520)
Aplicação de IA em Patologia Digital	Integração de IA à análise de lâminas digitais de câncer de pulmão, com correlação a dados de NGS	Em desenvolvimento

6.1 Implementação da Patologia Digital

Para a implementação do scanner no laboratório, foi elaborado um plano estratégico voltado para a viabilidade do projeto, captação de recursos e montagem de uma equipe especializada (figura 3). A instalação do scanner foi seguida por uma avaliação interna das necessidades de integração com TI e pela implementação da integração do Sistema de Informação Laboratorial (LIS) com o sistema de visualização de imagens da Motic (DSS). O processo de integração entre os sistemas levou cerca de 2 meses para ser totalmente concluído. Inicialmente, optamos apenas por lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE), mas em 2022 validamos lâminas coradas com HE e, como discutido em outro estudo, lâminas de citologia cervicovaginal.

Figura 3: Fluxo de implementação de Patologia Digital em um laboratório de patologia.



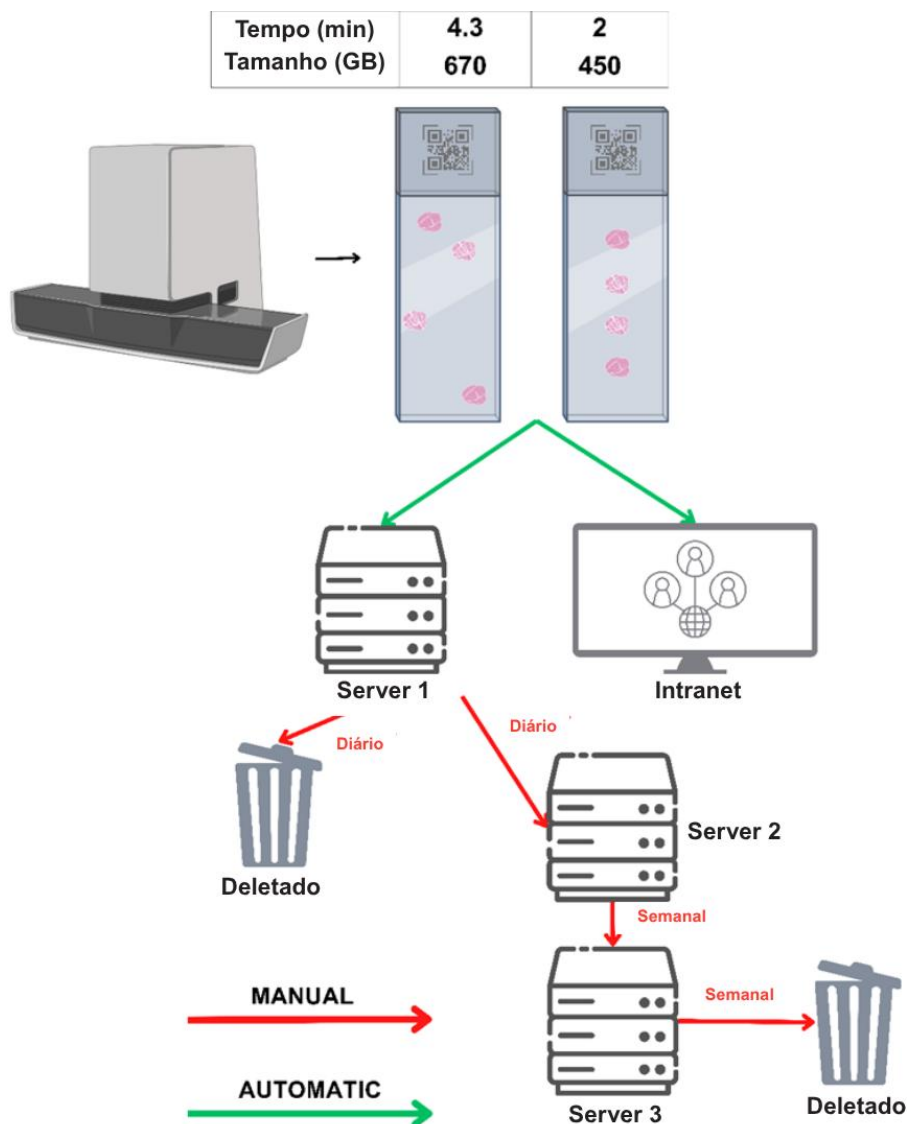
Legenda: O diagrama representa o percurso das amostras desde a coleta hospitalar até a emissão do diagnóstico, incorporando a digitalização de lâminas histológicas. As amostras são processadas no laboratório, onde são confeccionadas lâminas coradas por hematoxilina e eosina (HE), colorações especiais e imuno-histoquímica (IHQ). Essas lâminas podem ser encaminhadas para análise convencional por microscopia óptica ou digitalizadas em sistema de escaneamento. As imagens digitais são armazenadas em servidores e distribuídas para revisão clínica, sessões multidisciplinares e trabalho remoto, o que permite laudos a distância. O sistema integra a análise morfológica, emissão do laudo e retorno do diagnóstico ao serviço clínico. As linhas representam os diferentes fluxos: preto (logística interna), laranja (lâminas de vidro) e roxo (fluxo digital).

A figura 4 demonstra o tempo necessário para digitalização das lâminas, com média de 2 a 4,3 minutos por lâmina, gerando arquivos de 450 a 670 MB. Esse processo, aliado à automação do fluxo de arquivamento e distribuição (como backups automáticos e exclusão programada de dados), reduziu significativamente o TAT (30% no tempo entre a finalização da lâmina e sua disponibilização para análise diagnóstica, quando comparado com a disponibilização da lâmina física) de liberação

de casos, eliminando etapas manuais e possibilitando o acesso quase imediato às lâminas digitalizadas pelos patologistas.

Quando a patologia digital foi inicialmente implementada no laboratório, conseguimos escanear apenas 7% da rotina devido à adaptação dos processos. Com os fluxos operacionais bem estabelecidos, aumentamos gradativamente o número de lâminas escaneadas por mês e, atualmente, conseguimos escanear aproximadamente 60% da rotina do laboratório. A cada mês, escaneamos exames de cerca de 3.000 pacientes e aproximadamente 20.000 lâminas (figura 4). O tempo médio de escaneamento é de 2 minutos por lâmina, e o tamanho médio do arquivo é de 600 megabytes (MB).

Figura 4: Fluxo de gerenciamento de dados e impacto da melhoria da qualidade dos slides.

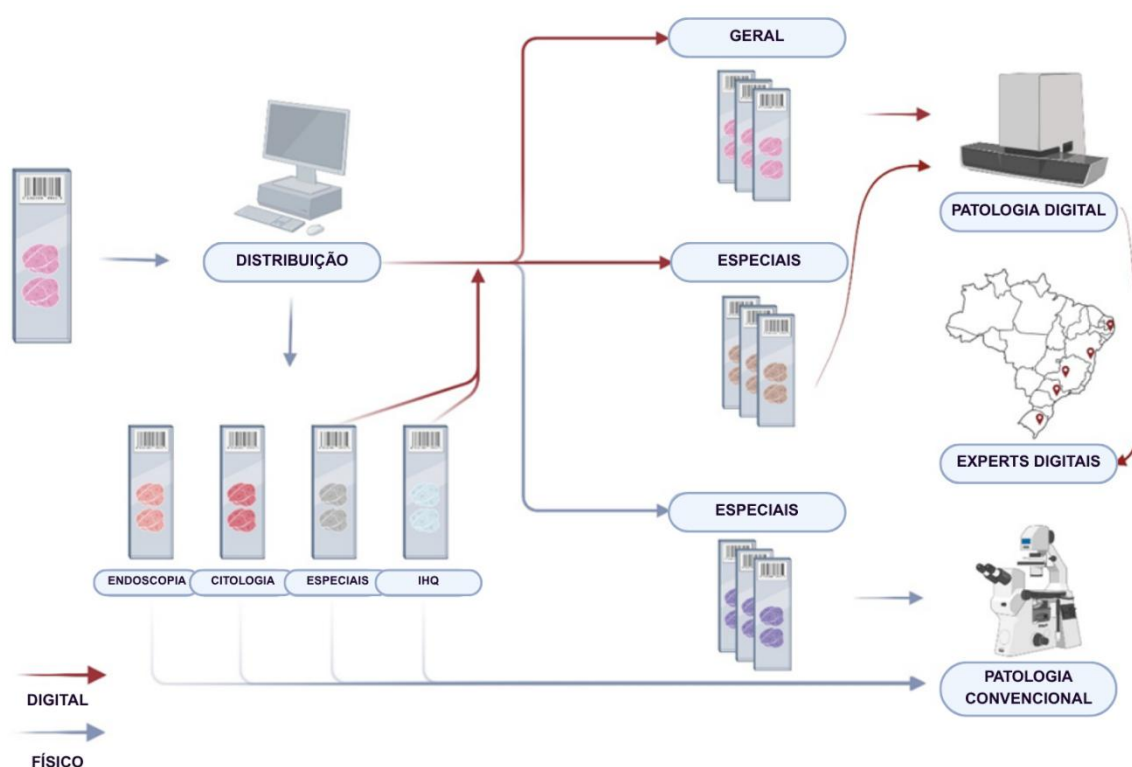


Legenda: As lâminas histológicas são escaneadas em equipamento digital, gerando arquivos de grande volume (médias: 670 GB em 4,3 min e 450 GB em 2 min), que são direcionados simultaneamente ao Servidor 1 e à intranet institucional para visualização e acesso remoto. No Servidor 1 realiza-se a exclusão diária manual dos arquivos, enquanto realiza uma cópia manual para o Servidor 2 (backup intermediário), também com exclusão diária programada. Em seguida, os dados são transferidos automaticamente de forma semanal para o Servidor 3, que mantém os arquivos temporariamente antes de serem excluídos conforme política de retenção. As setas verdes indicam processos automáticos; as vermelhas, fluxos manuais.

A figura 5 ilustra o fluxo de trabalho híbrido do laboratório, integrando patologia digital e convencional. As lâminas com código de barras, provenientes de exames de endoscopia, citologia, colorações especiais e imuno-histoquímica, são encaminhadas ao sistema de distribuição. A partir daí, parte das lâminas segue para análise física por patologistas especializados com microscópio (patologia convencional), enquanto

outra parte é digitalizada e direcionada a patologistas gerais, especialistas ou consultores externos (patologistas digitais), bem como profissionais localizados em diferentes regiões do Brasil. O fluxo digital permite compartilhamento remoto e maior flexibilidade, enquanto o físico é mantido para casos específicos ou quando necessário.

Figura 5: Fluxo de especialidade de exames e compartilhamento de imagens.



Legenda: As lâminas histológicas, após codificação por código de barras, são encaminhadas ao setor de distribuição, que direciona fisicamente os materiais conforme a natureza da amostra (endoscopia, citologia, colorações especiais e imunohistoquímica). As lâminas classificadas como “gerais” ou “especiais” podem ser submetidas à digitalização e, posteriormente, distribuídas por via digital a uma rede nacional de experts em patologia digital, o que promove o diagnóstico remoto e colaborativo. Amostras específicas seguem para a patologia convencional, que utiliza microscopia óptica. O esquema ilustra os fluxos físico (azul) e digital (vermelho) que coexistem de maneira complementar na rotina diagnóstica.

6.2 Validação da Patologia Digital

6.2.1 Validação da leitura digital de lâminas de hematoxilina e eosina (HE)

O estudo envolveu a avaliação da qualidade diagnóstica por meio de 384 WSIs de 64 casos, representando uma distribuição típica de casos encontrados em um grande centro de atendimento. A área média de digitalização foi de 982 mm², com um tempo de digitalização médio de 4 minutos a 40x de resolução, resultando em um tamanho médio de arquivo de 900 MB. Os casos selecionados forneceram uma amostra representativa da rotina laboratorial, bem como diferentes tipos de casos, exceto casos neurológicos e hematológicos, que foram excluídos devido à sua natureza altamente especializada. A inclusão de casos diversos garantiu que a avaliação da qualidade diagnóstica fosse reflexiva da prática clínica real, apoiando a implementação de melhorias no fluxo de trabalho.

Um total de 768 leituras foi realizado, divididas igualmente entre WSI e lâminas físicas de vidro (384 leituras cada), realizadas por dois patologistas. A concordância entre as avaliações foi avaliada com base no diagnóstico final, com 98,72% de concordância (62 de 64 casos). Discrepâncias foram encontradas em apenas dois casos. As discrepâncias específicas estão detalhadas na tabela 2.

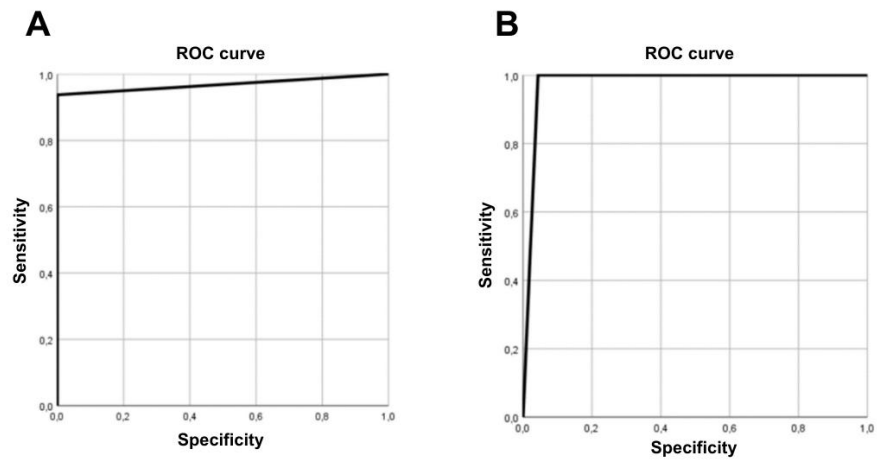
Tabela 2: Caracterização dos casos discordantes na análise por meio de lâminas de vidro e lâminas digitais.

Caso	Tecido	Lâmina de vidro	Lâmina digital	Discordância
Caso 1	Retossigmóide	Diverticulite com tumor	Diverticulite sem tumor	Presença de tumor neuroendócrino
Caso 2	Estômago	Gastrite com presença de <i>Helicobacter pylori</i>	Gastrite sem <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i> positivo

Os valores de concordância Kappa ($A^{\text{Kappa}} = 0,928$ e $B^{\text{Kappa}} = 0,958$) demonstraram uma concordância quase perfeita entre os dois métodos (figura 6).

Esses valores, que medem a consistência além da chance, confirmaram a equivalência diagnóstica entre lâminas digitais e físicas.

Figura 6: Curva ROC que demonstra a sensibilidade e especificidade entre a análise feita por meio de lâmina digital e física.



6.2.2 Validação da leitura digital de lâminas de citologia cervicovaginal

O presente estudo incluiu, ao final, 99 lâminas citológicas (Papanicolau). A mediana de idade das mulheres participantes foi de 32 anos, com uma média de 33,8 anos. Das 100 lâminas, 99 (99/100) foram consideradas satisfatórias pelos avaliadores e uma excluída por falta de qualidade.

6.2.2.1 Desempenho da digitalização das lâminas de citologia

O tempo médio de digitalização por lâmina foi de aproximadamente 2 minutos, com uma média de 2,4 minutos. O tempo médio para diagnóstico por lâmina física e por imagem digital (WSI – Whole Slide Imaging) pelos avaliadores foi registrado (tabela 2). O tempo médio geral de avaliação por caso por meio de WSI foi de 9,53 minutos e o avaliador C aquele com maior tempo médio. Também foi avaliado o nível de confiança de cada avaliador nas imagens digitais.

Tabela 3: Resultados do questionário de confiança diagnóstica e tempo.

	A		B		C	
	Média	Mediana	Média	Mediana	Média	Mediana
Tempo (min)	10.1	9	8.2	9	10.29	10
Confiabilidade	5.51	6	7	7	9.2	9

*Parametrização considerada de 1 a 10 para cada avaliação de imagem.

6.2.2.2 Diferenças diagnósticas em citologia

Nosso estudo validou, por meio da análise digital das lâminas citopatológicas, todos os grupos representados na imagem, o que demonstra a reprodutibilidade diagnóstica da leitura digital frente à avaliação convencional. Foram contempladas as diferentes categorias de caracterização citológica (atrófico, eutrófico e hipotrófico), os principais padrões de atipia celular (NILM, ASC-US, LSIL, ASC-H e HSIL), os epitélios representativos (escamoso, glandular e metaplásico), os graus de preservação celular (bem preservado, mal preservado e em reparo), bem como os achados microbiológicos mais frequentes, entre os quais *Bacilos*, *Candida*, *Cocos*, *Gardnerella mobiluncus* e *Lactobacillus*.

Os grupos de preservação celular e diagnóstico microbiológico apresentaram os maiores índices de discordância entre os diagnósticos por WSI e o padrão-ouro. Para os avaliadores A e B, a avaliação do grupo de microrganismos foi estatisticamente diferente para a maior parte dos microrganismos (tabela 4). Para o avaliador C, em contraste, apenas o diagnóstico de *Lactobacillus* foi significativamente diferente ($p = 0,001$) entre lâminas físicas e digitais. As variáveis do grupo diagnóstico de atipias celulares apresentaram a melhor concordância diagnóstica (tabela 4), e apenas para ASC-US observou-se diferença diagnóstica entre os citotécnicos ($p < 0,05$).

Tabela 4: Taxa geral de precisão diagnóstica de leituras de lâminas cervicovaginais físicas e digitais dos três avaliadores.

		Referência (R.S.)	A (WSI)			B (WSI)			C (WSI)		
CATEGORIA		N (%)	N (%)	P (A vs. R.S.)	I.C.	N (%)	P (B vs. R.S.)	I.C.	N (%)	P (C vs. R.S.)	I.C.
EPITÉLIOS REPRESENTATIVOS	Escamoso	99 (100)	97 (98)	0,155	-	95 (96)	0,043	-	98 (99)	0,316	-
	Glandular	56 (56.5)	44 (44.4)	0,088	1,6 (0,8 - 2,9)	82 (82.8)	0	0,2 (0,1 - 0,5)	63 (63.6)	0,309	0,7 (0,4 - 1,3)
	Metaplásico	18 (18.2)	61 (61.6)	0	0,1 (0,06 - 0,2)	28 (28.3)	0,092	0,5 (0,2 - 1,1)	86 (86.9)	0	0,03 (0,01 - 0,07)
PRESERVAÇÃO CELULAR	Bem preservado	49 (49.5)	41 (41.4)	0,253	1,3 (0,7 - 2,5)	57 (57.6)	0,254	0,7 (0,3 - 1,3)	50 (50.5)	0,886	0,9 (0,5 - 1,7)
	Mal preservado	54 (54.5)	19 (19.2)	0	5 (2,5 - 10,1)	82 (82.8)	0	0,2 (0,1 - 0,4)	14 (14.1)		
	Reparo	1 (1)	42 (42.4)	0	0,01 (0 - 0,08)	2 (2)	0,560	0,49 (0 - 9,6)	2 (2)	0,560	0,49 (0 - 9,6)
MICROBIOLOGIA	Bacilos	67 (67.7)	3 (3)	0	67 (19,5 - 350)	81 (81.8)	0,022	0,4 (0,2 - 0,9)	60 (60.6)	0,299	1,3 (0,7 - 2,5)
	Candida	53 (67.7)	39 (39.4)	0,046	1,7 (0,9 - 3,2)	46 (46.5)	0,319	1,3 (0,7 - 2,4)	50 (50.5)	0,339	1,1 (0,6 - 2)
	Cocos	65 (65.6)	10 (10.1)	0	17 (7,4 - 40,8)	79 (79.8)	0,025	0,4 (0,2 - 0,9)	60 (60.6)	0,461	1,2 (0,6 - 2,3)
	Gardnerella mobiluncus	18 (18.2)	77 (77.7)	0	0,06 (0,02 - 0,1)	26 (26.3)	0,171	0,6 (0,2 - 1,2)	22 (22.2)	0,478	0,7 (0,3 - 1,6)
	Lactobacillus	37 (37.4)	1 (1)	0	58,4 (9,2 - 2395)	3 (3)	0	19 (5,6 - 100)	17 (17.2)	0,001	2,8 (1,4 - 5,9)
ATÍPIA CELULAR	NILM	50 (50.5)	48 (48.5)	0,661	0,8 (0,4 - 1,6)	40 (40.4)	0,149	1,5 (0,8 - 2,7)	55 (55.5)	0,319	1,3 (0,7 - 2,4)
	ASC-US	0 (0)	1 (1)	0,303	-	17 (17.2)	0,000	-	14 (14.1)	0,000	-
	LSIL	37 (37.4)	34 (34.3)	0,906	0,9 (0,5 - 1,8)	27 (27.3)	0,141	0,6 (0,3 - 1,2)	26 (26.3)	0,093	0,5 (0,3 - 1,1)
	ASC-H	6 (6.1)	3 (3)	0,353	0,5 (0,08 - 2,5)	1 (1)	0,056	0,1 (0,003 - 1,3)	1 (1)	0,054	0,1 (0,003 - 1,3)
	HSIL	6 (6.1)	5 (5)	0,838	0,8 (0,2 - 3,6)	1 (1)	0,976	0,9 (0,01 - 7,6)	0 (0)	0,303	-
CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	Atrófico	0 (0)	1 (1)	0,316	-	1 (1)	0,316	-	0 (0)	-	-
	Eutrófico	40 (40.4)	87 (87.9)	0	0,09 (0,04 - 0,2)	11 (11.1)	0	5,4 (2,4 - 12,5)	53 (53.5)	0,064	0,5 (0,3 - 1)
	Hipotrófico	0 (0)	2 (2)	0,155	-	1 (1)	0,316	-	3 (3)	0,082	-

* $p < 0,05$

Referência - laudo por meio de lâmina física; NILM - Negativo para Lesão Intraepitelial e Malignidade; ASC-US - Atipias de Significado Indeterminado em Células Escamosas; LSIL - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; ASC-H - Atipia de Células Escamosas, lesão de alto grau não pode ser descartada; HSIL - Lesão Intraepitelial de Alto Grau

6.2.2.3 Valores de concordância em citologia

Foi realizada uma análise intraobservador, na qual as interpretações diagnósticas de três avaliadores foram comparadas entre os formatos digital e convencional (microscopia óptica), o que permite avaliar a reprodutibilidade individual das leituras em ambos os métodos.

O grupo de microbiologia apresentou os menores valores de concordância. *Candida spp.* e *Gardnerella/Mobiluncus* mostraram taxas moderadas de concordância entre os avaliadores, enquanto não houve concordância para *Bacillus*, *Coccus* e *Lactobacillus sp.* (Tabela 5).

A presença de epitélio representativo, o grau de atipia celular, inflamação e benignidade apresentaram bons valores de concordância entre avaliadores (tabela 5). Em relação à ausência de atipia ou malignidade, os avaliadores A e C apresentaram concordância quase perfeita ($\rho = 0,86$ e $\rho = 0,84$, respectivamente), enquanto o avaliador B mostrou concordância moderada ($\rho = 0,60$). Resultado semelhante foi observado para as lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL). Para células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), a concordância variou entre 82,5% e 99%. Dois casos específicos foram diagnosticados como ASC-H pelos três avaliadores por meio de lâmina digital; entretanto, pela lâmina física, o diagnóstico havia sido LSIL. Para verificar se a resolução da imagem poderia afetar o diagnóstico, foi realizada uma nova digitalização desse caso com ampliação de 40x e redistribuída para análise; o caso foi então diagnosticado como LSIL na lâmina digital por todos os três, destacando a importância da digitalização em alta magnificação para análises precisas.

Na categoria de processo inflamatório (tabela 5), o teste de Spearman (ρ) mostrou resultados semelhantes para os avaliadores A, B e C ($\rho = 0,474$, $\rho = 0,413$ e $\rho = 0,477$, respectivamente), o que evidencia uma força moderada de associação entre as análises digitais e o padrão-ouro.

Tabela 5: Concordância intraobservador (Kappa e Spearman) conforme subtipos de espécime: microscopia óptica vs. imagem de lâmina inteira.

		A (WSI)					B (WSI)					C (WSI)				
CATEGORIA		Conco rdânci a N (%)	Kap pa	p (Kappa)	Spear man	p (Spearman)	Conco rdânci a N (%)	Kappa	p (Kappa)	Spear man	p (Spearman)	Conco rdânci a N (%)	Kappa	p (Kappa)	Spearman	p (Spearman)
EPITÉLIOS REPRESENTATIVOS	Escamoso	98	-	0	-	-	97.9	-	-	-	-	100	-	-	-	-
	Glandular	69.4	0.39 7	0	0.409	0	59.8	0.114	0.156	0.144	0.159	68.6	0.358	0	0.354	0
	Metaplásico	48	0.09 9	0.132	0.152	0.135	74.2	0.294	0.030	0.305	0.002	29.3	0.038	0.293	0.106	0.298
TIPOS CELULARES	Escamoso	60.7	- 0.27 1	-0.27	0.0043	0.682	44.8	-0.001	0.989	0.128	0.212	22.5	0.001	0.955	0.059	0.564
	Parabasais	66	0.30 2	0.302	0.302	0.028	91.7	-	-	-	-	40.9	-0.003	0.979	-0.002	0.988
	Superficiais		-		-0.055	0.602	58.4	0.021	0.689	0.059	0.568	52	-0.056	0.134	-0.12	0.238
	Escamoso imaturo	37.2	0.09 8	0.137	0.227	0.143	70.5	0.211	0.065	0.258	0.067	17.6	0.015	0.506	0.088	0.514
PRESERVAÇÃO CELULAR	Bem preservado	69.8	0.05 4	0.716	0.055	0.724	45.1	0.095	0.210	0.175	0.218	57.9	-0.091	0.411	-0.102	0.45
	Mal preservado	34.9	- 0.06 7	0.274	-0.167	0.285	92.2	-	-6666	-	-	17.6	-0.019	0.513	-0.087	0.521
	Reparo	100	-	-	-	-	98.2	-	-	-	-	96.5	-0.018	0.893	-0.018	0.895
MICROBIOLOGIA	Bacilos	73.5	0.02 1	0.744	0.035	0.748	57.3	-0.248	0.013	-0.263	0.013	55	0.183	0.029	0.229	0.029
	Candida	80	0.60 6	0	0.627	0	76.2	0.513	0	0.514	0	86.7	0.729	0	0.732	0
	Cocos	62.3	- 0.07 1	0.498	-0.074	0.504	52.5	-0.222	0.03	-0.232	0.03	54.4	0.18	0.031	0.227	0.031
	Gardnerella mobiluncus	40	0.11 7	0.021	0.25	0.021	44.3	0.113	0.068	0.195	0.069	81.8	0.4	0	0.397	0
	Lactobacillus	58.8	- 0.02 3	0.411	-0.089	0.417	59.1	-0.011	0.817	-0.025	0.819	57.8	0.051	0.58	0.058	0.585

ATIPIAS CELULARES	NILM	93	0.86 9	0	0.862	0	79.4	0.598	0	0.603	0	91.9	0.838	0	0.841	0
	ASC-US	99	-	-	-	-	82.5	-	-	-	-	85.9	-	-	-	-
	LSIL	87	0.72 9	0	0.721	0	85.7	0.679	0	0.698	0	76.8	0.472	0	0.488	0
	ASC-H	91	- 0.04 2	0.657	-0.044	0.661	92.9	-0.188	0.797	-0.026	0.8	94.1	0.273	0	0.398	0
	HSIL	91	0.17 6	0.135	0.135	0.18	95.9	0.322	0	-0.024	0	100	-	-	-	-
CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	Atrófico	99	-	-	-	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-
	Eutrófico	46	0.06 3	0.258	0.113	0.263	57.8	0.022	0.763	0.031	0.766	60.6	0.223	0.022	0.231	0.022
	Hipotrófico	98	-	-	-	-	88.7	1	-	-	-	97	-	-	-	-
INFLAMAÇÃO	Processo inflamatório	52.6	0.29 6	0	0.474	0	55.9	0.224	0.001	0.413	0	30.4	0.167	0.001	0.477	0

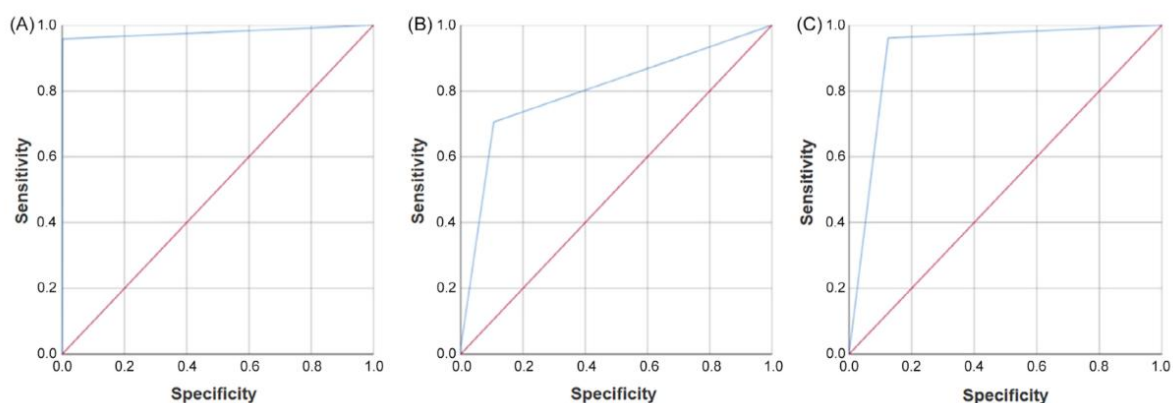
* $p < 0,05$

NILM - Negativo para lesão intraepitelial e malignidade; ASC-US - Atipias de significado indeterminado em células escamosas; LSIL - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; ASC-H - Atipia de células escamosas, lesão de alto grau não pode ser descartada; HSIL - Lesão intraepitelial de alto grau.

6.2.2.4 Sensibilidade diagnóstica por meio de imagens digitais

O desempenho dos avaliadores para diagnosticar NILM apresentou alta reprodutibilidade e sensibilidade nas lâminas digitais, especialmente para os avaliadores A (Sensibilidade 95,8%; Especificidade 98%; $p^{\text{AROC}} < 0,05$) e C (Sensibilidade 96%; Especificidade 87,5%; $p^{\text{CROC}} = < 0,05$), conforme demonstrado pelas curvas ROC (Figura 7). Mesmo com um valor de sensibilidade menor que os demais, o avaliador B apresentou maior especificidade em comparação aos outros (Sensibilidade = 70,6%; Especificidade = 89,4%; $p^{\text{BROC}} < 0,05$). Não foi possível afirmar boa reprodutibilidade em relação às at pias celulares diagnosticadas por lâmina digital, pois o valor de p não foi significativo.

Figura 7: Curvas ROC para desempenho da avaliação digital em relação   física.

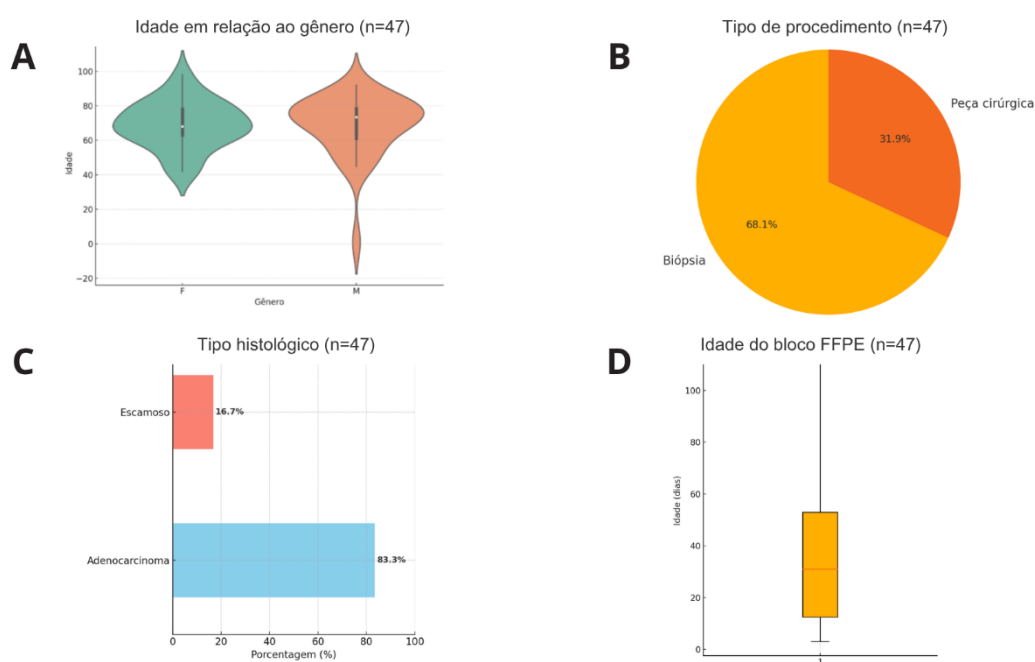


6.3 Aplicação de Inteligência Artificial à Patologia Molecular

6.3.1 Caracterização das amostras

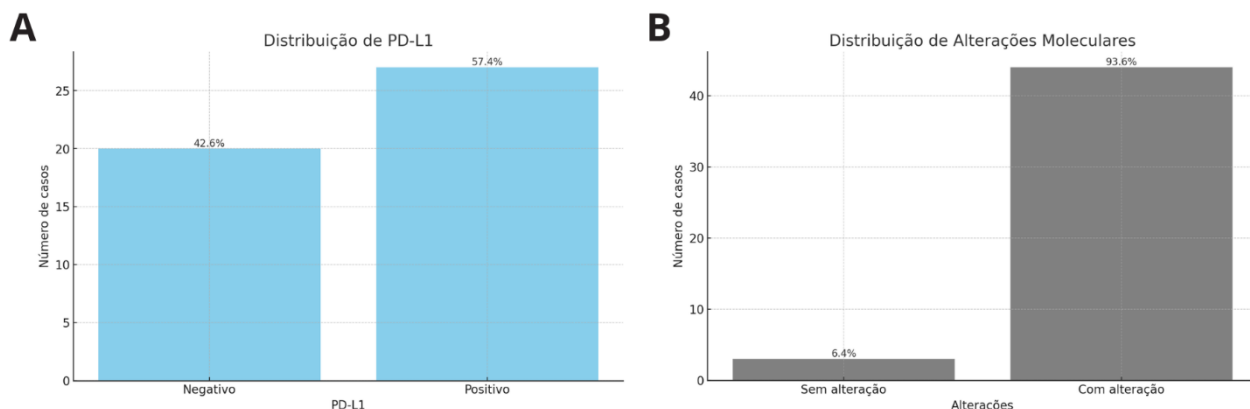
A Figura 8 apresenta a caracterização clínica e laboratorial das 47 amostras incluídas no estudo. A distribuição etária por gênero evidencia uma concentração de casos entre 60 e 80 anos para ambos os sexos, com maior dispersão entre os homens (figura 8-A). Em relação ao tipo de amostra, observa-se predominância de biópsias (68,1%) em comparação a peças cirúrgicas (31,9%) (figura 8-B). Quanto aos tipos histológicos, o adenocarcinoma corresponde à maioria dos casos (83,3%), enquanto o carcinoma de células escamosas representa 16,7% (figura 8-C). A análise da idade dos blocos de parafina revela uma predominância de blocos recentes, embora alguns casos apresentem idade superior a 500 dias (figura 8-D).

Figura 8: Caracterização das amostras: procedimento de coleta, gênero, tipo histológico e distribuições de idade.



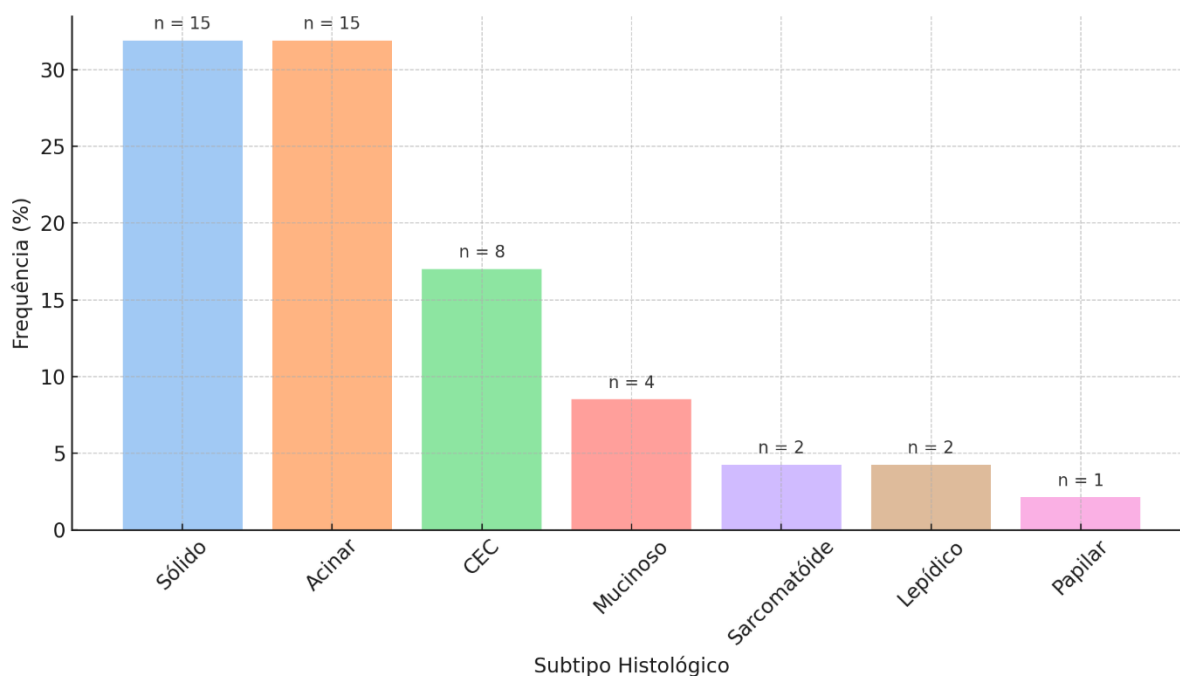
A expressão de PD-L1 foi avaliada, mostrando-se positiva em 27 casos (57,4%) e negativa em 20 casos (42,6%) (figura 9-A) e a pontuação TPS média de 22,09. No que se refere à presença de alterações moleculares, foram identificadas alterações em 44 casos (93,6%), enquanto apenas 3 casos (6,4%) não apresentaram alterações detectáveis (figura 9-B).

Figura 9: Distribuição de PD-L1 e alterações moleculares nos casos.



O grupo amostral analisado é composto por uma variedade de subtipos histológicos de carcinoma pulmonar, com predominância do subtipo sólido, seguido por acinar e carcinoma de células escamosas (CEC). Subtipos menos frequentes incluem mucinoso, lepidico, sarcomatóide e papilar (figura 10).

Figura 10: Distribuição percentual dos subtipos histológicos.



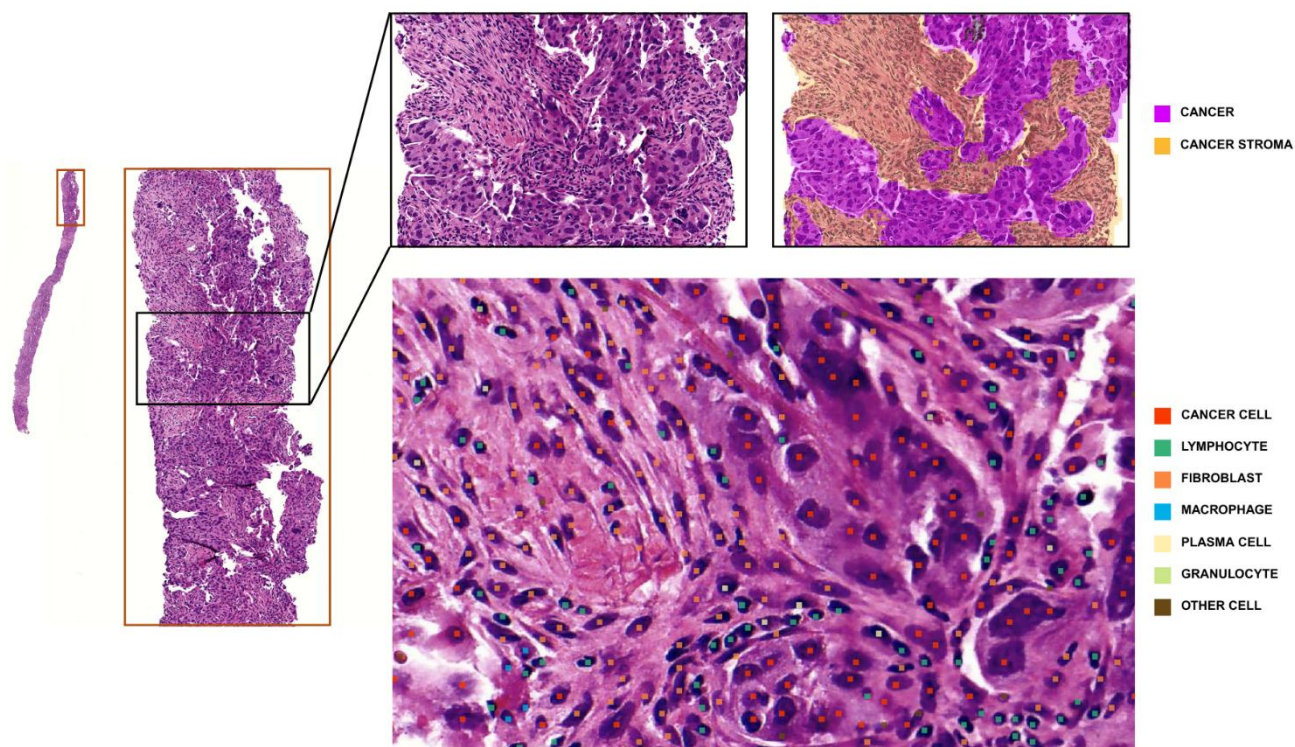
6.3.2 Distribuição dos dados

Os dados de NGS e a quantificação celular por inteligência artificial, referentes a 47 pacientes, foram caracterizados estatisticamente com o objetivo de avaliar sua distribuição e possíveis relações entre as variáveis. A avaliação da normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk indicou que as variáveis analisadas não seguem distribuição normal ($p < 0,05$). A inspeção gráfica por histogramas e Q-Q plots confirmou a assimetria observada nos dados. Diante disso, as análises de correlação foram conduzidas pelo coeficiente de Spearman, apropriado para dados não paramétricos, a fim de identificar associações monotônicas entre a composição celular e os parâmetros genéticos obtidos por NGS.

6.3.3 Caracterização celular e tecidual dos casos

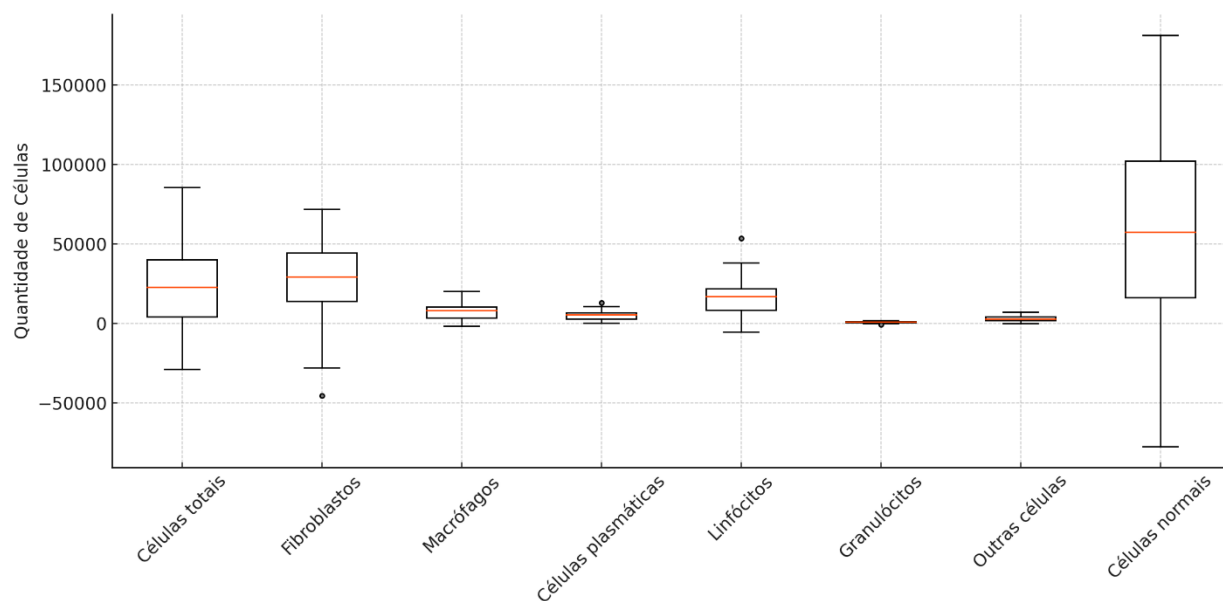
A caracterização celular das amostras analisadas revelou uma grande variabilidade na composição e quantidade de células presentes no tecido tumoral (figura 12). O número total de células no tecido variou significativamente, com valores que oscilaram entre 1.288 e 1.339.078 células, apresentando uma média de aproximadamente 247.000 células por amostra (figura 11).

Figura 11: Detecção celular e diferenciação dos tipos celulares.



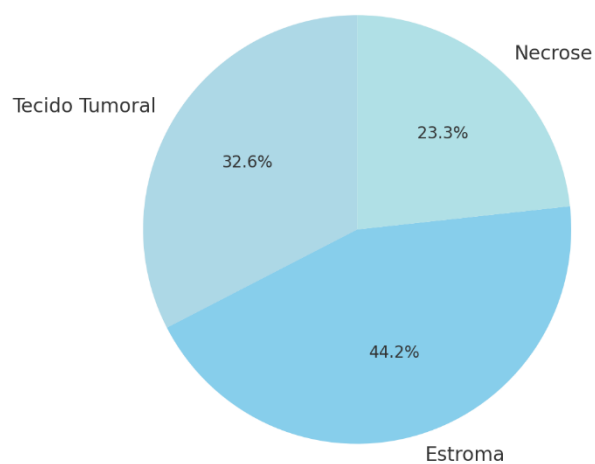
A capacidade da ferramenta PathAI em identificar e caracterizar diferentes tipos celulares permitiu a quantificação automatizada e abrangente das populações celulares presentes nas lâminas histológicas. Por meio dessa abordagem baseada em inteligência artificial, foi possível obter estimativas precisas da concentração de cada tipo celular em todas as amostras analisadas (figura 12). A distribuição dessas populações celulares está apresentada no gráfico abaixo, refletindo a heterogeneidade do microambiente entre os casos incluídos no estudo.

Figura 12: Distribuição da quantificação celular e proporção de tipos celulares na amostra.



A caracterização tecidual das amostras revelou que o tecido tumoral corresponde a 32,6%, o estroma a 44,2% e a necrose a 23,3% do total de área analisada (figura 13). Esses valores refletem a distribuição proporcional das principais componentes teciduais no conjunto amostral, fornecendo uma visão geral objetiva da composição estrutural tumoral.

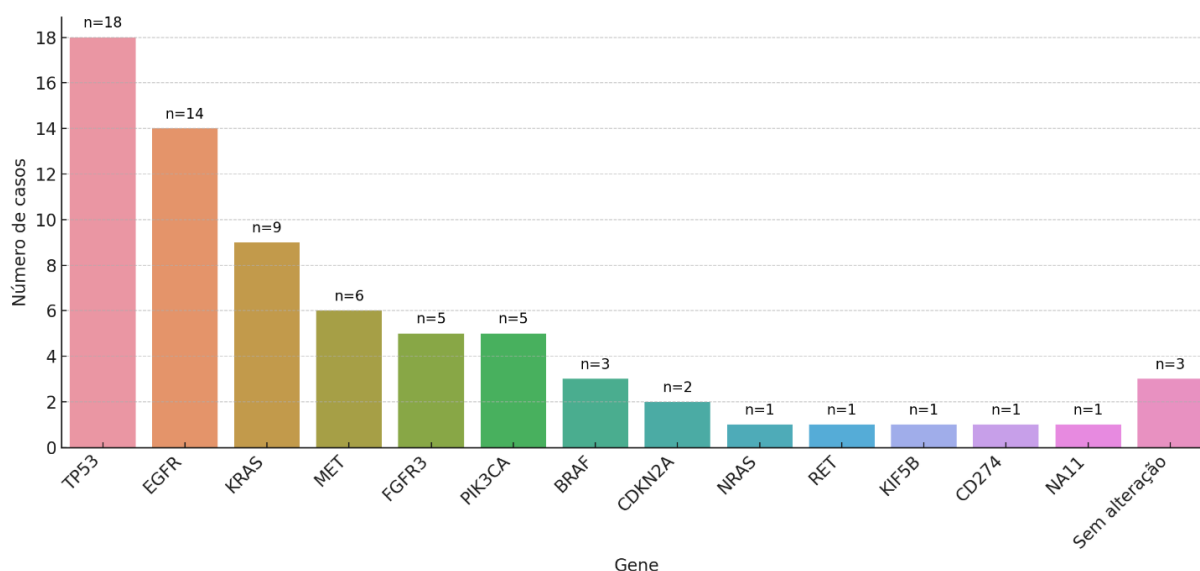
Figura 13: Caracterização percentual dos tipos de tecido na amostra.



6.3.4 Caracterização molecular dos casos

A figura 14 apresenta a frequência das alterações genéticas identificadas em amostras de pacientes com câncer de pulmão submetidos à análise por NGS. As mutações foram categorizadas de acordo com os genes acometidos, bem como casos com múltiplas alterações em um mesmo paciente. Observa-se que TP53 é o gene mais frequentemente alterado na coorte analisada. Em seguida, destacam-se as alterações em EGFR e KRAS.

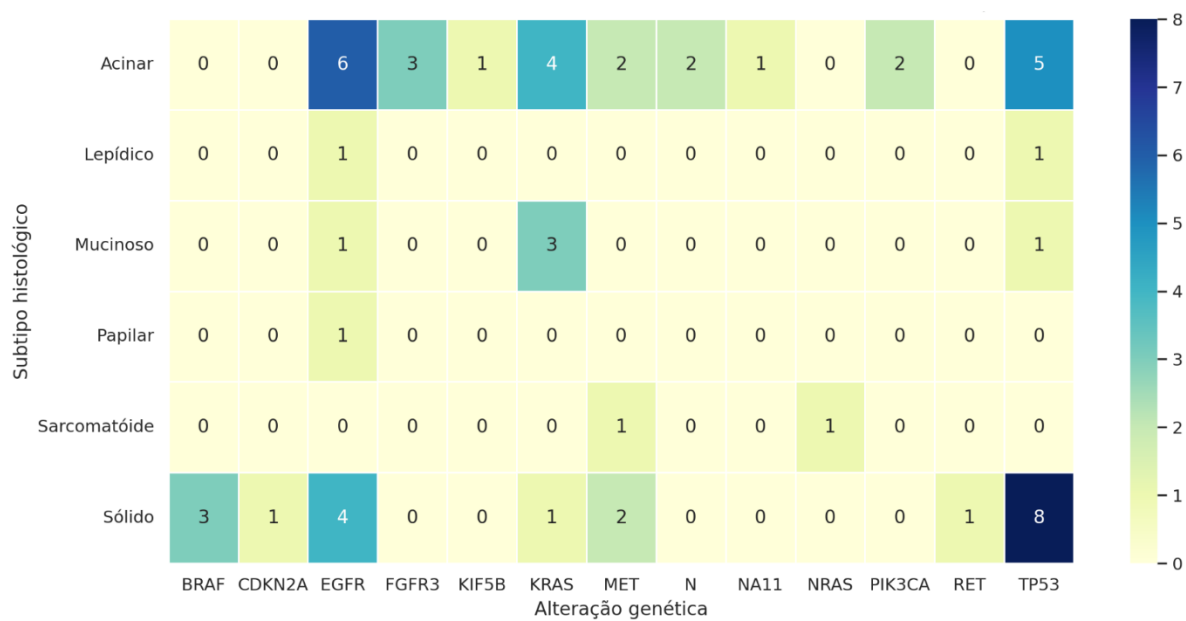
Figura 14: Frequência das principais alterações genéticas identificadas por NGS em amostras de pacientes com câncer de pulmão.



Nos adenocarcinomas, destacaram-se alterações recorrentes em EGFR, TP53, KRAS e FGFR3, com destaque para a alta frequência de EGFR e KRAS, genes classicamente associados a esse subtipo histológico e frequentemente utilizados como marcadores terapêuticos em oncologia de precisão. Em contraste, o grupo CEC apresentou um perfil mais restrito de alterações, com predomínio absoluto de TP53, o que evidencia sua associação com danos genéticos relacionados ao tabagismo e menor diversidade de alvos terapêuticos. A análise das alterações genéticas por subtipo histológico do adenocarcinoma revelou que os subtipos sólido e acinar concentram as alterações mais relevantes do painel (figura 15). No subtipo acinar, observou-se uma elevada frequência de alterações em EGFR (n=6), TP53 (n=5) e KRAS (n=4), o que evidencia a heterogeneidade molecular característica desse

padrão e seu potencial para múltiplas abordagens terapêuticas. Já no subtipo sólido, destacaram-se mutações em TP53 ($n=5$) e EGFR ($n=3$), ambas associadas a comportamento tumoral mais agressivo.

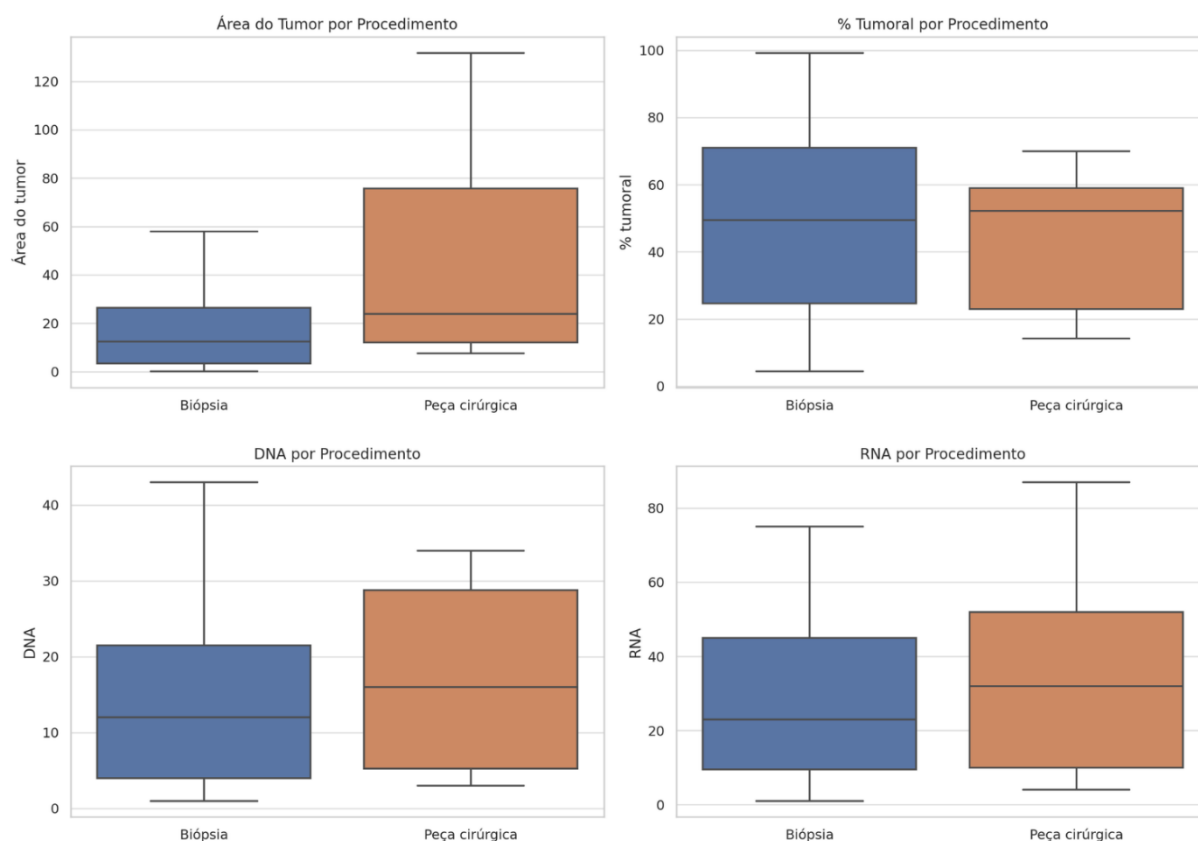
Figura 15: Frequência de alterações genéticas por subtipo histológico.



6.3.5 Análise das quantificações celulares e teciduais em relação às classificações histopatológicas dos casos

As amostras coletadas foram analisadas por dois tipos de procedimento — biópsias e peças cirúrgicas — para investigar se o método de coleta influencia a porcentagem tumoral, o número total de células tumorais e as concentrações de DNA e RNA. A área do tumor é maior nos casos de peças cirúrgicas que em relação às biópsias, mas nenhuma correlação significativa foi encontrada ($p = 0,25$; $p = 0,096$); para as outras variáveis também não foram encontrados valores significativos (figura 16).

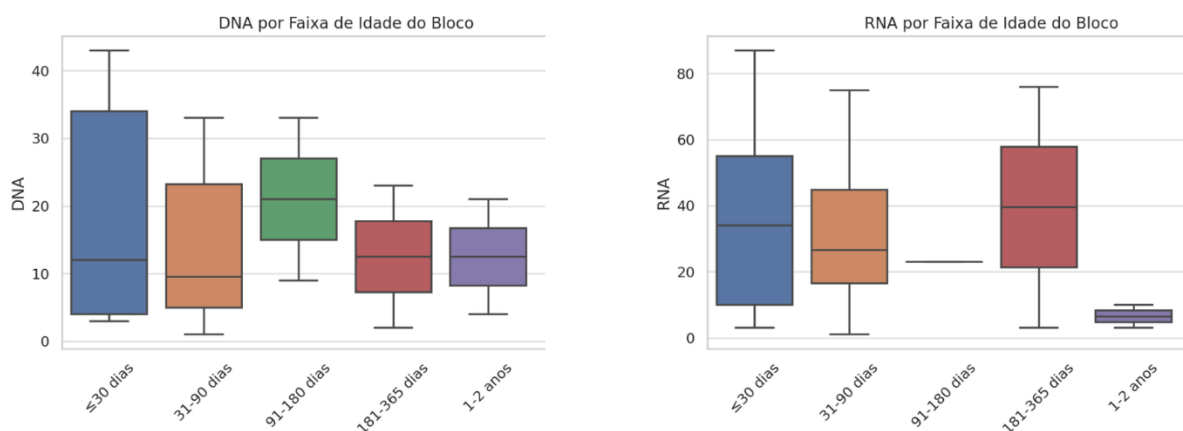
Figura 16: Comparação entre procedimentos de coleta para variáveis histológicas e moleculares.



Legenda: (A) Porcentagem tumoral (porcentagem de tumor pela IA) por tipo de procedimento (biópsia vs. peça cirúrgica); (B) Número total de células tumorais por tipo de procedimento; (C) Concentração de DNA (ng/ μ l) por tipo de procedimento; (D) Concentração de RNA (ng/ μ l) por tipo de procedimento.

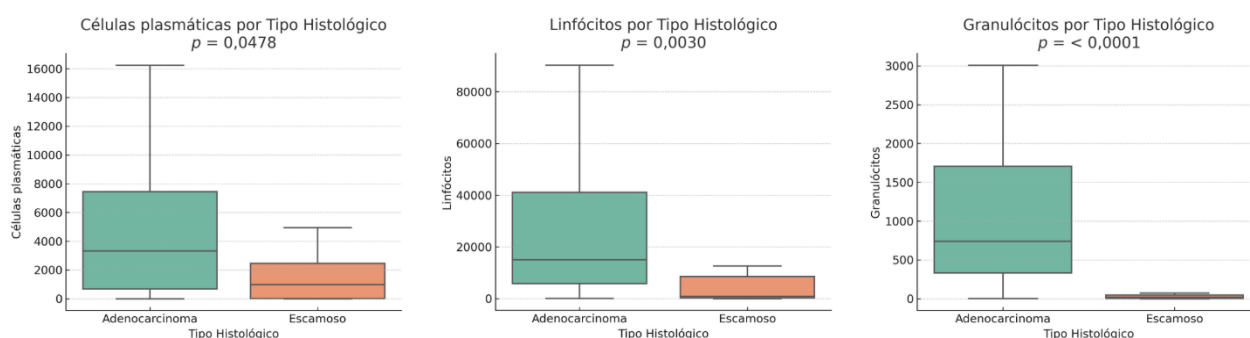
O tempo de armazenamento do bloco foi analisado em relação às concentrações de DNA e RNA totais. A análise revelou uma tendência de redução progressiva tanto para o DNA quanto para o RNA. Conforme ilustrado nos gráficos boxplot (figura 17), a concentração de DNA foi maior nos blocos com até 30 dias de armazenamento, apresentando mediana elevada e ampla variabilidade, enquanto os grupos com maior tempo de armazenamento, especialmente aqueles entre 181 e 365 dias e entre 1 e 2 anos, mostraram valores medianos inferiores e menor dispersão, o que sugere perda de rendimento ao longo do tempo. De forma semelhante, a concentração de RNA demonstrou queda acentuada nas amostras mais antigas e o grupo com 1 a 2 anos de armazenamento o que apresentou os menores valores, com mediana e intervalo interquartil substancialmente reduzidos. Blocos mais recentes, especialmente aqueles com até 30 dias, exibiram concentrações mais elevadas de RNA, com ampla distribuição dos valores.

Figura 17: Comparação entre o tempo de armazenamento dos blocos de parafina (FFPE) as concentrações de DNA e RNA.



A análise comparativa entre adenocarcinoma e CEC evidenciou diferenças significativas na composição celular. O número de linfócitos foi significativamente maior no grupo de adenocarcinoma ($U = 257$; $p = 0,0030$), assim como o número de células plasmáticas ($p = 0,0478$). De igual modo, os granulócitos apresentaram contagens significativamente menores no grupo CEC em relação ao adenocarcinoma ($p < 0,0001$). Essas diferenças foram confirmadas por meio do teste de Mann-Whitney U e ilustradas em gráficos de boxplot (figura 18).

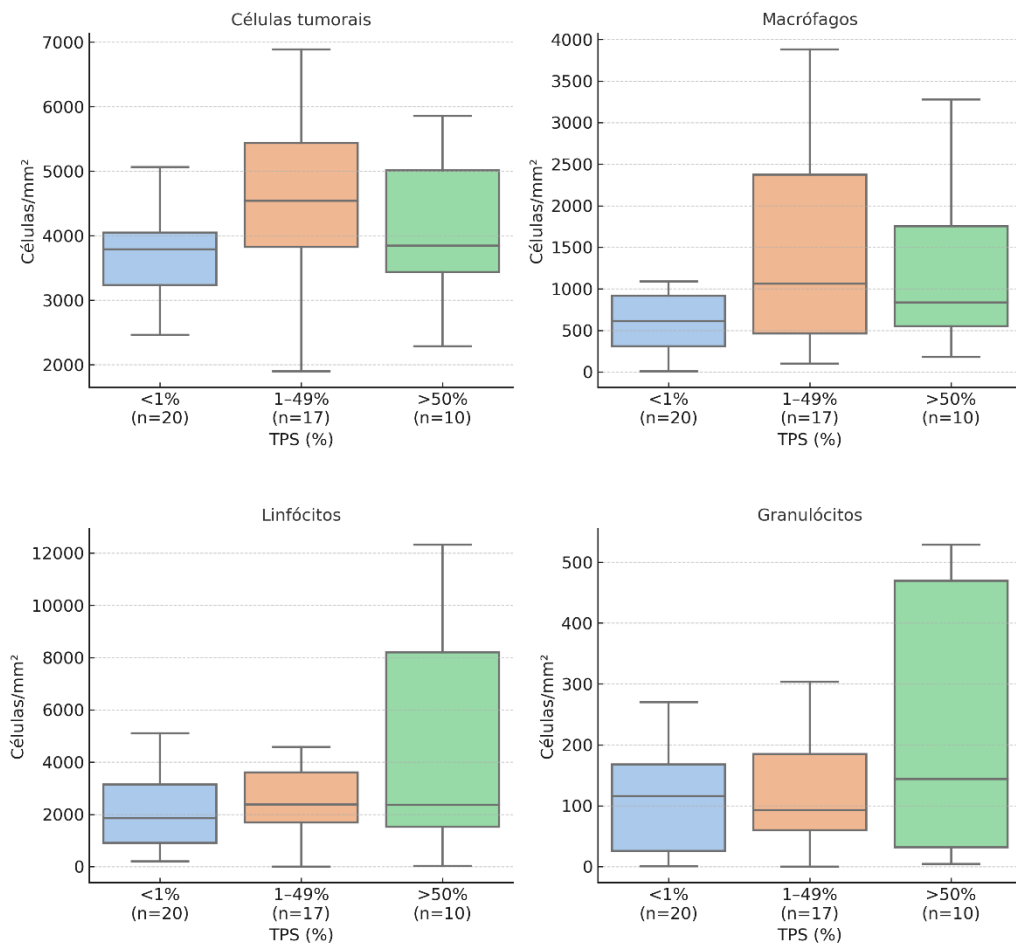
Figura 18: Comparação celular entre subtipos histológicos pulmonares.



Com base na análise da quantificação de células do tecido tumoral estratificada por porcentagem de TPS, observou-se um padrão distinto de distribuição celular entre os três grupos. Para células tumorais, houve uma tendência de aumento na densidade celular conforme o incremento do TPS, com medianas aproximadas de

3.700, 4.500 e 3.800 células/mm² para os grupos <1%, 1-49% e ≥50%, respectivamente. Em relação aos macrófagos, o grupo com TPS 1-49% apresentou maior densidade (mediana ~1.000 células/mm²) comparado aos grupos <1% (~700 células/mm²) e ≥50% (~900 células/mm²). Para linfócitos, observou-se um aumento progressivo significativo com o incremento do TPS e mais pronunciado no grupo ≥50% (mediana ~2.500 células/mm²) que em relação aos grupos <1% e 1-49% (medianas ~2.000 e ~2.500 células/mm², respectivamente). Os granulócitos demonstraram o padrão mais marcante, com densidade substancialmente maior no grupo ≥50% (mediana ~150 células/mm²) comparado aos grupos com menor expressão de TPS (<1% e 1-49%, ambos com medianas ~100-120 células/mm²), que sugere uma associação entre alta expressão de PD-L1 e infiltração granulocítica no microambiente tumoral (figura 19).

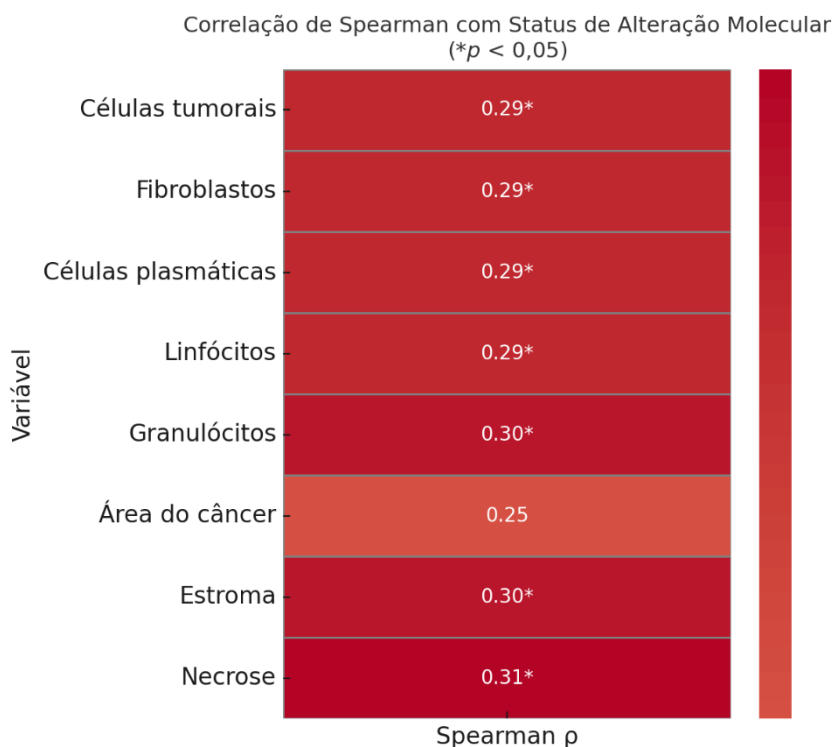
Figura 19: Comparação da quantificação celular entre grupos de PD-L1.



Os dados também foram estratificados de acordo com a presença ou ausência de alterações moleculares detectáveis. A análise foi conduzida com um total de 44 casos com alteração molecular e 3 casos sem alteração, representando um desequilíbrio considerável entre os grupos. Entre as variáveis celulares, observou-se correlação positiva entre a presença de alterações moleculares e o número de células tumorais ($p = 0,0528$), fibroblastos ($p = 0,0501$), células plasmáticas ($p = 0,0501$) e linfócitos ($p = 0,0501$), com destaque para os granulócitos, cuja correlação foi estatisticamente significativa ($p = 0,0442$) (figura 20). Em relação às variáveis teciduais, a área do câncer apresentou tendência de associação com o status molecular ($p = 0,0938$), enquanto o estroma ($p = 0,0387$) e a necrose ($p = 0,0292$) mostraram correlações estatisticamente significativas. Os coeficientes de correlação

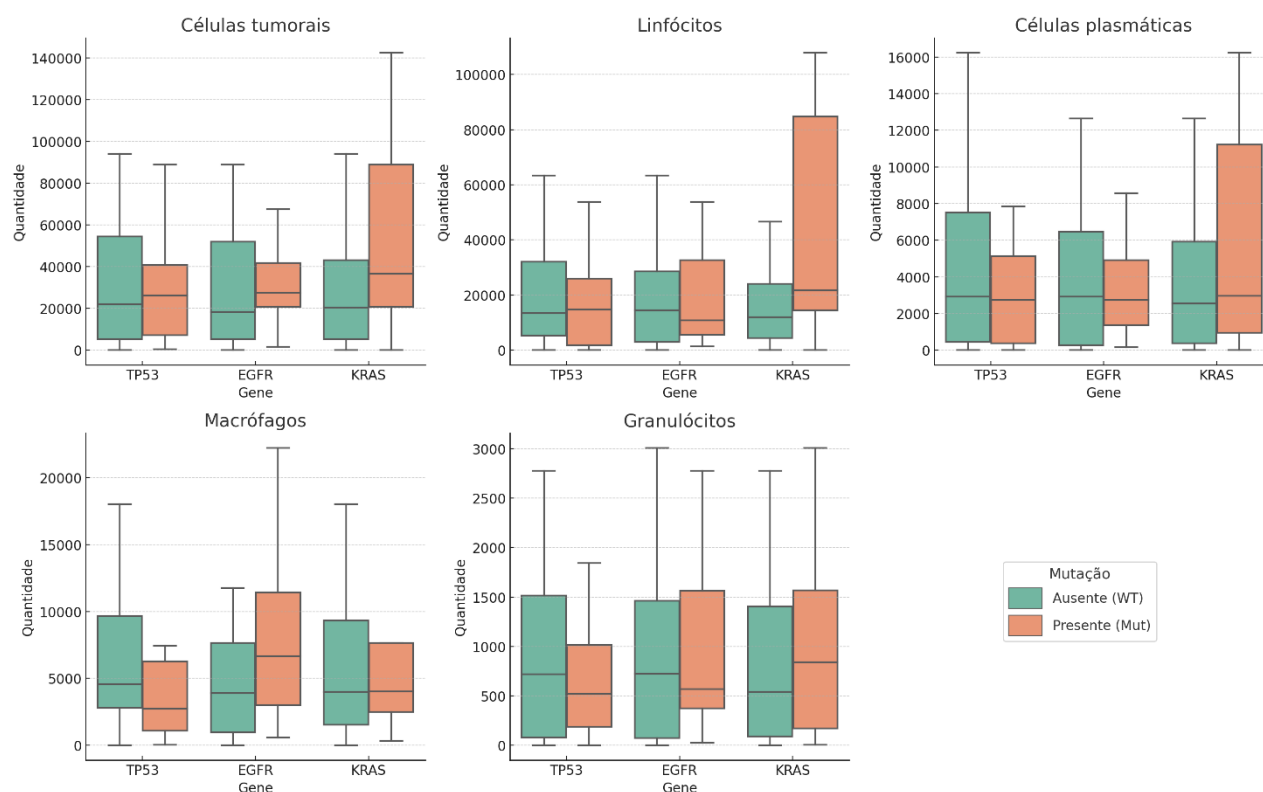
encontram-se representados no heatmap da figura 18, com destaque visual para as associações estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 20: Análise comparativa morfológica entre casos com e sem alterações moleculares.



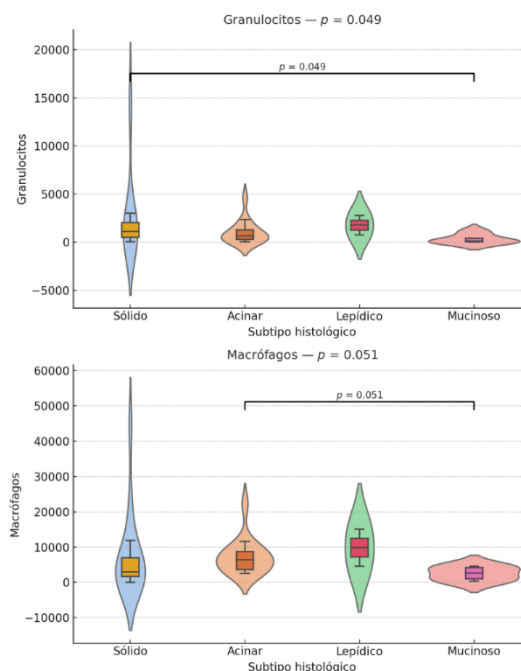
Também foi realizada a análise da composição celular em relação à presença de mutações nos genes TP53, EGFR e KRAS. Foram avaliadas cinco populações celulares: células tumorais, linfócitos, células plasmáticas, macrófagos e granulócitos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos mutado e não mutado para nenhuma das populações celulares analisadas (figura 21). As distribuições se mostraram sobrepostas, sem tendência consistente de aumento ou redução associada à presença de mutações.

Figura 21: Distribuição dos tipos celulares segundo a presença de mutações em TP53, EGFR e KRAS.



Foi realizada uma análise abrangente do microambiente tumoral dos diferentes subtipos histológicos de adenocarcinoma pulmonar (sólido, acinar, lepidico e mucinoso), ao se considerar múltiplas populações celulares inflamatórias. Embora diversas variáveis tenham sido examinadas, apenas os granulócitos e macrófagos apresentaram diferenças estatisticamente significativas ou limítrofes entre os subtipos. A figura 22 ilustra essas duas variáveis: no painel superior, observa-se maior infiltração de granulócitos no subtipo sólido, com diferença significativa em relação ao mucinoso ($p = 0,049$); no painel inferior, destaca-se a maior densidade de macrófagos no subtipo acinar em comparação ao mucinoso, com tendência de significância ($p = 0,051$).

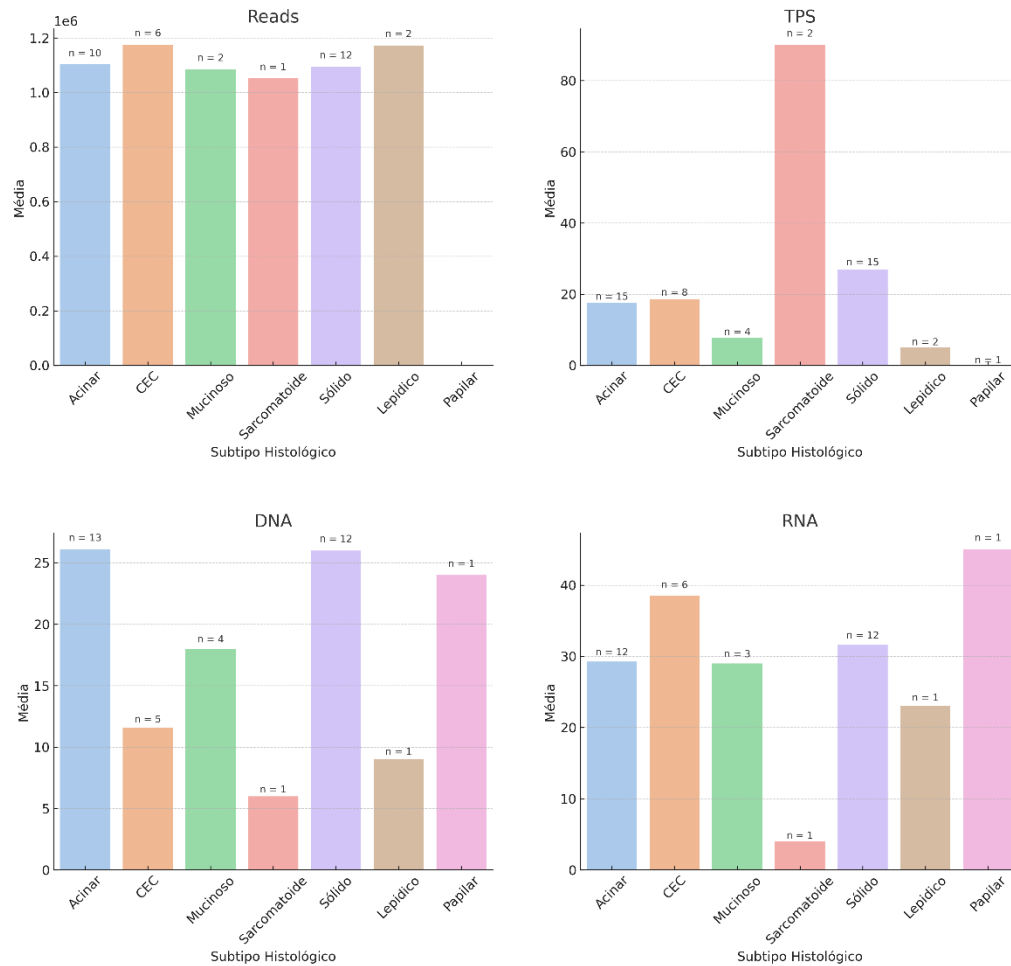
Figura 22: Distribuição dos tipos celulares entre subtipos de adenocarcinoma pulmonar.



Legenda: Análise comparativa das populações de granulócitos (acima) e macrófagos (abaixo) no microambiente tumoral de adenocarcinomas pulmonares, estratificados por subtipo histológico (sólido, acinar, lepidico e mucinoso). Os gráficos em formato *violin plot* demonstram a distribuição e densidade das células imunes por grupo. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os granulócitos entre os subtipos sólido e mucinoso ($p = 0,049$), e uma tendência de significância para os macrófagos entre os subtipos acinar e mucinoso ($p = 0,051$). Esses resultados indicam variações imunológicas relevantes entre os subtipos histológicos de adenocarcinoma.

Os subtipos histológicos de adenocarcinoma pulmonar foram analisados quanto à sua correlação com as variáveis teciduais morfométricas, bem como área tumoral, estroma, necrose e área total de tecido. No entanto, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi observada entre os subtipos e qualquer das variáveis teciduais avaliadas ($p > 0,05$). Em relação aos subtipos, comparou-se os dados genômicos e obtiveram-se as seguintes médias: número de reads manteve-se uniforme em torno de 1×10^6 em todos os grupos, o que evidencia cobertura consistente; o TPS (% PD-L1) atingiu o valor máximo no sarcomatoide ($\approx 90\%$; $n = 2$), situou-se em nível intermediário no sólido ($\approx 25\%$; $n = 5$) e permaneceu abaixo de 20% nos demais subtipos. As concentrações de DNA foram mais altas nos subtipos acinar ($\approx 26 \text{ ng}/\mu\text{L}$; $n = 13$) e sólido ($\approx 26 \text{ ng}/\mu\text{L}$; $n = 12$), enquanto o menor valor foi registrado no sarcomatoide ($\approx 6 \text{ ng}/\mu\text{L}$; $n = 1$). Para RNA, observou-se pico no lepidico ($\approx 45 \text{ ng}/\mu\text{L}$; $n = 1$) e no CEC ($\approx 39 \text{ ng}/\mu\text{L}$; $n = 6$), valores intermediários no sólido ($\approx 32 \text{ ng}/\mu\text{L}$; $n = 12$) e baixa concentração no sarcomatoide ($\approx 4 \text{ ng}/\mu\text{L}$; $n = 1$) (figura 23).

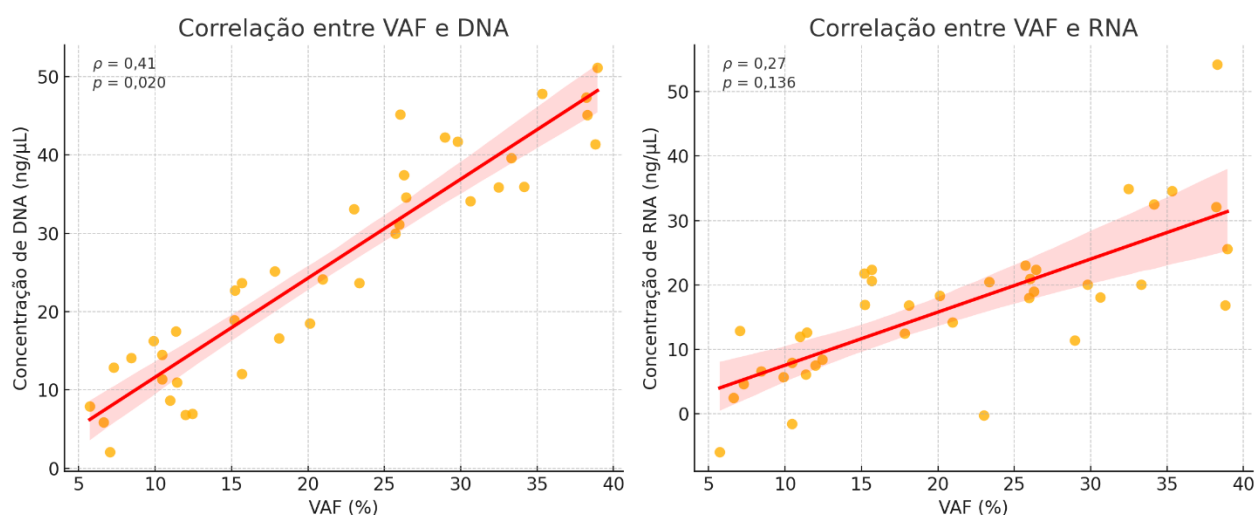
Figura 23: Perfis genômicos médios por subtipo histológico tumoral.



6.3.4 Frequência do Alelo Variante (VAF) em relação ao microambiente tumoral

A análise de correlação entre a frequência de variantes alélicas (VAF) e os parâmetros de qualidade molecular revelou uma associação estatisticamente significativa com a concentração de DNA obtida ($p = 0,41$; $p = 0,020$). Em contrapartida, a correlação entre VAF e concentração de RNA foi positiva, porém não atingiu significância estatística ($p = 0,27$; $p = 0,136$) (figura 24).

Figura 24: Correlação entre a frequência de variantes alélicas (VAF) e concentrações de DNA e RNA.

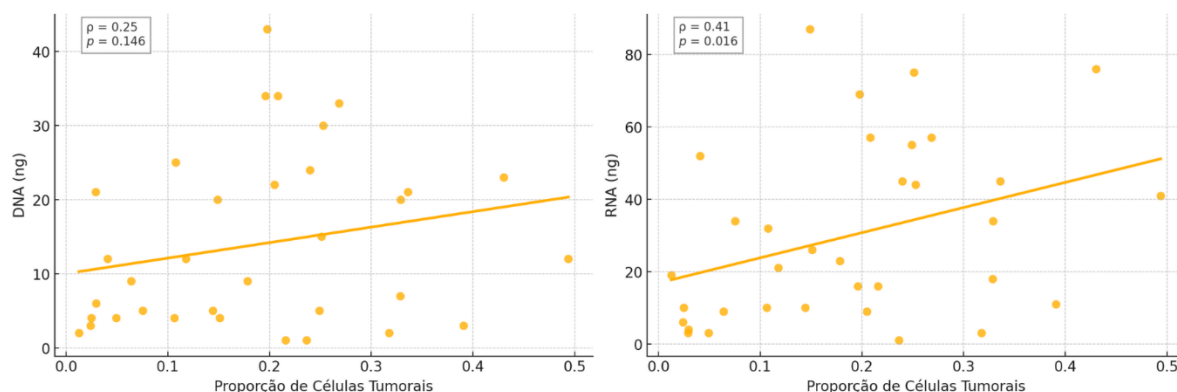


As demais variáveis analisadas — bem como composição celular do microambiente tumoral (como número de linfócitos, fibroblastos, macrófagos e outras populações), áreas específicas do tecido (como área tumoral, estromal e de necrose). Ademais, o número total de reads gerados no sequenciamento — não demonstraram correlação significativa com os valores de VAF ($p > 0,05$ para todas as comparações).

6.3.5 Correlação entre os tipos celulares e concentração de DNA/RNA

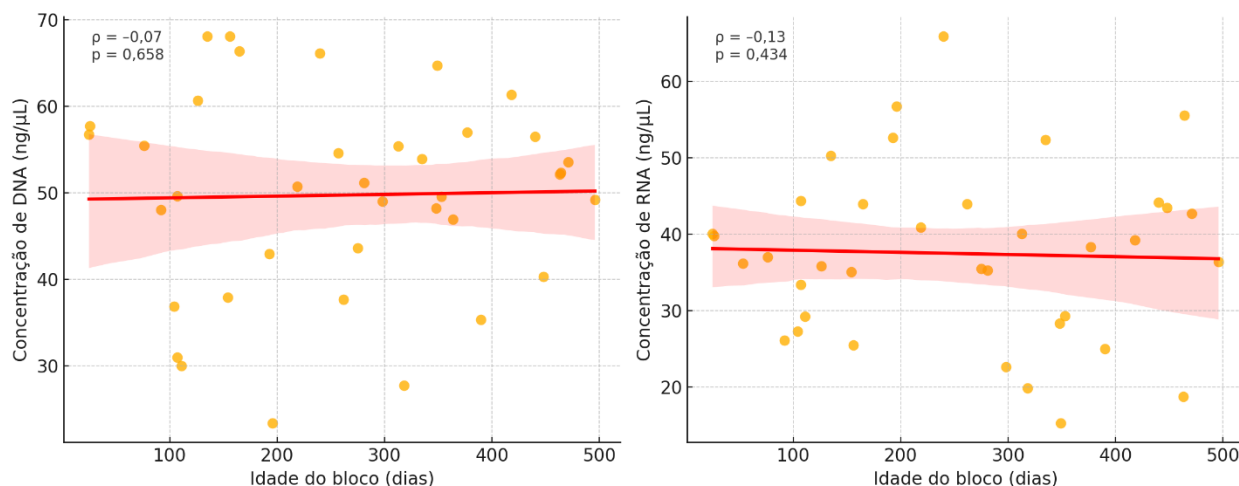
Foram analisadas as correlações entre a proporção de células tumorais no tecido e os rendimentos de DNA e RNA obtidos por extração em amostras histológicas (quantificação por fluorometria). A proporção tumoral foi definida como a razão entre o número de células tumorais e o número total de células na amostra, conforme quantificação pelo PathAI. Foi aplicada a correlação de Spearman para avaliar a associação entre a proporção de células tumorais e os rendimentos dos ácidos nucleicos. Os resultados demonstraram uma correlação positiva moderada entre a proporção tumoral e o DNA ($\rho = 0,39$; $p = 0,025$), bem como uma correlação moderada e estatisticamente significativa com o RNA ($\rho = 0,44$; $p = 0,008$) (figura 25).

Figura 25: Correlação entre proporção de células tumorais e parâmetros de quantificação molecular.



Para avaliar a influência do tempo de armazenamento dos blocos FFPE sobre a quantidade de DNA e RNA extraídos, foi realizada uma análise de correlação de Spearman. Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a idade do bloco e a concentração de DNA ($\rho = -0,07$; $p = 0,658$) ou RNA ($\rho = -0,13$; $p = 0,434$) (figura 26).

Figura 26: Correlação entre a idade dos blocos FFPE e as concentrações de DNA e RNA.



A correlação entre as quantificações de DNA e RNA por fluorimetria e as áreas teciduais foi avaliada por meio do coeficiente de Spearman, conforme apresentado na tabela 7. Observou-se que a área tumoral apresentou correlação positiva e estatisticamente significativa tanto com a concentração de DNA ($\rho = 0,57$; $p = 0,0002$) quanto com RNA ($\rho = 0,40$; $p = 0,0170$), que sugere que a extensão da região

neoplásica influencia diretamente a recuperação de ácidos nucleicos. A área de estroma também se correlacionou de forma significativa com a concentração de DNA ($p = 0,48$; $p = 0,0027$), mas não mostrou associação relevante com os níveis de RNA ($p = 0,3381$). De modo semelhante, a área total do tecido apresentou correlação significativa com o DNA ($p = 0,42$; $p = 0,0090$), enquanto a área de necrose não se correlacionou significativamente com nenhum dos parâmetros moleculares analisados.

Tabela 6: Correlação entre características teciduais e parâmetros moleculares.

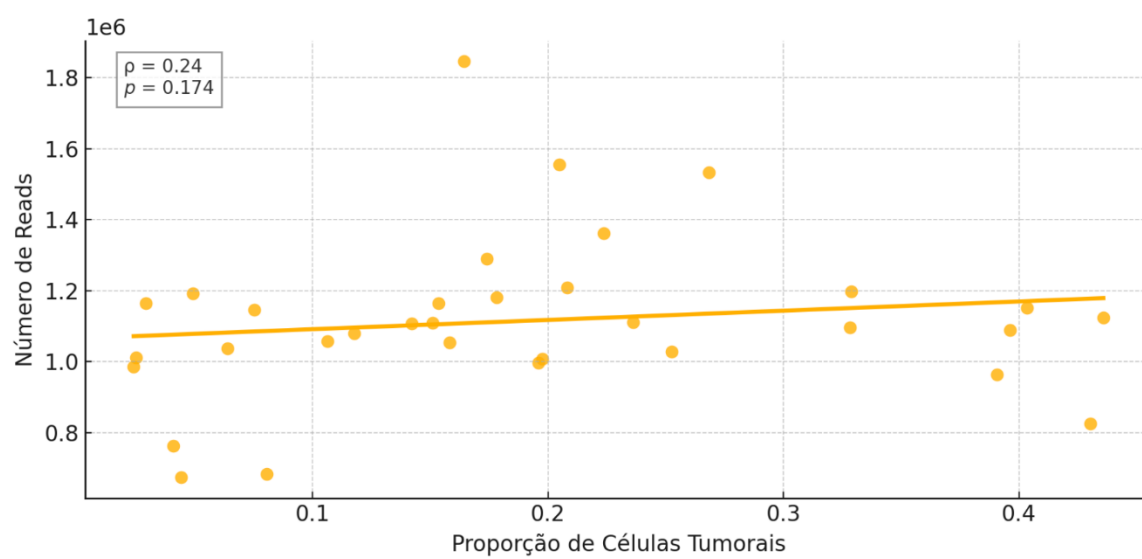
Área Tecidual	ρ (DNA)	p (DNA)	ρ (RNA)	p (RNA)
Área do câncer	0,57	0,0002	0,4	0,017
Área de estroma	0,48	0,0027	0,16	0,3381
Área de necrose	0,25	0,1357	0,24	0,1593
Área do tecido total	0,42	0,009	0,26	0,1319

6.3.6 Correlação entre o número de reads de DNA e proporção de células tumorais.

Avaliou-se a proporção de células tumorais em relação ao número de reads de DNA obtidos no sequenciamento. A análise foi realizada com base na razão entre o número de células tumorais e o número total de células do tecido, conforme quantificação automatizada pela plataforma de IA. Aplicou-se o teste de correlação de Spearman para avaliar a associação entre as variáveis.

A análise baseada na proporção de células tumorais em relação às células totais mostrou um coeficiente de correlação de Spearman $\rho = 0,14$, com $p = 0,174$, indicando ausência de correlação estatisticamente significativa entre a fração tumoral e o número de reads gerados. Esses valores encontram-se destacados na figura 27.

Figura 27: Relação entre o número de reads e a proporção de células tumorais.



7. DISCUSSÃO

7.1 Implementação e Validação da Patologia Digital

O estudo estabelece a Patologia Digital (PD) como um método excelente para otimizar processos laboratoriais e aumentar a agilidade no diagnóstico de pacientes. Inovando em um cenário de baixo custo, o trabalho validou com sucesso as WSIs, com especificidade e sensibilidade notáveis, o que demonstra seu potencial em ambientes com recursos limitados.

A qualidade das WSIs é fundamental para o sucesso do estabelecimento de DP em ambientes laboratoriais. Em nossa rotina, apenas uma pequena porcentagem de WSIs foi considerada inadequada para diagnóstico, por isso, o primeiro passo do processo de implementação foi gerar um protocolo de qualidade para as lâminas histológicas que seriam digitalizadas. Esse importante passo ajudou a reduzir o tempo de digitalização, bem como reduzir no tamanho dos arquivos (.SVS em MB) gerados, o que impacta diretamente no custo da PD.

Outro fator essencial é garantir que todo o material representado na lâmina seja capturado com precisão pelo scanner (Goacher et al., 2017a). Em nossa plataforma de visualização de lâminas (DSS), os patologistas têm acesso a uma imagem macro da lâmina, que exibe a estrutura do tecido antes da digitalização. Isso permite que eles verifiquem se a WSI contém todo o material e solicitem novas digitalizações caso sejam detectados problemas. Os patologistas foram treinados para solicitar novas varreduras por meio do Sistema de Informações Laboratoriais (LIS) em casos de erros de foco, ajustes de saturação de cor ou lâminas com representação incompleta da lâmina. Caso o patologista principal não estivesse disponível, os casos eram automaticamente atribuídos a um patologista secundário. Os principais motivos para a qualidade inadequada das WSIs incluíam lâminas sujas, fragmentos de vidro nas lamínulas, excesso de meio de montagem, cortes de tecido muito distantes entre si e lamínulas mal posicionadas.

A ausência de reembolso por planos de saúde para códigos de patologia digitais no Brasil restringe a capacidade de quantificar os benefícios econômicos da implementação do DP. No entanto, é importante observar que o DP melhora

significativamente a eficiência e a segurança do fluxo de trabalho, o que permite que os patologistas diagnostiquem casos remotamente por meio de sistemas LIS integrados. Esse avanço elimina a necessidade de transportar lâminas de vidro entre hospitais, o que garante seu armazenamento seguro em laboratórios centralizados.

Diversos estudos demonstraram alta concordância entre os diagnósticos realizados com lâminas físicas e digitais, com taxas de concordância superiores a 95% (Lee et al., 2018). Uma meta-análise de Azam et al. (Azam et al., 2021c) destacou que um dos principais desafios da visualização digital é a detecção de pequenos objetos no tecido, como o *Helicobacter pylori* (HP). Os avaliadores do estudo encontraram dificuldades para identificar os microrganismos, ressaltando a importância da qualidade da imagem para um diagnóstico preciso. Além disso, a qualidade das telas de visualização influencia significativamente na detecção de estruturas pequenas como o HP (Azam et al., 2021c; Randell et al., 2015). Na nossa validação das WSIs, a identificação do HP foi um desafio notável. No entanto, estudos demonstraram o uso confiável da inteligência artificial (IA) na detecção de HP em biópsias gástricas (Randell et al., 2015), dispensando a necessidade de imagens com resolução mais alta e o que reduz custos adicionais e demandas de armazenamento — barreiras importantes para a implementação da PD em locais emergentes. Nosso trabalho obteve excelente concordância entre as análises físicas e digitais, em alinhamento com a literatura existente.

Nos últimos anos, um número crescente de departamentos de patologia começou a utilizar rotineiramente a digitalização total de lâminas (whole-slide imaging, WSI) no diagnóstico clínico, com vários estudos desde 2012 até o presente confirmando a confiabilidade na acurácia diagnóstica (Azam et al., 2021c; Randell et al., 2015; Silas et al., 2022b); entretanto, a maioria desses estudos concentra-se em espécimes de patologia cirúrgica, e não em lâminas citológicas (Pantanowitz et al., 2013a). Apenas alguns estudos abordaram questões de validação da patologia digital em preparações citológicas cervicovaginais (Goacher et al., 2017b). Neste trabalho, demonstramos boa reprodutibilidade diagnóstica por meio de lâminas digitalizadas, embora com alguns fatores limitantes.

A discordância diagnóstica observada na identificação de bactérias (*Bacillus*, *Coccus* e *Lactobacillus* sp.) em slides de citologia pode ser explicada pela aparência

digital dos microrganismos nas lâminas. A magnificação mais utilizada nos estudos de validação é 20x, pois resulta em tempos de digitalização mais curtos e menor necessidade de armazenamento (Al-Janabi; Huisman; Van Diest, 2012; Ibrahim et al., 2020). Utilizamos a resolução padrão de 20x neste estudo e, com base em nossos resultados, uma magnificação maior provavelmente seria necessária para avaliar a flora citológica. Al-Janabi et al. sugeriram que *Helicobacter pylori*, *Candida albicans* e *Giardia duodenalis* são frequentemente difíceis de diagnosticar com menos de 20x e que uma ampliação adicional de 40x proporcionaria maior precisão e confiança (Al-Janabi; Huisman; Van Diest, 2012). Para nossos avaliadores, foi difícil distinguir entre *Bacillus* e *Coccus*. Em um estudo interessante de Borowsky et al., os patologistas solicitaram magnificação de 40x para identificar *H. pylori* em biópsias gástricas (Borowsky et al., 2020). Por outro lado, a concordância diagnóstica em relação a *Candida spp.* e *Gardnerella/Mobiluncus* foi melhor, provavelmente devido à fácil identificação desses microrganismos.

O sistema de dois níveis para lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL) corresponde amplamente ao potencial carcinogênico do HPV e ao grau das lesões escamosas (Clifford; Tully; Franceschi, 2017). Em relação à discordância nos casos referidos como HSIL, observou-se que algumas regiões das lâminas apresentavam alta densidade celular e, devido à limitação na focalização no plano Z (acima e abaixo) da imagem digital (Pantanowitz et al., 2013b; Shi et al., 2021), os avaliadores acabaram sugerindo que as células indicavam uma lesão displásica inespecífica, resultando o diagnóstico de ASC-US em 21 casos. Outros estudos já relataram a dificuldade de focalizar diferentes eixos (principalmente o eixo Z) em imagens digitais (Khurana, 2012; Thrall; Pantanowitz; Khalbuss, 2011). O scanner utilizado em nosso estudo já permite a digitalização de imagens em múltiplos planos Z; no entanto, o tempo de digitalização e o tamanho do arquivo aumentam, elevando o tempo em mais de 60%, o que dificulta o uso rotineiro dessa funcionalidade. Entre os padrões citológicos problemáticos, particularmente em casos de SIL (LSIL e HSIL), a presença de elementos da lesão em um fundo atrófico pode levar à interpretação equivocada como ASC-H (Alrajjal et al., 2021). Como mostrado em um dos casos do estudo, o aumento da resolução da imagem pode favorecer uma análise mais sensível, conferindo maior confiança diagnóstica ao avaliador.

A discordância diagnóstica foi significativa na categoria ASC-US. Essa categoria é reservada para casos de células escamosas atípicas nas quais não se pode estabelecer displasia com certeza, como em avaliações de nucléolos, halo perinuclear, sobreposição de núcleos, binucleação, cromocentros e várias outras características (Alrajjal et al., 2021). Dependendo de fatores qualitativos e quantitativos, casos duvidosos podem ser classificados como ASC (células escamosas atípicas). Acreditamos que a falta de confiança e de detalhes nucleares pode ter contribuído para o aumento do diagnóstico de ASC-US em nossa série. A frequência de ASC-US no estudo foi de 0%, provavelmente devido à seleção aleatória de casos com atipias do banco de amostras; no entanto, a frequência diagnóstica de ASC-US no laboratório de referência utilizado no estudo é de 3%, abaixo do limite geralmente aceito de 5% (Baena et al., 2021).

A patologia digital por meio de WSI ainda enfrenta vários fatores limitantes. O alto custo de implementação, o tempo de digitalização das lâminas e o espaço de armazenamento estão entre os principais exemplos. Além disso, a experiência do usuário com imagens digitais pode afetar o resultado diagnóstico, exigindo que os profissionais se familiarizem melhor com a tecnologia. Por outro lado, o WSI possui muitas vantagens, como a possibilidade de consultar casos simultaneamente (por visualização em tempo real), além de servir como plataforma para o uso de Inteligência Artificial (IA). Embora os esforços atuais de aplicação de aprendizado de máquina em patologia estejam focados principalmente em histopatologia, diversos estudos apontam o uso promissor da IA na citopatologia (Alrafiah, 2022; Landau; Pantanowitz, 2019). Apesar de já existirem vários softwares de IA aplicados à citopatologia, a maioria foca em triagem e qualidade da amostra (McAlpine; Pantanowitz; Michelow, 2021), mas já existem trabalhos voltados para a análise direta de atipias celulares em amostras citopatológicas (Alrafiah, 2022; Landau; Pantanowitz, 2019; Sanghvi et al., 2019), e esses algoritmos são capazes até de prever resultados histopatológicos por meio apenas de imagens de citologia (Liu et al., 2022). Além disso, a IA poderia ser utilizada para detectar HPV de forma mais rápida, direcionando pacientes para tratamento imediato (Bedell et al., 2020).

Estudos mostraram que interpretar e pontuar amostras coradas ao microscópio é um processo trabalhoso, altamente visual e subjetivo (Al-Kofahi et al., 2011; Rizzardi

et al., 2012, 2016). Assim, a patologia digital, combinada à inteligência artificial, pode ser uma ferramenta valiosa para otimizar o processo de leitura de lâminas de citologia cervicovaginal e aumentar a precisão diagnóstica.

Nesse contexto, a aplicação da patologia digital aliada à IA tem ganhado espaço não apenas na citologia, mas também na histopatologia oncológica, como no câncer de pulmão. Ferramentas baseadas em aprendizado de máquina têm sido utilizadas para identificar padrões morfológicos associados a diferentes subtipos tumorais, o que permite análises mais rápidas e padronizadas. Essa integração tecnológica é especialmente relevante em estudos de caracterização amostral, nos quais a acurácia na identificação dos subtipos histológicos e a correlação com dados clínicos e epidemiológicos são essenciais para a compreensão do perfil da doença em populações específicas.

7.2 Aplicação de IA à Patologia Digital

7.2.1 Caracterização das amostras e representatividade do estudo

A caracterização clínica das amostras incluídas neste estudo reflete adequadamente o perfil epidemiológico do câncer de pulmão não-pequenas células (CPNPC) descrito na literatura internacional. A predominância do adenocarcinoma (83,3%) sobre o carcinoma de células escamosas (16,7%) está em consonância com a tendência epidemiológica observada nas últimas décadas, onde o adenocarcinoma se tornou o subtipo histológico mais frequente, representando aproximadamente 70-80% dos casos de CPNPC (Siegel et al., 2023; Sung et al., 2021). Esta mudança no perfil histológico tem sido atribuída principalmente às alterações nos hábitos tabágicos e à melhoria das técnicas diagnósticas.

A distribuição etária observada, com concentração entre 60-80 anos, corrobora os dados epidemiológicos que demonstram que a idade mediana ao diagnóstico do câncer de pulmão situa-se em torno de 70 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023). A predominância de biópsias (68,1%) sobre peças cirúrgicas (31,9%) reflete a realidade clínica contemporânea, onde a maioria dos pacientes com CPNPC é diagnosticada em estágios avançados e, portanto, não elegível para ressecção cirúrgica. Esta tendência também se alinha com as diretrizes atuais que preconizam a obtenção de material suficiente através de biópsias minimamente invasivas para

realização de análises moleculares abrangentes (Lindeman et al., 2018a; Riely et al., 2024).

7.2.2 Perfil molecular e implicações terapêuticas

A alta taxa de positividade para PD-L1 observada neste estudo (57,4%) merece discussão detalhada. Embora este valor seja superior às taxas tipicamente reportadas na literatura para populações não selecionadas (40-50%), diversos fatores podem explicar essa diferença (Lindeman et al., 2018b); diferenças nas técnicas de processamento, conservação das amostras e critérios de avaliação podem influenciar os resultados. Outra razão são as variações populacionais e geográficas na expressão de PD-L1, que têm sido documentadas, com algumas populações apresentando taxas de positividade naturalmente mais elevadas.

A detecção de alterações moleculares em 93,6% dos casos é notavelmente alta e supera significativamente as taxas reportadas em estudos populacionais, que tipicamente variam entre 60-80% (Fujiwara et al., 2018; Lindeman et al., 2018b). Essa alta prevalência pode refletir a sensibilidade aprimorada das técnicas de NGS. É importante considerar que a implementação rotineira de painéis moleculares abrangentes tem revelado a presença de alterações em genes anteriormente não testados, o que contribui para o aumento das taxas de detecção global.

O perfil de alterações genéticas observado, com predominância de TP53, seguido por EGFR e KRAS, alinha-se com os dados da literatura internacional. As mutações em TP53, encontradas como as mais frequentes nesta coorte, são consistentes com seu papel central na oncogênese pulmonar e detectadas em aproximadamente 50-70% dos casos de CPNPC (Fujiwara et al., 2018; Garon et al., 2015; Kris et al., 2014; Yang; Zhang; Wang, 2019). A presença significativa de alterações em EGFR e KRAS é particularmente relevante do ponto de vista terapêutico, ao se considerar a disponibilidade de inibidores específicos para EGFR (erlotinib, gefitinib, osimertinib) e o recente desenvolvimento de inibidores de KRAS G12C (sotorasib, adagrasib) (Garon et al., 2015; Hong et al., 2020; Kris et al., 2014; Rolfo et al., 2018; Skoulidis et al., 2021).

7.2.3 Aplicação de inteligência artificial na quantificação celular e tecidual

A implementação de algoritmos de inteligência artificial para quantificação automatizada da composição celular e tecidual representa um avanço metodológico significativo em patologia digital. A enorme variabilidade observada na celularidade das amostras (1.288 a 1.339.078 células por caso) ilustra de forma objetiva a heterogeneidade intratumoral e intertumoral que caracteriza o CPNPC (Campbell et al., 2016; “Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma”, 2014; Gerlinger et al., 2012; Zhang et al., 2014). Esta heterogeneidade tem implicações clínicas importantes, pois pode influenciar tanto a representatividade das análises moleculares quanto a resposta terapêutica (“Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma”, 2014; Kandoth et al., 2013).

A quantificação tecidual revelou uma composição média de 21,3% de tecido tumoral, 27,5% de estroma e 51,2% de necrose. A predominância de áreas necróticas é um achado esperado em tumores avançados, mas tem implicações práticas importantes para a patologia molecular. Áreas necróticas não contribuem para a detecção de alterações genéticas viáveis e podem comprometer a qualidade das análises moleculares. Este achado reforça a importância da seleção criteriosa de áreas tumorais viáveis, uma prática já estabelecida em patologia molecular, mas que agora pode ser objetivamente quantificada através de ferramentas de IA (“Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma”, 2014; Vergote et al., 2022).

7.2.4 Correlações entre características histológicas e perfil molecular

A avaliação integrada de microambiente imune, morfometria tecidual e variáveis genômicas indica que as discrepâncias biológicas mais consistentes entre os subtipos pulmonares residem na infiltração mieloide e na expressão de PD-L1, enquanto a arquitetura macro e a carga genômica global permanecem comparáveis. A concentração de granulócitos foi substancialmente maior nos adenocarcinomas do que nos carcinomas escamosos (CECs) ($p = 0,0048$) e, dentro do grupo adenocarcinoma, destacou-se a diferença entre os padrões sólido e mucinoso ($p = 0,41$; $p = 0,048$) (“Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma”, 2014)

(Wong; Campbell; Shepherd, 2015). Esses dados sugerem que o fenótipo glandular, sobretudo o crescimento sólido, mantém eixo IL-8/CXCR2 mais ativo, favorecendo recrutamento neutrofílico e potencial imunossupressão local (Alfaro et al., 2017a; Wculek; Malanchi, 2015). O aumento limítrofe de macrófagos em acinar versus mucinoso ($p = 0,39$; $p = 0,051$) corrobora a heterogeneidade da polarização TAM em padrões glandulares clássicos, hipótese relevante para terapias anti-CSF1R ou moduladores de M2 (Cassetta; Pollard, 2018; De Palma; Lewis, 2013; Speeckaert et al., 2012).

Nenhum parâmetro morfométrico bidimensional - área tumoral, estroma ou necrose - distinguiu os subtipos (todos $p > 0,05$), o que indica limitada utilidade de métricas estruturais para classificação quando a amostra é pequena ou derivada de biópsia. A profundidade de leitura ($\sim 1 \times 10^6$ reads) mostrou-se uniforme, excluindo viés de cobertura, e nem VAF médio nem rendimentos absolutos de DNA ou RNA apresentaram variação estatística robusta entre subgrupos ($p > 0,05$). Entretanto, o TPS de PD-L1 atingiu ≈ 90 % nos sarcomatoides ($n = 2$), permaneceu intermediário nos adenocarcinomas sólidos (≈ 25 %) e foi inferior a 20 % nos demais padrões - um perfil compatível com o fenótipo “hiperimune” dos sarcomatoides descrito em séries clínicas, que responde de forma pronunciada a bloqueio PD-1/PD-L1 (Abdelrahman et al., 2018a; Carayol et al., 2013; Ko et al., 2016).

A ausência de diferenças significativas após análise, excetuando-se as variáveis granulocíticas e PD-L1, provavelmente reflete: (i) tamanho amostral reduzido em subtipos raros e (ii) heterogeneidade genômica intrínseca que não se traduz em variações de quantidade de ácido nucleico bruto (Bernstein et al., 2016). Consequentemente, estudos futuros devem ampliar a coorte de sarcomatoides e mucinosos. Clinicamente, a inclusão rotineira de imunoperfilagem de neutrófilos/macrófagos e PD-L1 em laudos de biópsia, bem como o desenho de ensaios que estratifiquem adenocarcinomas sólidos para testes de inibidores de CXCR2, emerge como estratégia racional para personalizar terapias e aprimorar modelos preditivos em patologia digital (Abdelrahman et al., 2018a, 2018b; Bernstein et al., 2016; Hackshaw, 2008).

7.2.5 Relação entre PD-L1 e características tumorais

A associação observada entre alta expressão de PD-L1 ($\geq 50\%$ TPS) e aumento da infiltração granulocítica representa um achado notável que pode refletir as complexas redes imunossupressoras dentro do microambiente tumoral. Granulócitos, particularmente neutrófilos associados a tumores (TANs), têm sido cada vez mais reconhecidos como moduladores-chave da imunidade antitumoral, com seu recrutamento frequentemente correlacionado com fenótipos imunossupressores e resistência a inibidores de checkpoint imunológico (Fridlender et al., 2009; Galdiero et al., 2016; Powell; Huttenlocher, 2016; Zhang et al., 2024). O aumento substancial na densidade de granulócitos em tumores com alta expressão de PD-L1 sugere um mecanismo potencial pelo qual a regulação positiva de PD-L1 pode coincidir com ou promover o recrutamento de neutrófilos, possivelmente por meio de vias de sinalização de quimiocinas aprimoradas, como o eixo CXCL1/CXCL2-CXCR2 (Alfaro et al., 2017b; Kargl et al., 2017a). Este achado é particularmente relevante, visto que os neutrófilos podem suprimir as respostas das células T por meio de vários mecanismos, bem como a produção de arginase-1, a geração de espécies reativas de oxigênio e a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), o que contribui potencialmente para a evasão imune, apesar da alta expressão de PD-L1 (Ramdass, 2014; Sagiv et al., 2015; Veglia; Perego; Gabrilovich, 2018).

O aumento progressivo da infiltração linfocitária com níveis mais elevados de TPS, embora aparentemente paradoxal dado o contexto imunossupressor, provavelmente reflete a complexa relação bidirecional entre a expressão de PD-L1 e a presença de células T no microambiente tumoral. A alta expressão de PD-L1 frequentemente representa um mecanismo de resistência imune adaptativa desencadeado pela produção de interferon- γ pelos linfócitos que se infiltram no tumor, criando um ciclo de retroalimentação onde o aumento da infiltração de células T impulsiona a regulação positiva de PD-L1 como uma resposta contrarregulatória (Ribas; Wolchok, 2018; Spranger et al., 2013; Taube et al., 2012). No entanto, a presença concomitante de granulócitos elevados no grupo com TPS $\geq 50\%$ pode comprometer a eficácia antitumoral desses linfócitos infiltrantes, o que evidencia que a alta expressão de PD-L1 por si só pode não ser suficiente para prever a resposta do inibidor do ponto de controle imunológico (Fridman et al., 2017; Gajewski;

Schreiber; Fu, 2013; Kargl et al., 2017b). Esses achados ressaltam a importância de considerar o contexto imunológico mais amplo, além da expressão de PD-L1, visto que o equilíbrio entre linfócitos efetores e granulócitos imunossupressores pode, em última análise, determinar os resultados terapêuticos em pacientes recebendo terapia anti-PD-1/PD-L1.

7.2.6 Qualidade molecular e fatores determinantes

Os resultados obtidos demonstram que a proporção de células tumorais apresenta uma correlação positiva e estatisticamente significativa com os rendimentos de DNA e RNA; mais evidente para o RNA ($p = 0,44$; $p = 0,008$) do que para o DNA ($p = 0,39$; $p = 0,025$). Esses achados sugerem que a quantidade relativa de tecido neoplásico dentro da amostra influencia diretamente a eficiência da extração de ácidos nucleicos, especialmente de RNA, que é mais sensível à integridade celular e às condições do microambiente.

A maior correlação com o RNA pode ser explicada pelo fato de que células tumorais, em geral, possuem maior atividade transcricional e conteúdo citoplasmático mais abundante, além de serem menos sujeitas à degradação por necrose ou envelhecimento celular do que outras populações celulares, como estroma ou células inflamatórias (Acharayothin et al., 2023; Jo et al., 2016a; Zatzman et al., 2022). Assim, amostras com maior fração tumoral tendem a conter mais RNA íntegro e amplificável, refletindo-se em melhores rendimentos (Acharayothin et al., 2023; Jo et al., 2016b).

No caso do DNA, embora a correlação também tenha sido significativa, o impacto da proporção tumoral foi ligeiramente menor, o que pode estar relacionado à maior estabilidade do DNA no ambiente fixado em formol e à contribuição de outras células viáveis (como fibroblastos e células inflamatórias) para o total de DNA extraído (Srinivasan; Sedmak; Jewell, 2002a). Esta correlação fornece uma base objetiva para as diretrizes que recomendam um mínimo de 20% de células tumorais para análises moleculares adequadas (Lindeman et al., 2018c; Souza da Silva et al., 2022a).

Esses resultados sustentam a prática de avaliar a proporção tumoral antes da extração molecular, reforçando a importância de estratégias como macrodissecção dirigida e quantificação automatizada por IA, sobretudo quando se objetiva otimizar a qualidade e a quantidade de material genético para análises de NGS. Em contextos

de amostras limitadas, como biópsias endoscópicas ou agulhas finas, tal avaliação torna-se ainda mais crítica para evitar falhas técnicas e garantir a confiabilidade dos dados moleculares.

A correlação significativa entre a presença de fibroblastos e a concentração de DNA ($\rho = 0,57$; $p < 0,001$) é um achado intrigante que merece investigação adicional. Os fibroblastos, como células estromais viáveis, podem contribuir para a quantidade total de DNA total extraído, mas também podem indicar áreas de tecido com maior grau de preservação (Bass et al., 2014b; Von Ahlfen et al., 2007). Esta observação sugere que a avaliação da qualidade do estroma pode ser um indicador útil da viabilidade geral da amostra para análises moleculares.

Um achado particularmente surpreendente foi a ausência de correlação entre a idade dos blocos de parafina e a qualidade molecular (DNA: $\rho = -0,07$, $p = 0,658$; RNA: $\rho = -0,13$, $p = 0,434$). Este resultado desafia o paradigma tradicionalmente aceito que associa diretamente o tempo de armazenamento com a degradação dos ácidos nucleicos. Diversos fatores podem explicar esta observação: primeiro, as condições de fixação (tipo de fixador, tempo de fixação, temperatura) podem ter maior impacto na preservação que o tempo de armazenamento; segundo, as condições de armazenamento (temperatura, umidade, luz) podem ser mais determinantes que a duração; terceiro, melhorias nas técnicas de extração e amplificação podem ter aumentado a capacidade de recuperar ácidos nucleicos de amostras mais antigas (Gilbert et al., 2007; Srinivasan; Sedmak; Jewell, 2002b).

7.2.7 Frequência alélica variante e implicações técnicas

A análise da frequência alélica variante (VAF) fornece insights importantes sobre os fatores técnicos que influenciam a detecção de mutações somáticas. A correlação significativa entre VAF e concentração de DNA ($\rho = 0,41$; $p = 0,020$), mas não com a composição celular específica, sugere que a qualidade da extração de DNA é mais determinante para a detecção sensível de variantes que a composição histológica da amostra. Esta observação tem implicações práticas importantes: laboratórios devem priorizar a otimização de protocolos de extração sobre a seleção de áreas histológicas específicas.

Como não foi realizada extração seletiva apenas da região tumoral, mas sim do tecido como um todo — bem como componentes tumorais, estromais, inflamatórios e eventuais áreas de necrose —, optou-se por analisar o número de reads de DNA em função da proporção de células tumorais em relação ao total de células presentes no tecido. Essa proporção foi definida como a razão entre o número de células tumorais e o número total de células quantificadas na amostra, refletindo o peso relativo do componente neoplásico no material analisado.

Os valores obtidos demonstraram um coeficiente de correlação de Spearman $\rho = 0,14$ ($p = 0,174$), indicando ausência de correlação estatisticamente significativa entre a fração tumoral e o número de reads gerados. Esse resultado sugere que, mesmo em amostras com baixa proporção de células tumorais, é possível obter um alto rendimento de *reads*, desde que o total de células presentes seja suficiente para fornecer quantidade adequada de DNA. Assim, o desempenho técnico do sequenciamento parece depender mais da densidade celular global do tecido do que da proporção tumoral isoladamente, portanto, em amostras heterogêneas, a fração tumoral isoladamente não é um preditor confiável do desempenho molecular, especialmente em termos de rendimento de *reads*. Esse achado reforça a importância de estratégias complementares, como a macrodissecção dirigida da área tumoral ou a estimativa visual bem controlada da celularidade neoplásica por patologistas experientes, com o objetivo de otimizar a representatividade do material tumoral utilizado para análises genômicas. Tais abordagens tornam-se ainda mais relevantes no contexto da oncologia de precisão, onde a acurácia da caracterização molecular impacta diretamente as decisões terapêuticas.

7.2.8 Limitações do estudo e considerações metodológicas

Algumas limitações importantes devem ser reconhecidas neste estudo. O tamanho amostral relativamente pequeno ($n=47$) pode limitar a generalização dos achados, especialmente para subgrupos menos frequentes como o carcinoma sarcomatóide. O desequilíbrio significativo entre casos com alterações moleculares ($n=44$) e sem alterações ($n=3$) compromete a análise estatística deste parâmetro e pode refletir um viés de seleção.

7.2.9 Implicações clínicas e translacionais

Os resultados deste estudo têm diversas implicações para a prática clínica e o desenvolvimento de medicina de precisão em oncologia. A capacidade de quantificar objetivamente características do microambiente tumoral que impactam tanto o prognóstico quanto a resposta terapêutica através de IA representa um avanço significativo. A predição da qualidade molecular baseada em características histológicas pode otimizar o fluxo diagnóstico, o que reduz falhas técnicas e custos laboratoriais (Burki, 2021; Coudray et al., 2018; Madabhushi; Lee, 2016d).

As diferenças observadas no microambiente imune entre subtipos histológicos sugerem que a estratificação para imunoterapia pode se beneficiar de análises mais sofisticadas que a avaliação isolada de PD-L1. A integração de múltiplos parâmetros do microambiente tumoral pode resultar em biomarcadores compostos mais informativos e clinicamente úteis.

Do ponto de vista de controle de qualidade laboratorial, a validação de que características morfológicas predizem qualidade molecular oferece uma ferramenta valiosa de controle de qualidade pré-analítico. Esta abordagem pode permitir a triagem de casos com maior probabilidade de sucesso nas análises moleculares, o que gera economia de recursos e de demanda de trabalho.

7.2.10 Perspectivas futuras

Os achados deste estudo abrem diversas avenidas para investigação futura. A validação destes resultados em coortes maiores e multicêntricas será essencial para confirmar sua aplicabilidade clínica. A integração destes dados morfológicos e moleculares com informações de resposta terapêutica e sobrevida poderá resultar no desenvolvimento de modelos preditivos mais robustos.

O desenvolvimento de algoritmos de aprendizado de máquina que integrem múltiplos parâmetros morfológicos, moleculares e clínicos representa uma oportunidade para criar ferramentas de apoio à decisão clínica mais sofisticadas. A expansão desta abordagem para outros tipos tumorais poderá validar a aplicabilidade geral destes conceitos em patologia digital.

8. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra de forma inequívoca que PD representa uma transformação paradigmática no diagnóstico anatomopatológico, transcendendo sua aplicação operacional para se consolidar como plataforma integradora entre morfologia, genômica e inteligência artificial. A implementação exitosa em um laboratório com recursos limitados valida a viabilidade técnica e econômica da transição digital além dos grandes centros acadêmicos, estabelecendo um modelo replicável para a democratização tecnológica na patologia oncológica.

A rigorosa validação diagnóstica confirmou alta concordância entre leituras digitais e convencionais, mesmo em preparações citológicas desafiadoras com sobreposição celular e presença de microrganismos. Estes resultados, sustentados por protocolos bem estruturados e treinamento adequado, consolidam a credibilidade da PD como método diagnóstico primário, superando barreiras técnicas historicamente associadas à digitalização de amostras complexas.

A quantificação automatizada da composição celular e tecidual emergiu como ferramenta estratégica para otimização das análises moleculares, o que demonstra correlação direta entre celularidade morfológica e qualidade do material genético extraído. Simultaneamente, a ausência de correlação entre idade do bloco parafinado e viabilidade molecular desafia paradigmas estabelecidos, redirecionando o foco para fatores técnicos controláveis e o que evidencia a necessidade de revisão de critérios pré-analíticos convencionais.

A análise multidimensional integrada revelou associações significativas entre padrões morfológicos digitais, composição do microambiente imune e perfil genômico tumoral. Particularmente relevante foi a identificação do papel dos granulócitos como potenciais moduladores da expressão de PD-L1, o que sugere novos biomarcadores compostos que podem aprimorar a estratificação de pacientes para imunoterapia. Estas descobertas exemplificam o potencial da PD em gerar insights clínicos que transcendem a capacidade da análise morfológica isolada.

Os resultados obtidos posicionam a Patologia Digital como eixo central na evolução da medicina de precisão oncológica. A capacidade de integrar dados morfológicos quantitativos, perfis moleculares e análises preditivas por inteligência artificial estabelece um novo padrão de acurácia diagnóstica e estratificação

terapêutica. Este modelo integrado oferece potencial para reduzir disparidades no acesso a tecnologias avançadas, o que promove maior equidade na implementação da medicina personalizada.

Este trabalho estabelece fundamentos sólidos para o desenvolvimento de algoritmos preditivos mais sofisticados, capazes de orientar decisões terapêuticas baseadas em múltiplas camadas informacionais. A metodologia validada abre caminho para estudos multicêntricos e implementação em larga escala, consolidando a Patologia Digital como componente essencial do diagnóstico oncológico contemporâneo e catalisador da transformação digital na medicina laboratorial.

9. REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, Hadeer M. *et al.* Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates. *Journal of Controlled Release*, v. 269, p. 374–392, jan. 2018.
- ABDELRAHMAN, Aziza E. *et al.* Prognostic impact of Apaf-1, Cyclin D1, and AQP-5 in serous ovarian carcinoma treated with the first-line chemotherapy. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 35, p. 27–37, ago. 2018a.
- ABDELRAHMAN, Aziza E. *et al.* Prognostic impact of Apaf-1, Cyclin D1, and AQP-5 in serous ovarian carcinoma treated with the first-line chemotherapy. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 35, p. 27–37, ago. 2018b.
- ACHARAYOTHIN, Onchira *et al.* Impact of Washing Processes on RNA Quantity and Quality in Patient-Derived Colorectal Cancer Tissues. *Biopreservation and Biobanking*, v. 21, n. 1, p. 31–37, 1 fev. 2023.
- AHUJA, Sana; ZAHEER, Sufian. Advancements in pathology: Digital transformation, precision medicine, and beyond. *Journal of Pathology Informatics*, v. 16, p. 100408, jan. 2025.
- ALFARO, Carlos *et al.* Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer Treatment Reviews*, v. 60, p. 24–31, nov. 2017a.
- ALFARO, Carlos *et al.* Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer Treatment Reviews*, v. 60, p. 24–31, nov. 2017b.
- AL-JANABI, Shaimaa; HUISMAN, André; VAN DIEST, Paul J. Digital pathology: current status and future perspectives. *Histopathology*, v. 61, n. 1, p. 1–9, 11 jul. 2012.
- AL-KOFAHI, Yousef *et al.* Cell-based quantification of molecular biomarkers in histopathology specimens. *Histopathology*, v. 59, n. 1, p. 40–54, jul. 2011.
- ALRAFIAH, Aziza R. Application and performance of artificial intelligence technology in cytopathology. *Acta Histochemica*, v. 124, n. 4, p. 151890, maio 2022.
- ALRAJJAL, Ahmed *et al.* Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of Uterine Cervix and Bethesda System. *Cytojournal*, v. 18, p. 16, 17 jul. 2021.
- AWADA, Gil; NEYNS, Bart. Melanoma with genetic alterations beyond the BRAF V600 mutation: management and new insights. *Current Opinion in Oncology*, v. 34, n. 2, p. 115–122, mar. 2022.
- AZAM, Ayesha S. *et al.* Diagnostic concordance and discordance in digital pathology: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Pathology*, v. 74, n. 7, p. 448–455, jul. 2021a.

AZAM, Ayesha S. *et al.* Diagnostic concordance and discordance in digital pathology: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Pathology*, v. 74, n. 7, p. 448–455, jul. 2021b.

AZAM, Ayesha S. *et al.* Diagnostic concordance and discordance in digital pathology: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Pathology*, v. 74, n. 7, p. 448–455, jul. 2021c.

BADE, Brett C.; DELA CRUZ, Charles S. Lung Cancer 2020. *Clinics in Chest Medicine*, v. 41, n. 1, p. 1–24, mar. 2020.

BAENA, Armando *et al.* Comparison of immediate colposcopy, repeat conventional cytology and high-risk human papillomavirus testing for the clinical management of atypical squamous cells of undetermined significance cytology in routine health services of Medellin, Colombia: The <scp>ASCUS-COL</scp> trial. *International Journal of Cancer*, v. 148, n. 6, p. 1394–1407, 15 mar. 2021.

BASS, B. Paige *et al.* A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue: How Well Do You Know Your FFPE Specimen? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 138, n. 11, p. 1520–1530, 1 nov. 2014a.

BASS, B. Paige *et al.* A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue: How Well Do You Know Your FFPE Specimen? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 138, n. 11, p. 1520–1530, 1 nov. 2014b.

BEASLEY, Mary Beth. Immunohistochemistry of Lung Cancer Biomarkers. *Advances in Anatomic Pathology*, v. 31, n. 5, p. 333–343, set. 2024.

BEDELL, Sarah L. *et al.* Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future. *Sexual Medicine Reviews*, v. 8, n. 1, p. 28–37, 1 jan. 2020.

BENSON, Al B. *et al.* Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, v. 19, n. 3, p. 329–359, mar. 2021.

BERA, Kaustav *et al.* Artificial intelligence in digital pathology — new tools for diagnosis and precision oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 16, n. 11, p. 703–715, 9 nov. 2019.

BERNSTEIN, Michael B. *et al.* Immunotherapy and stereotactic ablative radiotherapy (ISABR): a curative approach? *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 13, n. 8, p. 516–524, 8 ago. 2016.

BERRINO, Enrico *et al.* Cold Formalin Fixation Guarantees DNA Integrity in Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissues: Premises for a Better Quality of Diagnostic and Experimental Pathology With a Specific Impact on Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 10, 19 fev. 2020.

BHAI, Pratibha *et al.* Molecular profiling of solid tumors by next-generation sequencing: an experience from a clinical laboratory. *Frontiers in Oncology*, v. 13, 6 jul. 2023.

BOROWSKY, Alexander D. *et al.* Digital Whole Slide Imaging Compared With Light Microscopy for Primary Diagnosis in Surgical Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 144, n. 10, p. 1245–1253, 1 out. 2020.

BURKI, Talha Khan. Placenta can provide new insights on the genetics of cancer. *The Lancet Oncology*, v. 22, n. 5, p. 591, maio 2021.

CAMPBELL, Joshua D. *et al.* Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nature Genetics*, v. 48, n. 6, p. 607–616, 9 jun. 2016.

CARAYOL, M. *et al.* Psychological effect of exercise in women with breast cancer receiving adjuvant therapy: what is the optimal dose needed? *Annals of Oncology*, v. 24, n. 2, p. 291–300, fev. 2013.

CARRETERO-BARRIO, Irene *et al.* Concordance in the estimation of tumor percentage in non-small cell lung cancer using digital pathology. *Scientific reports*, v. 14, n. 1, p. 24163, 15 out. 2024.

CASSETTA, Luca; POLLARD, Jeffrey W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 17, n. 12, p. 887–904, 26 dez. 2018.

CHAIN, Krista *et al.* Digital image-assisted quantitative nuclear analysis improves diagnostic accuracy of thyroid fine-needle aspiration cytology. *Cancer Cytopathology*, v. 127, n. 8, p. 501–513, 31 ago. 2019.

CLIFFORD, Gary M.; TULLY, Stephen; FRANCESCHI, Silvia. Carcinogenicity of Human Papillomavirus (HPV) Types in HIV-Positive Women: A Meta-Analysis From HPV Infection to Cervical Cancer. *Clinical Infectious Diseases*, v. 64, n. 9, p. 1228–1235, 1 maio 2017.

COLPANI, Verônica *et al.* Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, v. 15, n. 2, p. e0229154, 21 fev. 2020.

Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, v. 511, n. 7511, p. 543–550, 31 jul. 2014.

COUDRAY, Nicolas *et al.* Classification and mutation prediction from non–small cell lung cancer histopathology images using deep learning. *Nature Medicine*, v. 24, n. 10, p. 1559–1567, 17 out. 2018.

DAMUZZO, Vera *et al.* Treatment of metastatic ALK-positive non-small cell lung cancer: indirect comparison of different ALK inhibitors using reconstructed patient data. *Frontiers in Oncology*, v. 15, 9 maio 2025.

DE PALMA, Michele; LEWIS, Claire E. Macrophage Regulation of Tumor Responses to Anticancer Therapies. *Cancer Cell*, v. 23, n. 3, p. 277–286, mar. 2013.

DONNELLY, Amber D. *et al.* Optimal z-axis scanning parameters for gynecologic cytology specimens. *Journal of Pathology Informatics*, v. 4, n. 1, p. 38, jan. 2013.

EHTESHAMI BEJNORDI, Babak *et al.* Diagnostic Assessment of Deep Learning Algorithms for Detection of Lymph Node Metastases in Women With Breast Cancer. *JAMA*, v. 318, n. 22, p. 2199, 12 dez. 2017.

EL-DEIRY, Wafik S. *et al.* The current state of molecular testing in the treatment of patients with solid tumors, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 69, n. 4, p. 305–343, 22 jul. 2019.

ETTINGER, David S. *et al.* NCCN Guidelines Insights: Non–Small Cell Lung Cancer, Version 2.2021. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, v. 19, n. 3, p. 254–266, mar. 2021.

FORDE, Patrick M. *et al.* Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 386, n. 21, p. 1973–1985, 26 maio 2022.

FRIDLENDER, Zvi G. *et al.* Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*, v. 16, n. 3, p. 183–194, set. 2009.

FRIDMAN, Wolf H. *et al.* The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 14, n. 12, p. 717–734, 25 dez. 2017.

FUJIWARA, Masaki *et al.* Association between serious psychological distress and nonparticipation in cancer screening and the modifying effect of socioeconomic status: Analysis of anonymized data from a national cross-sectional survey in Japan. *Cancer*, v. 124, n. 3, p. 555–562, 27 fev. 2018.

GAJEWSKI, Thomas F.; SCHREIBER, Hans; FU, Yang-Xin. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*, v. 14, n. 10, p. 1014–1022, 18 out. 2013.

GALDIERO, Maria Rosaria *et al.* Occurrence and significance of tumor-associated neutrophils in patients with colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, v. 139, n. 2, p. 446–456, 15 jul. 2016.

GARON, Edward B. *et al.* Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 21, p. 2018–2028, 21 maio 2015.

GERLINGER, Marco *et al.* Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal of Medicine*, v. 366, n. 10, p. 883–892, 8 mar. 2012.

GILBERT, M. Thomas P. *et al.* The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues—Which Methods Are Useful When? *PLoS ONE*, v. 2, n. 6, p. e537, 20 jun. 2007.

GILKS, C. Blake; PRAT, Jaime. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Human Pathology*, v. 40, n. 9, p. 1213–1223, set. 2009.

GOACHER, Edward *et al.* The Diagnostic Concordance of Whole Slide Imaging and Light Microscopy: A Systematic Review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 141, n. 1, p. 151–161, 1 jan. 2017a.

GOACHER, Edward *et al.* The Diagnostic Concordance of Whole Slide Imaging and Light Microscopy: A Systematic Review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 141, n. 1, p. 151–161, 1 jan. 2017b.

GOSWAMI, Rashmi S. *et al.* Identification of Factors Affecting the Success of Next-Generation Sequencing Testing in Solid Tumors. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 145, n. 2, p. 222–237, fev. 2016.

HABERMEHL, Gabriel; KO, Jennifer. Cutaneous Metastases: A Review and Diagnostic Approach to Tumors of Unknown Origin. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 143, n. 8, p. 943–957, 1 ago. 2019a.

HABERMEHL, Gabriel; KO, Jennifer. Cutaneous Metastases: A Review and Diagnostic Approach to Tumors of Unknown Origin. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 143, n. 8, p. 943–957, 1 ago. 2019b.

HACKSHAW, A. Small studies: strengths and limitations. *European Respiratory Journal*, v. 32, n. 5, p. 1141–1143, nov. 2008.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HANNA, Matthew G. *et al.* Comparison of glass slides and various digital-slide modalities for cytopathology screening and interpretation. *Cancer Cytopathology*, v. 125, n. 9, p. 701–709, 30 set. 2017.

HANNA, Matthew G. *et al.* Validation of a digital pathology system including remote review during the COVID-19 pandemic. *Modern Pathology*, v. 33, n. 11, p. 2115–2127, nov. 2020.

HONG, David S. *et al.* KRAS G12C Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *New England Journal of Medicine*, v. 383, n. 13, p. 1207–1217, 24 set. 2020.

HUNT, Allison L. *et al.* Real-time functional proteomics enhances therapeutic targeting in precision oncology molecular tumor boards. *npj Precision Oncology*, v. 9, n. 1, p. 111, 15 abr. 2025.

IBRAHIM, Asmaa *et al.* Artificial intelligence in digital breast pathology: Techniques and applications. *The Breast*, v. 49, p. 267–273, fev. 2020.

IMYANITOV, Evgeny N.; IYEVLEVA, Aglaya G.; LEVCHENKO, Evgeny V. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 157, p. 103194, jan. 2021.

J. SALLER, James; BOYLE, Theresa A. Molecular Pathology of Lung Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 12, n. 3, p. a037812, mar. 2022.

JAHN, Stephan W.; PLASS, Markus; MOINFAR, Farid. Digital Pathology: Advantages, Limitations and Emerging Perspectives. *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 11, p. 3697, 18 nov. 2020.

JIANG, Ruirui *et al.* Validating a targeted next-generation sequencing assay and profiling somatic variants in Chinese non-small cell lung cancer patients. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 2070, 7 fev. 2020.

JO, Peter *et al.* Neoadjuvant Therapy in Rectal Cancer - Biobanking of Preoperative Tumor Biopsies. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 35589, 18 out. 2016a.

JO, Peter *et al.* Neoadjuvant Therapy in Rectal Cancer - Biobanking of Preoperative Tumor Biopsies. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 35589, 18 out. 2016b.

KANDOTH, Cyriac *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, v. 502, n. 7471, p. 333–339, 17 out. 2013.

KARGL, Julia *et al.* Neutrophils dominate the immune cell composition in non-small cell lung cancer. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, p. 14381, 1 fev. 2017a.

KARGL, Julia *et al.* Neutrophils dominate the immune cell composition in non-small cell lung cancer. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, p. 14381, 1 fev. 2017b.

KELLEHER, Mai *et al.* Department Wide Validation in Digital Pathology—Experience from an Academic Teaching Hospital Using the UK Royal College of Pathologists' Guidance. *Diagnostics*, v. 13, n. 13, p. 2144, 22 jun. 2023.

KHURANA, Kamal K. Telecytology and its evolving role in cytopathology. *Diagnostic Cytopathology*, v. 40, n. 6, p. 498–502, 22 jun. 2012.

KIM, David *et al.* Evaluating the role of Z-stack to improve the morphologic evaluation of urine cytology whole slide images for high-grade urothelial carcinoma: Results and review of a pilot study. *Cancer Cytopathology*, v. 130, n. 8, p. 630–639, 18 ago. 2022.

KLUDT, Carina *et al.* Next-generation lung cancer pathology: Development and validation of diagnostic and prognostic algorithms. *Cell Reports Medicine*, v. 5, n. 9, p. 101697, set. 2024.

KO, Jennifer S. *et al.* Histological pattern of Merkel cell carcinoma sentinel lymph node metastasis improves stratification of Stage III patients. *Modern Pathology*, v. 29, n. 2, p. 122–130, fev. 2016.

KRIS, Mark G. *et al.* Using Multiplexed Assays of Oncogenic Drivers in Lung Cancers to Select Targeted Drugs. *JAMA*, v. 311, n. 19, p. 1998, 21 maio 2014.

LANDAU, Michael S.; PANTANOWITZ, Liron. Artificial intelligence in cytopathology: a review of the literature and overview of commercial landscape. *Journal of the American Society of Cytopathology*, v. 8, n. 4, p. 230–241, jul. 2019.

LEE, Jonathan J. *et al.* Validation of Digital Pathology for Primary Histopathological Diagnosis of Routine, Inflammatory Dermatopathology Cases. *The American Journal of Dermatopathology*, v. 40, n. 1, p. 17–23, jan. 2018.

LINDEMAN, Neal I. *et al.* Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 142, n. 3, p. 321–346, 1 mar. 2018a.

LINDEMAN, Neal I. *et al.* Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 142, n. 3, p. 321–346, 1 mar. 2018b.

LINDEMAN, Neal I. *et al.* Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 142, n. 3, p. 321–346, 1 mar. 2018c.

LIU, Yixiao *et al.* A Deep Learning System to Predict the Histopathological Results From Urine Cytopathological Images. *Frontiers in Oncology*, v. 12, 24 maio 2022.

LIU, Yun *et al.* Detecting Cancer Metastases on Gigapixel Pathology Images. 3 mar. 2017.

MADABHUSHI, Anant; LEE, George. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Medical Image Analysis*, v. 33, p. 170–175, out. 2016a.

MADABHUSHI, Anant; LEE, George. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Medical Image Analysis*, v. 33, p. 170–175, out. 2016b.

MADABHUSHI, Anant; LEE, George. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Medical Image Analysis*, v. 33, p. 170–175, out. 2016c.

MADABHUSHI, Anant; LEE, George. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Medical Image Analysis*, v. 33, p. 170–175, out. 2016d.

MCALPINE, Ewen David; PANTANOWITZ, Liron; MICHELOW, Pamela M. Challenges Developing Deep Learning Algorithms in Cytology. *Acta Cytologica*, v. 65, n. 4, p. 301–309, 2021.

NAKAGAWA, Hidewaki; FUJITA, Masashi. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. *Cancer Science*, v. 109, n. 3, p. 513–522, 26 mar. 2018.

NOJI, Rika *et al.* Comprehensive Genomic Profiling Reveals Clinical Associations in Response to Immune Therapy in Head and Neck Cancer. *Cancers*, v. 14, n. 14, p. 3476, 18 jul. 2022.

OSINSKI, Bolesław L. *et al.* Artificial intelligence-augmented histopathologic review using image analysis to optimize DNA yield from formalin-fixed paraffin-embedded slides. *Modern Pathology*, v. 35, n. 12, p. 1791–1803, dez. 2022.

PALLUA, J. D. *et al.* The future of pathology is digital. *Pathology - Research and Practice*, v. 216, n. 9, p. 153040, set. 2020.

PANTANOWITZ, Liron *et al.* Review of the current state of whole slide imaging in pathology. *Journal of Pathology Informatics*, v. 2, n. 1, p. 36, jan. 2011a.

PANTANOWITZ, Liron *et al.* Review of the current state of whole slide imaging in pathology. *Journal of Pathology Informatics*, v. 2, n. 1, p. 36, jan. 2011b.

PANTANOWITZ, Liron *et al.* Validating Whole Slide Imaging for Diagnostic Purposes in Pathology: Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 137, n. 12, p. 1710–1722, dez. 2013a.

PANTANOWITZ, Liron *et al.* Validating whole slide imaging for diagnostic purposes in pathology: guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 137, n. 12, p. 1710–22, dez. 2013b.

POWELL, Davalyn R.; HUTTENLOCHER, Anna. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends in Immunology*, v. 37, n. 1, p. 41–52, jan. 2016.

PRELAJ, A. *et al.* Artificial intelligence for predictive biomarker discovery in immuno-oncology: a systematic review. *Annals of Oncology*, v. 35, n. 1, p. 29–65, jan. 2024.

RAMDASS, Michael. TEVAR for Symptomatic Stanford B Dissection: A Systematic Review of 30-Day Mortality and Morbidity. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, v. 63, n. 02, p. 97–112, 21 abr. 2014.

RANDELL, Rebecca *et al.* Effect of Display Resolution on Time to Diagnosis with Virtual Pathology Slides in a Systematic Search Task. *Journal of Digital Imaging*, v. 28, n. 1, p. 68–76, 16 fev. 2015.

RIBAS, Antoni; WOLCHOK, Jedd D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, v. 359, n. 6382, p. 1350–1355, 23 mar. 2018.

RIELY, Gregory J. *et al.* Non–Small Cell Lung Cancer, Version 4.2024. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, v. 22, n. 4, p. 249–274, maio 2024.

RIZZARDI, Anthony E. *et al.* Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagnostic Pathology*, v. 7, n. 1, p. 42, 20 dez. 2012.

RIZZARDI, Anthony E. *et al.* Quantitative comparison and reproducibility of pathologist scoring and digital image analysis of estrogen receptor β 2 immunohistochemistry in prostate cancer. *Diagnostic Pathology*, v. 11, n. 1, p. 63, 11 dez. 2016.

RIZZO, Paola Chiara *et al.* Technical and Diagnostic Issues in Whole Slide Imaging Published Validation Studies. *Frontiers in Oncology*, v. 12, 16 jun. 2022.

ROLFO, Christian *et al.* Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. *Journal of Thoracic Oncology*, v. 13, n. 9, p. 1248–1268, set. 2018.

ROY, Somak *et al.* Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines. *The Journal of Molecular Diagnostics*, v. 20, n. 1, p. 4–27, jan. 2018.

SAGIV, Jitka Y. *et al.* Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer. *Cell Reports*, v. 10, n. 4, p. 562–573, fev. 2015.

SALGKAMIS, Dimitrios *et al.* Systematic review and feasibility study on pre-analytical factors and genomic analyses on archival formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissue. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 18275, 6 ago. 2024.

SANGHVI, Adit B. *et al.* Performance of an artificial intelligence algorithm for reporting urine cytopathology. *Cancer Cytopathology*, v. 127, n. 10, p. 658–666, 14 out. 2019.

SHAFI, Saba; PARWANI, Anil V. Artificial intelligence in diagnostic pathology. *Diagnostic Pathology*, v. 18, n. 1, p. 109, 3 out. 2023.

SHI, Wangpan *et al.* Diagnostic Pitfalls of Digital Microscopy Versus Light Microscopy in Gastrointestinal Pathology: A Systematic Review. *Cureus*, 12 ago. 2021.

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 73, n. 1, p. 17–48, 12 jan. 2023.

SILAS, Olugbenga Akindele *et al.* Telepathology in Nigeria for Global Health Collaboration. *Annals of Global Health*, v. 88, n. 1, 16 set. 2022a.

SILAS, Olugbenga Akindele *et al.* Telepathology in Nigeria for Global Health Collaboration. *Annals of Global Health*, v. 88, n. 1, 16 set. 2022b.

SKOULIDIS, Ferdinandos *et al.* Sotorasib for Lung Cancers with *KRAS* p.G12C Mutation. *New England Journal of Medicine*, v. 384, n. 25, p. 2371–2381, 24 jun. 2021.

SOLOMON, Benjamin J. *et al.* First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in *ALK* - Positive Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 371, n. 23, p. 2167–2177, 4 dez. 2014.

SOUZA DA SILVA, Ricella *et al.* Tissue management in precision medicine: What the pathologist needs to know in the molecular era. *Frontiers in molecular biosciences*, v. 9, p. 983102, 2022a.

SOUZA DA SILVA, Ricella *et al.* Tissue management in precision medicine: What the pathologist needs to know in the molecular era. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 9, 26 out. 2022b.

SPEECKAERT, Reinhart *et al.* Immune mediated mechanisms of melanocyte destruction. *Oncolmunology*, v. 1, n. 4, p. 526–528, 27 jul. 2012.

SPRANGER, Stefani *et al.* Up-Regulation of PD-L1, IDO, and T regs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8 + T Cells. *Science Translational Medicine*, v. 5, n. 200, 28 ago. 2013.

SRINIVASAN, Mythily; SEDMAK, Daniel; JEWELL, Scott. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *The American Journal of Pathology*, v. 161, n. 6, p. 1961–1971, dez. 2002a.

SRINIVASAN, Mythily; SEDMAK, Daniel; JEWELL, Scott. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *The American Journal of Pathology*, v. 161, n. 6, p. 1961–1971, dez. 2002b.

STROM, Samuel P. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer biology & medicine*, v. 13, n. 1, p. 3–11, mar. 2016.

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.

TAUBE, Janis M. *et al.* Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 127, 28 mar. 2012.

THRALL, Michael; PANTANOWITZ, Liron; KHALBUSS, Walid. Telecytology: Clinical applications, current challenges, and future benefits. *Journal of Pathology Informatics*, v. 2, n. 1, p. 51, jan. 2011.

VEGLIA, Filippo; PEREGO, Michela; GABRILOVICH, Dmitry. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology*, v. 19, n. 2, p. 108–119, 18 fev. 2018.

VERGOTE, I. *et al.* European experts consensus: BRCA/homologous recombination deficiency testing in first-line ovarian cancer. *Annals of Oncology*, v. 33, n. 3, p. 276–287, mar. 2022.

VOLYNSKAYA, Zoya *et al.* Integrated Pathology Informatics Enables High-Quality Personalized and Precision Medicine: Digital Pathology and Beyond. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 142, n. 3, p. 369–382, 1 mar. 2018.

VON AHLFEN, Silke *et al.* Determinants of RNA Quality from FFPE Samples. *PLoS ONE*, v. 2, n. 12, p. e1261, 5 dez. 2007.

WADOWSKA, Katarzyna *et al.* Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 13, p. 4569, 27 jun. 2020.

WANG, Dayong *et al.* Deep Learning for Identifying Metastatic Breast Cancer. 18 jun. 2016.

WANG, Shidan *et al.* Comprehensive analysis of lung cancer pathology images to discover tumor shape and boundary features that predict survival outcome. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 10393, 10 jul. 2018.

WCULEK, Stefanie K.; MALANCHI, Ilaria. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature*, v. 528, n. 7582, p. 413–417, 17 dez. 2015.

WEINSTEIN, Ronald S. Prospects for telepathology. *Human Pathology*, v. 17, n. 5, p. 433–434, maio 1986.

WONG, Newton A. C. S.; CAMPBELL, Fiona; SHEPHERD, Neil A. Abdominal monophasic synovial sarcoma is a morphological and immunohistochemical mimic of gastrointestinal stromal tumour. *Histopathology*, v. 66, n. 7, p. 974–981, 4 jun. 2015.

YANG, Sen; ZHANG, Zhe; WANG, Qiming. Emerging therapies for small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 12, n. 1, p. 47, 2 dez. 2019.

ZATZMAN, Matthew *et al.* Widespread hypertranscription in aggressive human cancers. *Science advances*, v. 8, n. 47, p. eabn0238, 25 nov. 2022.

ZHANG, Jianjun *et al.* Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*, v. 346, n. 6206, p. 256–259, 10 out. 2014.

ZHANG, Shuai *et al.* Tumor associated neutrophils governs tumor progression through an IL-10/STAT3/PD-L1 feedback signaling loop in lung cancer. *Translational Oncology*, v. 40, p. 101866, fev. 2024.

APÊNDICE I**Aprovação do projeto em Comitê de Ética****COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: ALTERAÇÕES GENÔMICAS DE PACIENTE COM CÂNCER DE PULMÃO

Pesquisador: FABIO ROCHA FERNANDES TAVORA

Versão: 2

CAAE: 86254625.1.0000.5049

Instituição Proponente: Unichristus

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 011555/2025

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto ALTERAÇÕES GENÔMICAS DE PACIENTE COM CÂNCER DE PULMÃO que tem como pesquisador responsável FABIO ROCHA FERNANDES TAVORA, foi recebido para análise ética no CEP Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS em 10/02/2025 às 11:53.

Endereço: Rua João Adolfo Gurgel, nº 133, térreo, salas T11 e T12 - Prédio Central

Bairro: Cocó

CEP: 60.190-060

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3085-8187

E-mail: cep@unichristus.edu.br

APÊNDICE II

No contexto das atividades desenvolvidas durante o mestrado, foi publicado o artigo científico intitulado "*Comparison of glass and digital slides for cervical cytopathology screening and interpretation*", de autoria de Guilherme Velozo, o que contribui para o avanço da validação da patologia digital em citopatologia ginecológica.

DOI: 10.1002/dc.25209

Comparison of glass and digital slides for cervical cytopathology screening and interpretation

Guilherme de Velozo MSc¹  | Juliana Cordeiro PhD¹ | Jefferson Sousa BSc² |
Ana Cláudia Holanda BSc² | Giovanni Pessoa BSc² | Mônica Porfírio BSc¹ |
Fábio Távora PhD¹

¹Federal University of Ceará, Argos Patologia Laboratory, Fortaleza, Brazil

²Argos Patologia Laboratory, Fortaleza, Brazil

Correspondence

Fábio Távora and Guilherme de Velozo,
Federal University of Ceará, Argos Patologia
Laboratory, Fortaleza, Brazil.
Email: ftavora@gmail.com and
guilhermevelozo_ufc@outlook.com

Abstract

Cervical cancer is the second most common form of cancer and a leading cause of premature death among women aged 15 to 44 worldwide. In Brazil, there is a high prevalence of infection by the human papillomavirus – HPV. Digital pathology optimizes time and space for reading cervicovaginal cytology slides. We evaluated the feasibility of using whole slide images (WSI) for the routine interpretation of cytology exams. A total of 99 cases of vaginal cytology were selected from a reference laboratory in Northeastern Brazil. Three cytotechnicians participated in the study. Cellular atypia was the one that most presented concordance values. Two observers almost perfectly agreed ($k = 0.86$ and $k = 0.84$, respectively) on the negative diagnoses. The performance of the evaluators for NILM (negative for intraepithelial lesion and malignancy) showed high reproducibility and sensitivity in the digital slides, mainly between evaluators A and C. In contrast, the microbiology group showed disagreement between the diagnoses by digital slides and the standard- gold. The concordance between the digital diagnoses and the gold standard for ASCUS was 89%. In the inflammatory category, Spearman's test showed similar results between raters A, B, and C ($r_s = 0.47$, $r_s = 0.41$, and $r_s = 0.47$, respectively). This study reports the diagnostic validation using digital slides in view of the need to optimize the cytology visualization process. Our experience shows good diagnostic agreement between digital and optical microscopy in several analyzed categories, but mainly in relation to cellular atypia and inflammatory processes.

KEYWORDS

cytology, digital pathology, telecytology

1 | INTRODUCTION

Cervical cancer is the second most common form of cancer and a significant cause of premature death among women aged 15 to 44 years worldwide.¹ Due to advances in screening and medical care, it can be highly preventable and treated if detected in its early stages. The Brazilian population has a high prevalence of Human Papillomavirus – HPV – infection,¹ highlighting the urgent need for a better approach to traceability, early diagnosis, and

prevention of cervical cancer. In Brazil, 16,710 new cases of cervical cancer are diagnosed, and 6,596 women die from the disease annually, according to the National Cancer Institute (INCA, 2022). Since the 1950s, the Pap smear test has been used for screening,² and currently, it may be coupled with detecting high-risk HPV DNA^{3,4} as a standard screening and diagnostic approach worldwide. In Brazil, cervical cancer screening began officially in 1996, being implemented in the Unified Health System (SUS), with more than 6 million Pap smear tests per year. Unfortunately, it is

estimated that 67% fewer tests were offered to women because of the emergency of the Covid-19 pandemic.⁵

One of the limiting factors for nationwide test availability is the number of professionals who can evaluate slides and render diagnoses. In this scenario, whole slide imaging (WSI) and a digital workflow emerge as a proposal for optimizing time and space.^{6,7}

Whole slide imaging was first developed in 1986,⁸ and since then, several studies have been conducted to show diagnostic comparability between digital images and physical slides.⁹ The ability to digitize an entire pathology glass slide has been transformative in the pathology world and has spawned numerous clinical, educational, and research applications.^{10–13}

Most histological preparations can be digitized (H&E, IHC, special stains, for example).¹⁴ Among these, scanning has been increasingly used.¹⁵ However, there are several limiting issues to using scanned slides in routine clinical practice, including diagnosis time, image quality, visualization system experience, evaluator acceptance of the technology, cell overlap, thick and dense smears of cells, cells in different focal fields, and even obscure foreign material.^{15–18} In this study, we evaluated the feasibility of using whole-slide images for routine interpretation of cervicovaginal cytology exams, aiming to compare the visualization modes (slide and digital). We also include data about the time to diagnosis using digital slides and the fidelity of the images as measured by the professionals.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Selection of cases

A total of 100 vaginal cytology slides from a reference laboratory in Northeastern Brazil were retrospectively selected from a bank of cases diagnosed with standard physical slides, including sequential slides with epithelial atypia (50), that is, squamous intraepithelial lesions (ASCUS – Atypias of Undetermined Meaning in Squamous Cells; LSIL – Low-grade squamous intraepithelial lesion; ASC-H – Squamous Cell Atypia, high-grade lesion cannot be ruled out; HSIL – High-Grade Intraepithelial Lesion) and slides without any epithelial cellular alterations (50). Within each group, the slides were randomly selected in the same period. These 100 cases were digitized, and all slide images were made available blindly to the same evaluators who had read the physical slides. Cases had been processed using the SurePath-based liquid preparation using standard procedures. Each slide received an unidentified number, blind to the cytotechnicians. Three experienced cytotechnicians participated in the analysis using full digital images. The diagnosis previously established on a glass slide was established as the gold standard. An experienced pathologist participated in the design and data analyses.

2.2 | Digital images

All slides were scanned on the MoticEasyScan Infinity 100 (Motic, Vancouver, CA) at 20 $\times$ magnification (0.52 $\mu\text{m}/\text{pixel}$) at the default

quality setting and scanned using automatic tissue detection. The slide image files were stored on a Dell server with 8 GB of RAM and a 1 TB hard drive. The digitized images were shared with the evaluators through an online system, in which each cytotechnician had access to all 100 slides individually. The screens used for visualization had a 1280 $\times$ 1084 pixels resolution.

2.3 | Interpretation

The physical slides were seen in an Olympus CX22[®] microscope, using lenses with 20 $\times$ and 40 $\times$ magnifications with 10 $\times$ objectives. All slides showing some cellular atypia were reviewed by an experienced pathologist, and the diagnoses were confirmed prior to sign-out. The evaluators had 1 week to read the digital slides. Before analyzing the digital images, the evaluators underwent basic training in the visualization system. For each case, the evaluator generated a GoogleForms[®] form containing diagnoses based on the current Bethesda classification.¹⁹ At the end of the analysis, a general report was generated. One of the slides presented a corrupted image; thus, it was removed from the study.

2.4 | Statistical analysis

Cohen's Kappa coefficient was calculated to assess interobserver and intraobserver agreement in analyses using physical and digital slides. Based on the Landis and Koch guidelines, κ (kappa) values were interpreted as 0–0.2 representing poor agreement, 0.2–0.4 fair, 0.4–0.6 moderate, 0.6–0.8 substantial, and ≥ 0.8 perfect agreement.²⁰ Also, the Spearman test was calculated to measure the strength of the correlation between the analyses. The percentage of identically classified cases and the weighted Cohen's κ statistic were computed to measure the interobserver and intraobserver agreement of variables with different score levels. The diagnostic rates of physical and digital slides were compared using the chi-square test. The ROC curves for the observers and the respective areas under the curve were estimated from the negativity variables and cell atypia score to compare the quality levels; the respective 95% confidence interval (CI) was calculated. Finally, the evaluators answered a questionnaire about the diagnosis time and the reliability perception of the digital images to the physical ones. The value of $p < .05$ was used to consider significant Kappa, Spearman, and Chi-square values. Analyses were performed using IBM SPSS Statistics 26.0 and Launch EpiInfo 7.2.4.0 software.

3 | RESULTS

The present study finally included 99 cytology slides (Pap smears). The median age of the women who participated in the study was 32 years old, with an average of 33.8 years old. All slides (99/99) were considered satisfactory by the evaluators.

TABLE 1 Time and diagnostic confidence questionnaire results.

	A		B		C	
	Mean	Median	Mean	Median	Mean	Median
Time (min)	10.1	9	8.2	9	10.29	10
Confiability	5.51	6	7	7	9.2	9

Note: *Parameterization considered from 1 to 10 for each image evaluation.

3.1 | Slide scanning performance

The mean scanning time per slide was around 2 min, with an average of 2.4 min. The average time for diagnosis by glass slides and WSI by the evaluators was recorded (Table 1). The overall average time to assessment per case using WSI was 9.53 min, with observer C having the longest average time. The level of confidence in the digital images of each evaluator was also measured. Each reviewer's confidence rating, selected on a 10-point scale, is shown in Table 1. Observer C had the highest confidence in the digital images, with an average of 9.2 on a 10-point scale. Of the complaints relayed by the evaluators in relation to the quality of the slides, the most frequent occurred in images that presented regions with high cellular density, and, on the slide, it was not possible to adjust the focus on the Z-axis (Figure 1).

3.2 | Diagnostic differences

The results of the diagnostic differences between the views are presented in Table 2. The cell preservation status and microbiology diagnosis groups showed the highest disagreement between the diagnoses using WSI and the gold standard. For one observer (A), in the microorganism group, the majority of the readings were statistically different between physical and digital evaluations. For observer C, in contrast, only the diagnosis of *Lactobacillus* was significantly different ($p = .001$) between physical and digital slides. The cell atypia diagnosis group variables showed the best diagnostic agreement (Table 2), and only for ASC-US a diagnostic difference among cytotechnicians was observed ($p < .05$).

3.3 | Agreement values

The concordance values between all three observers are shown in Table 3. The microbiology group showed the lowest concordance values. *Candida* spp. and *Gardnerella/Mobiluncus* showed moderate concordance rates between observers, and there was no concordance between *Bacillus*, *Coccus*, and *Lactobacillus* sp. (Table 3).

The presence of representative epithelium, degree of cellular atypia, inflammation, and benignity showed good inter-observer agreement values (Table 3). Regarding the absence of atypia or malignancy, observers A and C showed almost perfect agreement ($k = 0.86$ and $k = 0.84$, respectively), and observer B showed moderate

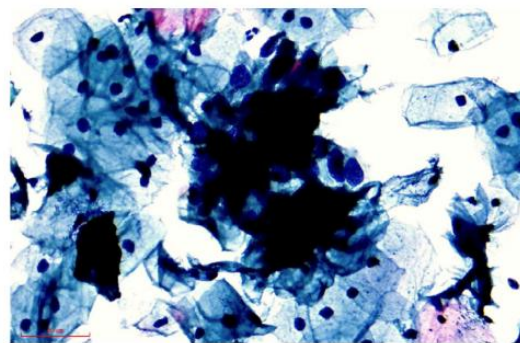


FIGURE 1 Liquid-based cytology. Intermediate squamous cells with basophilic cytoplasm and vesicular nucleus are observed. Immature squamous metaplastic cells with cytoplasmic processes, nuclei with regular borders, and finely granular chromatin are noted. Parabasal squamous cells at the center of the image exhibit enlarged, irregular nuclei and dense chromatin.

agreement ($k = 0.60$). A similar result was observed for low-grade intraepithelial lesions (LSIL). For atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), agreement ranged from 82.5% to 99%. Two specific digital cases were diagnosed as ASC-H by the 3 evaluators (Figures 1 and 2); however, by physical slide, it had been diagnosed as LSIL. To check if the image resolution could affect the diagnosis, additional scanning for this particular case was performed with 40 $\times$ magnification and redistributed for analysis; the case was diagnosed as LSIL using a digital slide by all 3, underscoring the need for high magnification scanning for accurate analyses. Something similar happened with another case, which the evaluators diagnosed as ASCUS, but it was an LSIL case (Figure 3).

In the inflammatory process category (Table 3), Spearman's r (rs) test showed similar results for raters A, B, and C ($r = 0.474$, $r = 0.413$, and $r = 0.477$, respectively), showing a moderate strength of association between the digital analyzes compared to the gold standard.

3.4 | Intermodal discrepancy

Table 4 shows the result of selected cases that had any cellular atypia defined by physical slide analysis (gold standard) in relation to the result of analysis using the digital slide. Evaluator C was the one who most agreed regarding the NILM cases; on the other hand, he was the one who showed the greatest disagreement regarding the ASC-US.

3.5 | Diagnostic sensitivity using digital images

The performance of the evaluators to evaluate NILM showed high reproducibility and sensitivity in the digital slides, mainly for evaluators A (Sensitivity 95.8%; Specificity 98%; $pA^{ROC} = 0.000$) and C

TABLE 2 Overall diagnostic accuracy rate.

Category	Reference Standard	A (WSI)			B (WSI)			C (WSI)			P (A vs. B)
		No. (%)	No. (%)	P (A vs. B)	I.C.	No. (%)	P (A vs. B)	I.C.	No. (%)	P (A vs. B)	
Representative epithelia	Scaly	99 (100)	97 (98)	0.155	-	95 (96)	0.043	-	98 (99)	0.316	-
	Glandular	56 (56.5)	44 (44.4)	0.088	1.6 (0.8-2.9)	82 (82.8)	0	0.2 (0.1-0.5)	63 (63.6)	0.309	0.7 (0.4-1.3)
	Metaplastic	18 (18.2)	61 (61.6)	0	0.1 (0.06-0.2)	28 (28.3)	0.092	0.5 (0.2-1.1)	86 (86.9)	0	0.03 (0.01-0.07)
Cell Preservation	Well preserved	49 (49.5)	41 (41.4)	0.253	1.3 (0.7-2.5)	57 (57.6)	0.254	0.7 (0.3-1.3)	50 (50.5)	0.886	0.9 (0.5-1.7)
	Poorly preserved	54 (54.5)	19 (19.2)	0	5 (2.5-10.1)	82 (82.8)	0	0.2 (0.1-0.4)	14 (14.1)		
	Repair	1 (1)	42 (42.4)	0	0.01 (0-0.08)	2 (2)	0.560	0.49 (0-9.6)	2 (2)	0.560	0.49 (0-9.6)
Microbiology	Bacilos	67 (67.7)	3 (3)	0	67 (1.5-350)	81 (81.8)	0.022	0.4 (0.2-0.9)	60 (60.6)	0.299	1.3 (0.7-2.5)
	Candida	53 (67.7)	39 (39.4)	0.046	1.7 (0.9-3.2)	46 (46.5)	0.319	1.3 (0.7-2.4)	50 (50.5)	0.339	1.1 (0.6-2)
	Cocos	65 (65.6)	10 (10.1)	0	17 (7.4-40.8)	79 (79.8)	0.025	0.4 (0.2-0.9)	60 (60.6)	0.461	1.2 (0.6-2.3)
	Gardnerella	18 (18.2)	77 (77.7)	0	0.06 (0.02-0.1)	26 (26.3)	0.171	0.6 (0.2-1.2)	22 (22.2)	0.478	0.7 (0.3-1.6)
	Lactobacillus	37 (37.4)	1 (1)	0	58.4 (9.2-2395)	3 (3)	0	19 (5.6-100)	17 (17.2)	0.001	2.8 (1.4-5.9)
Cell Atypia	NILM	50 (50.5)	48 (48.5)	0.661	0.8 (0.4-1.6)	40 (40.4)	0.149	1.5 (0.8-2.7)	55 (55.5)	0.319	1.3 (0.7-2.4)
	ASC-US	0 (0)	1 (1)	0.303	-	17 (17.2)	0.000	-	14 (14.1)	0.000	-
	LSIL	37 (37.4)	34 (34.3)	0.906	0.9 (0.5-1.8)	27 (27.3)	0.141	0.6 (0.3-1.2)	26 (26.3)	0.093	0.5 (0.3-1.1)
	ASC-H	6 (6.1)	3 (3)	0.353	0.5 (0.08-2.5)	1 (1)	0.056	0.1 (0.003-1.3)	1 (1)	0.054	0.1 (0.003-1.3)
	HSIL	6 (6.1)	5 (5)	0.838	0.8 (0.2-3.6)	1 (1)	0.976	0.9 (0.01-7.6)	0 (0)	0.303	-
Screening Characterization	Atrophic	0 (0)	1 (1)	0.316	-	1 (1)	0.316	-	0 (0)	-	-
	Eutrophic	40 (40.4)	87 (87.9)	0	0.09 (0.04-0.2)	11 (11.1)	0	5.4 (2.4-12.5)	53 (53.5)	0.064	0.5 (0.3-1)
	Hypotrophic	0 (0)	2 (2)	0.155	-	1 (1)	0.316	-	3 (3)	0.082	-

Abbreviations: ASC-H, Squamous Cell Atypia, high-grade lesion cannot be ruled out; ASC-US, Atypias of Undetermined Meaning in Squamous Cells; HSIL, High Grade Intraepithelial Lesion; LSIL, Low-grade squamous intraepithelial lesion; NILM, Negative for Intraepithelial Lesion and Malignancy.

*p < .05.

TABLE 3 Intraobserver agreement (Kappa and Spearman) as per specimen subtypes: optical microscopy versus whole-slide imaging.

Category	A (WSI)					B (WSI)					C (WSI)				
	Agreement		p*		Spearman	Agreement		p*		Spearman	Agreement		p*		Spearman
	No. (%)	Kappa	p*	(Kappa)		No. (%)	Kappa	p*	(Kappa)		No. (%)	Kappa	p*	(Kappa)	
Representative Epithelia	Squamous	98	-	0	-	97.9	-	-	-	-	100	-	-	-	-
	Glandular	69.4	0.397	0	0.409	59.8	0.114	0.156	0.144	0.159	48.6	0.358	0	0.354	0
	Metaplastic	48	0.099	0.132	0.135	74.2	0.294	0.030	0.305	0.002	29.3	0.038	0.293	0.106	0.298
Cell Types	Intermediate scaly	60.7	-0.271	-0.27	0.0043	44.8	-0.001	0.989	0.128	0.212	22.5	0.001	0.955	0.059	0.564
	Parabasal	66	0.302	0.302	0.302	91.7	-	-	-	-	40.9	-0.003	0.979	-0.002	0.988
	Superficial	-	-	-0.055	0.602	58.4	0.021	0.689	0.059	0.568	52	-0.056	0.134	-0.12	0.238
	Immature scaly	37.2	0.098	0.137	0.227	70.5	0.211	0.065	0.258	0.067	17.6	0.015	0.506	0.088	0.514
Cell Preservation	Well preserved	69.8	0.054	0.716	0.055	72.4	0.095	0.210	0.175	0.218	57.9	-0.091	0.411	-0.102	0.45
	Poorly preserved	34.9	-0.067	0.274	-0.167	0.285	92.2	-	-0.666	-	17.6	-0.019	0.513	-0.087	0.521
	Repair	100	-	-	-	98.2	-	-	-	-	96.5	-0.018	0.893	-0.018	0.895
Microbiology	Bacillos	73.5	0.021	0.744	0.035	0.748	-0.248	0.013	-0.263	0.013	55	0.183	0.029	0.229	0.029
	Candida	80	0.606	0	0.627	0	0.513	0	0.514	0	86.7	0.729	0	0.732	0
	Coccos	62.3	-0.071	0.498	-0.074	0.504	-0.222	0.03	-0.232	0.03	54.4	0.18	0.031	0.227	0.031
	Gardnerella mobiluncus	40	0.117	0.021	0.25	0.021	0.113	0.068	0.195	0.069	81.8	0.4	0	0.397	0
	Lactobacillus	58.8	-0.023	0.411	-0.089	0.417	-0.011	0.817	-0.025	0.819	57.8	0.051	0.58	0.058	0.585
Cell Atypia	NILM	93	0.869	0	0.862	0	0.598	0	0.603	0	91.9	0.838	0	0.841	0
	ASC-US	99	-	-	-	-	-	-	-	-	85.9	-	-	-	-
	LSIL	87	0.729	0	0.721	0	0.679	0	0.698	0	76.8	0.472	0	0.488	0
	ASC-H	91	-0.042	0.657	-0.044	0.661	-0.188	0.797	-0.026	0.8	94.1	0.273	0	0.398	0
	HSIL	91	0.176	0.135	0.135	0.18	0.322	0	-0.024	0	100	-	-	-	-
Screening Characterization	Atrophic	99	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-
	Eutrophic	46	0.063	0.258	0.113	0.263	0.022	0.763	0.031	0.766	60.6	0.223	0.022	0.231	0.022
	Hypertrophic	98	-	-	-	-	1	-	-	-	97	-	-	-	-
Inflammation	Inflammatory process	52.6	0.296	0	0.474	0	0.224	0.001	0.413	0	30.4	0.167	0.001	0.477	0

Abbreviations: ASC-H, Squamous Cell Atypia, high-grade lesion cannot be ruled out; ASC-US, Atypias of Undetermined Meaning in Squamous Cells; HSIL, High Grade Intraepithelial Lesion; LSIL, Low-grade squamous intraepithelial lesion; NILM, Negative for Intraepithelial Lesion and Malignancy.

* $p < .05$.

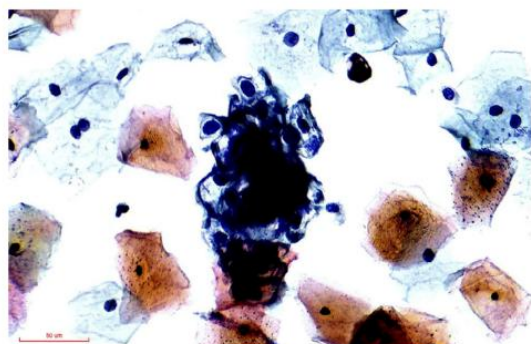


FIGURE 2 Liquid-based cytology. Superficial squamous cells with intracytoplasmic keratohyaline granules are observed. Intermediate squamous cells with basophilic cytoplasm reveal cocci and bacilli flora. Squamous cells in the center of the image exhibit an enlarged nucleus, irregular contours, dense chromatin, and a clear perinuclear halo. This case was initially diagnosed as LSIL but on digital imaging, as ASCUS.

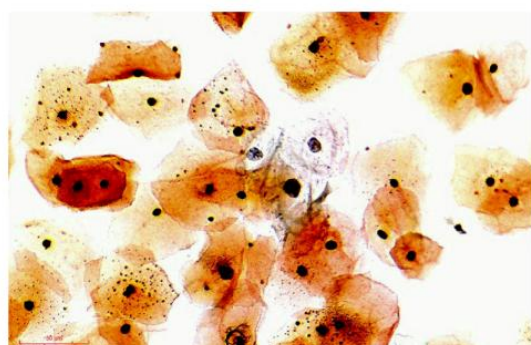


FIGURE 3 Liquid-based cytology. Superficial squamous cells are seen, with keratohyaline granules, slightly enlarged, regular nuclei, homogeneous chromatin, and a small clear perinuclear halo. This case was initially diagnosed as LSIL but on digital imaging, as ASCUS.

(Sensitivity 96%; Specificity 87.5%; $pC^{ROC} = 0.000$), as demonstrated by the ROC curves (Figure 4). Even with a lower sensitivity value than the others, rater B showed increased specificity compared to the other raters (Sensitivity = 70.6%; Specificity = 89.4%; $pB^{ROC} = 0.000$). It was not possible to state good reproducibility regarding cellular atypia diagnosed with a digital slide, as the p -value was not significant.

4 | DISCUSSION

Digital pathology is widely used in cancer research today.²¹ In recent years, an increasing number of pathology departments are started to use whole-slide imaging routinely in clinical diagnosis, with several studies from 2012 to the present confirming reliable diagnostic accuracy^{10,22–24}; however, most of these studies focus on surgical

pathology specimens rather than cytology slides.¹² Only a few studies have addressed digital pathology validation issues in cervicovaginal cytology preparations.¹⁵ Here we demonstrate good diagnostic reproducibility using digitized slides, with some limiting factors.

The diagnostic disagreement seen between the identification of bacteria (*Bacillus*, *Coccus*, and *Lactobacillus* sp.) can be explained by the digital appearance of the microorganisms on the slides. The most used scanner magnification is 20 $\times$ in many validation studies, which results in shorter scanning times and less storage¹⁰ space.^{21,25,26} We used the standard 20 $\times$ resolution for this study, and based on our results, a higher magnification would likely be needed to assess the cytological flora. Al-Janabi et al. suggested that *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, and *Giardia duodenalis* are often difficult to diagnose with <20 $\times$, and an additional 40 $\times$ would provide more accuracy and confidence.¹⁰ For our evaluators, it was difficult to distinguish between *Bacillus* and *Coccus*. In an interesting study by Borowsky et al., pathologists requested a 40 $\times$ magnification for some slides to be able to identify *H. pylori* in gastric biopsies.²² On the other hand, diagnostic agreement regarding *Candida* spp. and *Gardnerella/Mobiluncus* was hitherto better, probably due to the easy identification of these microorganisms.

The two-level system of low-grade SIL (LSIL) and high-grade SIL (HSIL) corresponds broadly to the carcinogenic potential of HPV and the degree of squamous lesions.²⁷ Regarding the disagreement between cases referred to as HSIL, it was observed that some regions of the slide had high cell density, and due to the limitation in adjusting the focus in the Z plane (up and down) of the digital image,^{28,29} the evaluators ended up suggesting that the cells indicated an unspecified dysplastic lesion and in 21 cases suggested the diagnosis of ASCUS. Other studies have already reported the difficulty of focusing on different axes (mainly the Z axis) using digital images.^{30,31} The scanner used in our study already has the possibility of scanning images in several z-planes; however, scan time and image storage size increase considerably, increasing scan time by more than 60%, making it difficult to establish z-plane images as a routine analysis. Of the problematic patterns on cytology slides, particularly in cases of SIL (LSIL and HSIL), elements of the lesion appearing against a background of atrophy can lead to a misinterpretation of ASC-H.³² As shown in one of the study cases, increased image resolution may favor a more sensitive analysis, giving the evaluator greater diagnostic confidence.

Diagnosis disagreement showed a significant difference in the ASCUS category. The ASCUS category is reserved for cases of atypical squamous cells where dysplasia cannot be established with certainty, such as evaluation of nucleoli, perinuclear halo, nucleoli overlap, binucleation, chromocenters, and many other features.³² Depending on qualitative and quantitative factors, doubtful cases may fall under the category of ASC (atypical squamous cell). We believe that the lack of confidence and nuclear details may have increased the diagnosis of ASCUS in our series. The frequency of ASCUS in the study was 0%, probably due to the random selection of cases with atypia from the sample bank; however, the frequency of diagnostic ASCUS in the reference laboratory used in the study is 3%, below the limit commonly reported under 5%.³³

TABLE 4 Overview of discrepant intermodality diagnoses rendered by pathologist A, B and C.

A (WSI)		NILM	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL	Total*
Reference Standard	NILM	46	0	0	0	0	50
	ASC-US	0	0	0	0	0	0
	LSIL	0	0	29	1	3	37
	ASC-H	0	0	3	0	0	6
	HSIL	0	1	2	1	1	6
	Total	46	1	34	2	4	
B (WSI)		NILM	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL	Total*
Reference Standard	NILM	35	5	0	0	0	50
	ASC-US	0	0	2	0	0	0
	LSIL	3	9	25	0	0	37
	ASC-H	2	0	1	0	1	6
	HSIL	0	0	6	0	0	6
	Total	40	14	35	0	1	
C (WSI)		NILM	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL	Total*
Reference Standard	NILM	49	0	0	0	0	50
	ASC-US	0	0	0	0	0	0
	LSIL	0	12	20	0	0	37
	ASC-H	3	1	3	1	0	6
	HSIL	3	1	3	1	0	6
	Total	55	14	26	2	0	

Note: The diagonal values are the concordance between the evaluator's diagnosis and the gold standard. The brown color indicates only the diagonal values which are the common values for digital analysis and physical analysis.

*The difference between the number of cases and the diagnosis is due to the cases classified as not evaluated (N.E.).

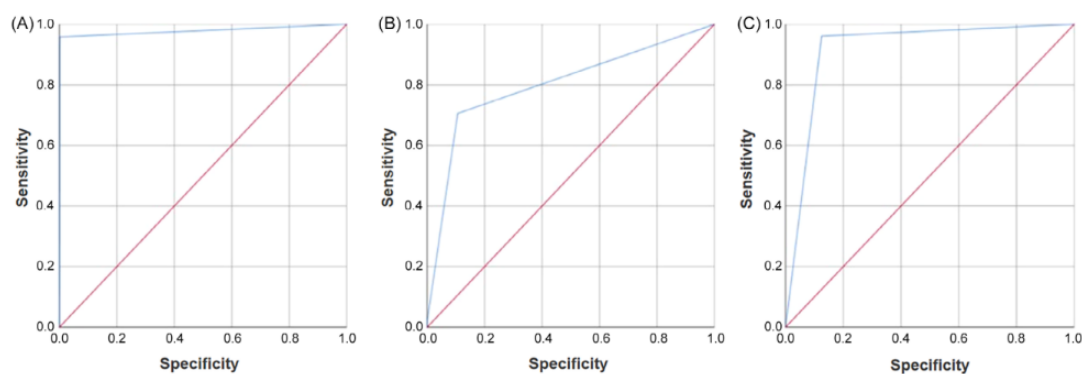


FIGURE 4 Receiver operating characteristics (ROC) for Negative Intraepithelial Lesion and Malignancy (NILM). ROC curves demonstrate the level of assessment sensitivity for NILM on digital slides. A = ROC curve of evaluator A; B = ROC curve of evaluator B; C = ROC curve of evaluator C. For all curves, a p -value $< .05$ was reached.

Digital pathology using WSI still faces several limiting factors. Higher implementation cost, slide scanning time, and storage space are some of the most prominent examples. In addition, user experience with digital imaging may affect the diagnosis result, thus requiring professionals to become more familiar with the technology. On the other hand, WSI has many advantages, such as the possibility of consulting cases simultaneously (via real-time visualization) and can serve as a platform for the use of Artificial Intelligence (AI). Even though most current machine learning application efforts in pathology have focused mainly on histopathology, several studies point to the promising use of AI in cytopathology.^{34,35} Although there is already several AI software applied to cytopathology, most focus on screening and sample quality,³⁶ there are already works focused on the use of AI for direct analysis of cellular atypia in cytopathology samples,^{35,37} and these algorithms can even predict histopathological results using only cytology images.³⁸ In addition, AI could be used to act in the faster detection of HPV, directing patients to immediate treatment.³⁹

Studies have shown that using a microscope to interpret and score stained samples is labor-intensive and a highly visual and subjective process.^{40–42} In this way, digital pathology, combined with artificial intelligence, can be a valuable tool for optimizing the reading process and cervicovaginal cytology slides and increasing diagnostic accuracy.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Guilherme de Velozo: was responsible for image analyses, data entry, drafted manuscript, and review results. **Juliana Cordeiro:** was responsible for study design, reviewed results review, and draft review. **Jefferson Sousa:** was responsible for slide review and data entry. **Ana Cláudia Holanda:** was responsible for slide review and data entry. **Giovanni Pessoa:** was responsible for slide review and data entry. **Fábio Távora:** was the project advisor and reviewed the final manuscript.

FUNDING INFORMATION

The authors funded the research with their resources.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

We have no conflicts of interest to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data Availability Statement: Raw data were generated at Laboratory Argos Pathology. Derived data supporting the findings of this study are available from the corresponding author GSV on request.

ORCID

Guilherme de Velozo  <https://orcid.org/0009-0001-8959-1526>

REFERENCES

- Colpani V, Falcetta FS, Bidinotto AB, et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2020;15(2):e0229154.
- Papanicolaou G. Sex determination and sex control in Guinea-pigs. *Science*. 1979;41(1054):401-404.
- Buechler EJ. Pap tests and HPV infection. *Postgrad Med*. 2005;118(2):37-46.
- Eun TJ, Perkins RB. Screening for cervical cancer. *Med Clin North Am*. 2020;104(6):1063-1078.
- Bakouny Z, Paciotti M, Schmidt AL, Lipsitz SR, Choueiri TK, Trinh QD. Cancer screening tests and cancer diagnoses during the COVID-19 pandemic. *JAMA Oncol*. 2021;7(3):458-460.
- Chain K, Legesse T, Heath JE, Staats PN. Digital image-assisted quantitative nuclear analysis improves diagnostic accuracy of thyroid fine-needle aspiration cytology. *Cancer Cytopathol*. 2019;127(8):501-513.
- Kim D, Burkhardt R, Alperstein SA, et al. Evaluating the role of Z-stack to improve the morphologic evaluation of urine cytology whole slide images for high-grade urothelial carcinoma: results and review of a pilot study. *Cancer Cytopathol*. 2022;130(8):630-639.
- Weinstein RS. Prospects for telepathology. *Hum Pathol*. 1986;17(5):433-434.
- Hanna MG, Ardon O, Reuter VE, et al. Integrating digital pathology into clinical practice. *Mod Pathol*. 2022;35(2):152-164.
- Al-Janabi S, Huisman A, Van Diest PJ. Digital pathology: current status and future perspectives. *Histopathology*. 2012;61(1):1-9.
- Evans AJ, Brown RW, Bui MM, et al. Validating whole slide imaging systems for diagnostic purposes in pathology guideline update from the college of American pathologists in collaboration with the American society for clinical pathology and the association for pathology informatics. *Arch Pathol Lab Med*. 2022;146(4):440-450.
- Ordi J, Castillo P, Saco A, et al. Validation of whole slide imaging in the primary diagnosis of gynaecological pathology in a university hospital. *J Clin Pathol*. 2015;68(1):33-39.
- Snead DRJ, Tsang Y, Meskiri A, et al. Validation of digital pathology imaging for primary histopathological diagnosis. *Histopathology*. 2016;68(7):1063-1072.
- Jahn SW, Plass M, Moirand F. Digital pathology: advantages, limitations and emerging perspectives. *J Clin Med*. 2020;9(11):3697.
- Piccione J, Baker K. Veterinary clinics of North America: Small animal practice. *Digital Cytology*. 2023;53(1):73-87.
- Donnelly AD, Mukherjee MS, Lyden ER, et al. Optimal z-axis scanning parameters for gynecologic cytology specimens. *J Pathol Inform*. 2013;4(1):38.
- Hanna MG, Monaco SE, Cuda J, Xing J, Ahmed I, Pantanowitz L. Comparison of glass slides and various digital-slide modalities for cytopathology screening and interpretation. *Cancer Cytopathol*. 2017;125(9):701-709.
- Khalbuss WE, Pantanowitz L, Parwani AV. Digital Imaging in Cytopathology. *Patholog Res Int*. 2011;19(2011):1-10.
- Nayar R, Wilbur DC. The pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol*. 2015;123(5):271-281.
- Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas*. 1960;20(1):37-46.
- Ibrahim A, Gamble P, Jaroensri R, et al. Artificial intelligence in digital breast pathology: Techniques and applications. *The Breast*. 2020;49:267-273.
- Borowsky AD, Glassy EF, Wallace WD, et al. Digital whole slide imaging compared with light microscopy for primary diagnosis in surgical pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2020;144(10):1245-1253.
- Mukhopadhyay S, Feldman MD, Abels E, et al. Whole Slide Imaging Versus Microscopy for Primary Diagnosis in Surgical Pathology. *Am j surg pathol*. 2018;42(1):39-52.
- Samuelson MI, Chen SJ, Boukhar SA, et al. Rapid validation of whole-slide imaging for primary histopathology diagnosis. *Am J Clin Pathol*. 2021;155(5):638-648.
- Rakha EA, Aleskandarani M, Toss MS, et al. Breast cancer histologic grading using digital microscopy: concordance and outcome association. *J Clin Pathol*. 2018;71(8):680-686.

26. Rakha EA, Vougas K, Tan PH. Digital Technology in Diagnostic Breast Pathology and Immunohistochemistry. *Pathobiology*. 2022;89(5):334-342.
27. Clifford GM, Tully S, Franceschi S. Carcinogenicity of human papillomavirus (HPV) Types in HIV-positive women: a meta-analysis from HPV infection to cervical cancer. *Clin Infect Dis*. 2017;64(9):1228-1235.
28. Pantanowitz L, Sinard JH, Henricks WH, et al. Validating whole slide imaging for diagnostic purposes in pathology: guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(12):1710-1722.
29. Shi W, Georgiou P, Akram A, et al. Diagnostic pitfalls of digital microscopy versus light microscopy in gastrointestinal pathology: a systematic review. *Cureus*. 2021;13:e17116.
30. Khurana KK. Telecytology and its evolving role in cytopathology. *Diagn Cytopathol*. 2012;40(6):498-502.
31. Thrall M, Pantanowitz L, Khalbuss W. Telecytology: clinical applications, current challenges, and future benefits. *J Pathol Inform*. 2011;2(1):51.
32. Alrajjal A, Pansare V, Choudhury MSR, Khan MYA, Shidham VB. Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of uterine cervix and Bethesda system. *Cytojournal*. 2021;17(18):16.
33. Baena A, Agudelo MC, Lopez C, et al. Comparison of immediate colposcopy, repeat conventional cytology and high-risk human papillomavirus testing for the clinical management of atypical squamous cells of undetermined significance cytology in routine health services of Medellin, Colombia: The <scp>ASCUS-COL</scp> trial. *Int J Cancer*. 2021;148(6):1394-1407.
34. Alrafiah AR. Application and performance of artificial intelligence technology in cytopathology. *Acta Histochem*. 2022;124(4):151890.
35. Landau MS, Pantanowitz L. Artificial intelligence in cytopathology: a review of the literature and overview of commercial landscape. *J Am Soc Cytopathol*. 2019;8(4):230-241.
36. McAlpine ED, Pantanowitz L, Michelow PM. Challenges developing deep learning algorithms in cytology. *Acta Cytol*. 2021;65(4):301-309.
37. Sanghvi AB, Allen EZ, Callenberg KM, Pantanowitz L. Performance of an artificial intelligence algorithm for reporting urine cytopathology. *Cancer Cytopathol*. 2019;127(10):658-666.
38. Liu Y, Jin S, Shen Q, et al. A deep learning system to predict the histopathological results from urine Cytopathological images. *Front Oncol*. 2022;24:12.
39. Bedell SL, Goldstein LS, Goldstein AR, Goldstein AT. Cervical cancer screening: past, present, and future. *Sex Med Rev*. 2020;8(1):28-37.
40. Al-Kofahi Y, Lassoued W, Grama K, et al. Cell-based quantification of molecular biomarkers in histopathology specimens. *Histopathology*. 2011;59(1):40-54.
41. Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, et al. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn Pathol*. 2012;7(1):42.
42. Rizzardi AE, Zhang X, Vogel RI, et al. Quantitative comparison and reproducibility of pathologist scoring and digital image analysis of estrogen receptor β 2 immunohistochemistry in prostate cancer. *Diagn Pathol*. 2016;11(1):63.

How to cite this article: de Velozo G, Cordeiro J, Sousa J, et al. Comparison of glass and digital slides for cervical cytopathology screening and interpretation. *Diagnostic Cytopathology*. 2023;1-9. doi:10.1002/dc.25209