



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GSK3- β , DO PD-L1, E DO INFILTRADO
LINFOCÍTICO CD8-POSITIVO EM CARCINOMAS UROTELIAIS PRIMÁRIOS DA
BEXIGA**

FORTALEZA-CE

2022

ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GSK3- β , DO PD-L1, E DO INFILTRADO
LINFOCÍTICO CD8-POSITIVO EM CARCINOMAS UROTELIAIS PRIMÁRIOS DA
BEXIGA**

Dissertação de mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-Graduação
em Patologia, da Universidade Federal do
Ceará, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de Concentração: Patologia; Área
temática: Oncologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes
Távora.

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de
Barros Silva.

FORTALEZA-CE

2022

ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GSK3- β , DO PD-L1, E DO INFILTRADO
LINFOCÍTICO CD8-POSITIVO EM CARCINOMAS UROTELIAIS PRIMÁRIOS DA
BEXIGA**

Aprovada em: 01/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Simone Teixeira Bonecker dos Santos
Instituto Nacional de Câncer

Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva
Instituto do Câncer do Ceará

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)

A444a Almeida Rodrigues Monteiro, Aline Kimberly.

Avaliação da expressão do GSK3-B, do PD-L1, e do infiltrado linfocítico CD8-positivo em carcinomas uroteliais primários da bexiga : Avaliação da expressão do GSK3-B, do PD-L1, e do infiltrado linfocítico CD8-positivo em carcinomas uroteliais primários da bexiga / Aline Kimberly Almeida Rodrigues Monteiro. – 2022.

138 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora.

Coorientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.

1. Câncer de bexiga. 2. GSK-3B. 3. PD-L1. 4. CD8. 5. Patologia digital. I. Título.

CDD 571.9

Dedico esse trabalho a **DEUS** que sempre esteve comigo, direcionando e iluminando meus caminhos.

A minha **família** que sempre esteve comigo em todas etapas torcendo e vibrando em cada degrau da minha vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata a **Deus** por tudo que ele fez por mim, por estar presente em cada momento da minha vida, me escutar e responder com toda delicadeza de sempre. Agradeço demais pela atenção e cuidado.

Agradeço demais ao meu marido **Jessé**, que sempre me apoiou, sorriu e chorou comigo em toda minha trajetória. Por me apoiar em cada nova etapa que eu queira trilhar e sempre ser meu ponto de luz, calma, paciência e terapia (Principalmente em viagens de moto). Obrigada por tudo!

Aos meus familiares, **Marlúcia (mãe), Tiago (irmão), Raylane (Cunhada), Moisés (Tio), Tácito (Tio), Plinio Angelo (Tio), Vô Raimunda, Vó Plinio, Zeneide (Sogra) e Seu Lopes (Sogro)** que sempre me apoiaram e foram ouvintes de minhas angustias, sempre fornecendo os melhores conselhos. Sou eternamente grata a todo carinho, cuidado, amor, atenção e torcida que sempre vocês fazem em cada conquista.

Ao **Dr. Fábio** que acreditou e confiou em mim, orientando sempre em pesquisa científica e no âmbito profissional. Agradeço pela dedicação e cuidadosa orientação, por sempre tentar extrair o melhor de mim.

Ao **Dr. Paulo Goberlânio** que sempre tem paciência para explicar a mesma coisa várias vezes, disponibilizando ajudar com o que precisasse, análises estatísticas, correções. Parabéns pelo Profissional e ser humano que você é. Muito obrigada!

Ao **Laboratório de Argos e toda equipe** por fornecer todo suporte técnico, científico e pela contribuição no desenvolvimento desse estudo.

Aos **pacientes e familiares** participantes do estudo pela atenção em ligação e passar os feedbacks sempre quando solicitados.

Ao **Dr. Vladmir** que sempre esteve a postos em ajudar, viabilizando a coleta de dados em diferentes Unidades Hospitalares.

Aos **participantes da banca** pela atenção, presteza e contribuições valiosas.

Dra. Isabelle Joyce, Dr. Bruno, Dra. Valeska, Enf. Samara, Dra. Claudia, Dr.

Majuh, Mrs. Fernanda, Dra. Clarisse, Dr. Neto, Dra. Amanda, Dr. Gabriel, Mateus, Anderson, Vivia, Thuany, Marcela. Aos meus amigos e família de trabalho que não tenho palavras para expressar o quanto vocês são e foram importantes nessa trajetória, sempre animam e iluminam os meus dias ou de qualquer um que chegue para trabalhar. Quero que saibam que em minha vida profissional quero ser um terço do que vocês são, com excelente padrão de excelência, humana e espiritual.

RESUMO

Introdução: O câncer de bexiga (CB) ocupa a nona posição de neoplasia maligna mais comum no mundo, sendo mais incidente no sexo masculino. Considerando a importância do diagnóstico personalizado, específico para o tratamento do CB, é primordial avaliar correlações do comportamento do infiltrado imunológico e a presença dos biomarcadores prognósticos e preditivos. O uso da patologia digital no diagnóstico do CB é importante devido à utilização de ferramentas digitais que permitem uma análise mais minuciosa, melhorando a qualidade e eficiência no diagnóstico. O crescimento da patologia digital e imagens de lâminas inteiras criaram a oportunidade de extrair mais informações de amostras histológicas por meio de análise de imagens. **Objetivo:** Avaliar a imunopressão dos marcadores GSK3- β e PD-L1 em carcinoma urotelial, e do infiltrado linfocítico CD8-positivo, correlacionando com o grau tumoral e com a sobrevida global. **Metodologia:** estudo observacional, transversal e retrospectivo, onde foram incluídos 140 casos consecutivos de um serviço de referência. Após confirmação da análise histológica, as amostras foram destinadas a construção do *Tissue Microarray* (TMA) e submetidas a reação de imunohistoquímica com os marcadores GSK-3 β (clone 27C10), CD8 (m7103) e PDL-1 (22c3) na formatação manual e/ou automatizada das plataformas Roche e Dako. As marcações foram avaliadas por dois patologistas de forma cega, e pelo software de código aberto denominado Qupath®. Os parâmetros de análises para CD8 foram a presença de células positivas por mm²; GSK3 foi avaliada a intensidade e a porcentagem de marcação para cálculo do H-score e PD-L1 foi utilizado análise do escore de proporção tumoral (TPS) 0-100. **Resultados:** As 140 amostras foram oriundas de ressecção transuretral ou de cistectomia total (88%), sendo mais predominante o sexo masculino (77,9%), onde a maioria possuía pelo menos 70 anos (66,4%). O perfil de imunopressão de GSK-3 β (91%) foi predominante na maioria das amostras. PD-L1 foi positivo em 62,9% dos casos, e as células CD8-positivas tiveram a densidade de 0 a 538 células/mm². Os dados mostraram correlações significativas entre GSK-3 β e PD-L1 ($p=0,033$) e CD8 e PD-L1 ($p<0,002$). O uso do software de patologia digital mostrou forte correlação com o grau tumoral feita pelo patologista e pelo Qupath (Kappa concordância de 0,73) e parâmetro de correlação de interclasse (CCI) de 0,851. A positividade de PD-L1 teve o risco de 5,81 vezes de recorrência e tumores de alto grau aumentou o risco de recorrência. **Conclusão:** Esses dados inferem que apesar da heterogeneidade tumoral e do microambiente, a expressão dos biomarcadores GSK-3 β , PD-L1 e CD8, mostraram ser promissores frente a abordagem terapêutica do câncer urotelial quando avaliado a presença do infiltrado

imunológico (CD8) e a imunexpressão dos marcadores GSK-3 β e PD-L1. O uso do QuPath como ferramenta automatizada de escore pode ser empregada como validação de análise e leitura dos biomarcadores PD-L1 e CD8.

Palavras chave: Neoplasia da Bexiga Urinária, Bloqueadores de Checkpoint imunológico e Imunoterapia.

ABSTRACT

Introduction: Bladder cancer is the ninth most common neoplasm in the world, being malignant more frequent in males. Considering the importance of personalized diagnosis and treatment for bladder cancer, it may be relevant to evaluate correlations between the clinical behavior with the immune infiltrates and other predictive biomarkers. The use of digital pathology in the diagnosis of BC is important due to the use of digital tools that allow a more detailed analysis, improving the quality and efficiency of the diagnosis. The growth of digital pathology and whole slide imaging have created the opportunity to extract more information from histological samples through image analysis **Objective:** To evaluate the immunoexpression of markers GSK3- β , PD-L1 and CD8 positive cell density in urothelial carcinoma correlating with tumor grade and overall survival. **Methodology:** This is a retrospective, cross-sectional, observational study. 140 consecutive cases from a referral service were included. After confirmation of the histological diagnosis, the samples were used in the construction of the Tissue Microarray (TMA) and submitted to immunohistochemistry reactions with the markers GSK-3 β (clone 27C10), CD8 (m7103) and PDL-1 (22c3) in the manual and/or automated use of the Roche and Dako platforms. The expression were evaluated by two pathologists blindly, and by the open source software called Qupath®. The analysis parameters for CD8 were the presence of positive cells per mm²; GSK3 was evaluated for intensity and percentage of staining to calculate the H-score and PD-L1 was used for analysis of the tumor proportion score (TPS) 0-100. **Results:** Of 140 samples from the of transurethral resection or total cystectomies (88%), the male sex was predominant (77.9%), patients were older 70 years (66.4%). Immunoexpression of GSK-3 β (91%) was present in most cases, as well as PD-L1 (62.9%). The CD8 cell density ranged from 0 to 538 cells/mm². (p00 data-correlations,0002 between PD-L1 and PD-L1). The use of digital pathology software showed excellent correlation with the tumor grade made by the pathologist and by Qupath (Kappa agreement of 0.73) and interclass correlation parameter (ICC) of 0.851. PD-L1 positivity had a 5.81-fold risk of recurrence and high-grade tumors increased the risk of recurrence by 9.09. **Conclusion:** These data infer that despite the tumor heterogeneity and the microenvironment, the expression of these biomarkers showed to be promising against the therapeutic approach of urothelial cancer when evaluated the presence of the immune infiltrate (CD8) and the

immunoexpression of the markers GSK-3 β and PD-L1. The use of QuPath as an automated scoring tool can be used to validate the analysis and reading of the PD-L1 and CD8 biomarkers.

Keywords: Urinary Bladder Neoplasms, Immune Checkpoint Blockers and Immunotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Cistectomia total.....	26
Figura 2 -	Imunoterapia anti-PD-1 e anti-PD-L1 / L2.....	32
Figura 3 -	Representação do GSK-3 α e GSK-3 β de mamífero.....	34
Figura 4 -	GSK3- β estabiliza / ativa (setas vermelhas) e desestabiliza / inativa (linhas azuis) vários fatores de transcrição, proteínas estruturais e funcionais	34
Figura 5 -	Expressão elevada de EGFR/PI3K/PDK1/AKT/GSK-3/mTORC1. Setas verdes indicam estimulação e as setas vermelhas bloqueadas indicam inibição.....	35
Figura 6 -	Vários ligantes na superfície celular estimulam a produção de PIP3 (fosfatidilinositol trifosfato) por PI3K	37
Figura 7 -	Distribuição do uso do Qupath no mundo.....	39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Tabela 1: Perfil clínico e histopatológico de pacientes com câncer de bexiga..... 85
- Tabela 2 - Influência de variáveis sociodemográficas na densidade celular CD8 positiva, imunexpressão de PD-L1 e GSK-3 β , tempo livre de recidiva e sobrevida global de pacientes com carcinoma urotelial de bexiga.....86
- Tabela 3 - Influência das modalidades terapêuticas na imunexpressão de GSK-3 β , tempo livre de recorrência e sobrevida global de pacientes com carcinoma urotelial de bexiga....87
- Tabela 4 - Influencia da densidade de linfócitos CD8-positivos e a imunexpressão de PDL1 na imunexpressão de GSK, tempo livre de recorrência e sobrevida global de pacientes com carcinoma urotelial.....88
- Tabela 5 - Análise multivariada dos fatores de risco de tempo livre de recidiva e sobrevida global em pacientes com carcinoma urotelial de bexiga..... 90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AKT - Oncogene Viral Homologo ao Timona do murino
- APC - Células apresentadoras de antígenos
- BCG - *Bacillus Calmette-Guerin*
- CB - Câncer de bexiga
- CBIM - Câncer de bexiga com invasão à camada muscular
- CD20 - *Cluster of differentiation 20* / grupamento de diferenciação 20
- CEC - Carcinoma de células escamosas
- CIS - Carcinoma *in situ*
- c-Jun – Famílias dos genes Jun
- c-myc - Oncogene mielocitomatose
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)
- eIF2B - *Eukaryotic Initiation Factor 2* / Fator de iniciação eucariótico 2
- FDA - *Food and Drug Administration*
- FoxP3 - Fator de transcrição *Forkhead box P3*
- GSK3 - Glicogênio sintase quinase
- H&E - Hematoxilina e eosina
- IFN- γ - Interferon gama
- IHQ - Imuno-histoquímica
- IL-2 - Interleucina 2
- INCA - Instituto Nacional do Câncer
- KRAS - Sarcoma do Vírus de Rato
- LTC - Linfócitos T citotóxicos.
- MAB - Anticorpo monoclonal
- MCL-1 - Regulador de apoptose MCL1
- MHC - Complexo de histocompatibilidade classe 1
- mTORC1 - Alvo mecanístico do complexo de rapamicina 1
- mm - Milímetro
- NFATe - Fator nuclear de ativação de células T
- NF- κ B - Factor nuclear kappa B
- NK - Células matadoras naturais
- PD1 - Receptor de Morte Celular Programada 1

PD-L1 - Ligante do Receptor de Morte Celular Programada 1.

PD-L2 - Ligante do Receptor de Morte Celular Programada 2.

PI3K (PIK3CA) - Phosphoinositide-3 kinases

PIK - Phosphoinositide kinases

PTEN - Fosfatase homóloga à tensina

T CD4 - Grupamento de diferenciação 4

T CD8 - Grupamento de diferenciação 8

TNM - Classificação de Tumores Malignos

TMA - Microarranjo tecidual

TREGS - Células T reguladores

WNT - Família de integração MMTV tipo *Wingless*

β -TrCp - β - Proteína contendo repetição de β -transducina (β -TrCP)

Sumário

1. Introdução Geral	23
1.1 Epidemiologia do Câncer de Bexiga	23
1.2 Etiologia do Câncer de Bexiga.....	23
1.3 Histologia	26
1.4 Estadiamento patológico	27
1.5 Fatores prognósticos	27
1.6 Abordagem terapêutica	28
1.7 Infiltrado imunológico	29
1.8 CD8	29
1.9 PD-L1	31
1.10 GSK3- β	33
1.11 Patologia digital	37
2. Justificativa	41
3. Objetivos	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4. Capítulos	43
4.1 Capítulo 01	44
4.2 Capítulo 02	70
5. Tabelas	85
Tabela 1: Perfil clínico e histopatológico de pacientes com câncer de bexiga	85
Tabela 2: Influência de variáveis sociodemográficas na densidade celular CD8 positiva, imunexpressão de PD-L1 e GSK-3 β , tempo livre de recidiva e sobrevida global de pacientes com carcinoma urotelial de bexiga	86
Tabela 3: Influência das modalidades terapêuticas na imunexpressão de GSK-3 β , tempo livre de recorrência e sobrevida global de pacientes com carcinoma urotelial de bexiga	87
Tabela 4: Influencia da densidade de linfócitos CD8-positivos e a imunexpressão de PDL1 na imunexpressão de GSK, tempo livre de recorrência e sobrevida global de pacientes com carcinoma urotelial	88
Tabela 5: Análise multivariada dos fatores de risco de tempo livre de recidiva e sobrevida global em pacientes com carcinoma urotelial de bexiga	90
6. Conclusão Geral	91
7. Referências	92
8. Anexos	102

ANEXO A: Parecer consubstanciado do CEP	102
ANEXO B: Classificação tumoral assistida por computador, validação da pontuação PD-L1 e quantificação da densidade de células imunes CD8-positivas em carcinoma urotelial, um guia visual para patologistas usando QuPath	105
ANEXO C: Expressão da densidade de células tumorais GSK3- β , PD-L1 e CD8 em carcinomas uroteliais, associação com o grau do tumor e sobrevida global....	117

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Epidemiologia do Câncer de Bexiga

O câncer de bexiga (CB) é uma neoplasia comum no trato genitourinário, e é o nono tipo de câncer mais frequente no mundo, com uma taxa anual de 430.000 novos casos. Esse tumor ocupa a 13^a posição entre os mais letais. O mesmo vem sendo descrito na literatura como um câncer predominante em nações desenvolvidas como América do Norte, Europa e partes da Ásia Ocidental, quando comparadas com regiões emergentes. Esta diferença é provavelmente decorrente da situação de industrialização de cada região (BRASIL, 2020; CUMBERBATCH et al., 2018; MALATS; REAL, REAL, 2015).

Para o triênio de 2020-2022 estima-se que, no Brasil, ocorram 10.640 novos casos por ano, sendo 7.590 entre os homens e 3.050 entre as mulheres, com maior prevalência entre 65 e os 74 anos. Nessa perspectiva, a taxa de mortalidade e de incidência possui variação decorrentes de diferentes fatores de riscos, metodologias de diagnósticos e tratamento utilizado (BRASIL, 2014).

Nos homens, o CB ocupa a sexta posição na Região Sudeste com 10,54/100 mil/habitantes Sul com 9,50/100 mil/habitantes, ocupa a sétima posição e região Centro-Oeste (4,84/100 mil/habitantes), o décimo mais frequente e mais demais regiões como Nordeste (3,45/100 mil/habitantes) e Norte (1,81/100 mil/habitantes), ocupa a décima primeira posição. Sendo assim, nas mulheres as Regiões do Sudeste (3,80/100 mil/habitantes) e Centro-Oeste (2,30/100 mil/habitantes) ocupam decima quarta posição; ficando na décima quinta posição Regiões do Sul (3,31/100 mil/habitantes), Nordeste (1,81/100 mil/habitantes) e Norte (0,69/100 mil/habitantes) (BRASIL, 2020).

Apesar da ausência de uniformidade das informações, alguns estudos apontam que o gênero masculino pode estar associado a maior risco de ocorrência da doença, bem como maior chance de progressão e maior taxa de mortalidade após o tratamento SCOSYREV et al., 2008.

1.2 Etiologia do câncer de bexiga

1.2.1. Uso de tabaco

O tabagismo está intimamente associado a diversos cânceres, como pulmão, boca, esôfago, atuando também de forma intensa no câncer de bexiga. Vários estudos epidemiológicos ressaltaram que os indivíduos que fazem uso constante de cigarro aumentam três vezes mais a probabilidade de desenvolver esse tipo de câncer (BRENNAN et al., 2000; FARLING, 2017; LETAŠIOVÁ et al., 2012).

Os mecanismos específicos do uso do tabaco associado ao desenvolvimento do câncer de bexiga não estão bem delimitados na literatura. Contudo, alguns estudos propõem que sejam devido ao uso de diversas substâncias químicas, como 2-naftilamina e 4-aminobifenil. Pacientes que fazem o uso recorrente de tais produtos obtêm uma proliferação celular exacerbada acarretando uma hiperplasia do epitélio da bexiga (ZEEGERS et al., 2004).

Para Zeegers et al., 2004, em um estudo de caso e controle, foi avaliado o risco de desenvolver o CB com variação conforme o tipo de fumo com composição variada de substâncias químicas, podendo ser o fumo puro, cachimbo ou charuto puro, dentre outros.

1.2.2. Substâncias químicas

Substâncias como aminas aromáticas (4-aminobifenil), benzinhas, analgésicos fenacetinas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e hidrocarbonetos clorados, estes são usados nas indústrias químicas e na fabricação do cigarro. Vale ressaltar que a exposição ocupacional necessita longo prazo para levar o acúmulo no organismo, podendo-se estender por mais de 30 anos (POMPEO, CARRERETTE, GLINA et al., 2006).

Essas substâncias são frequentemente usadas nas indústrias têxtil, indústrias de plásticos, impressão e borracha, sendo um risco bastante elevado aos indivíduos que manipulam diariamente em suas atividades laborais, como indivíduos de outras indústrias como bombeiros, cabelereiros e fungicidas se enquadram neste grupo de riscos, seguido de 18% de casos expostos em atividades ocupacionais (FARLING, 2017).

Estudos observacionais feitos no Chile e na Finlândia sugeriram que exposições em níveis variados ao arsênio em todo o meio ambiente acarretam no desenvolvimento do câncer, no entanto, outros carcinógenos presentes na água,

produtos de desinfecção ou nitratos, metais presentes na dieta, como selênio e zinco podem também desencadear o CB (MARSHALL et al., 2007; MELIKER; NRIAGU, 2007).

1.2.3. Agentes infecciosos

Infecções causadas pelo *Sehistosoma Haematobium* são agentes etiológicos que estão associado a esquistossomose no aparelho urinário desencadeiam o câncer de bexiga, relatados em várias áreas endêmicas de países ocidentais (ANTONI et al., 2017). Os mecanismos patológicos de desenvolvimento da neoplasia ainda não estão bem esclarecidos na literatura, mas acredita-se que compostos à base de *N-nitroso*, formado após uma infecção por bactérias redutoras de nitrato seguidos de cistite em uma atividade carcinogênica (JUNG; MESSING, 2000; POMPEO ACL, CARRERETTE FB, GLINA S et al., 2006).

O mecanismo de infecção do parasita citado permite a instalação de uma inflamação crônica, acompanhada de uma irritação na bexiga e a presença de ovos lançados pelo parasita originam liberação de fatores genotóxicos, a instabilidade genômica, modificação na regulação dos genes supressores e oncogenes, indução da resposta proliferativa nas células hospedeiras acarretando na reparação na inflamação causada (CHALA et al., 2017).

Em pesquisas recentes, foi possível avaliar riscos relativos e prevalência específica de infecções do *S. Haematobium* em várias regiões da África. Esses estudos mostraram uma prevalência de 33% na África Ocidental e 11% na África Austral e tais taxas mostraram-se constantes entre os 10 anos anteriores (OH, JIN-KYOUNG; WEIDERPASS, 2014; PARKIN et al., 2020).

1.2.4. Radiação

O risco de desencadear CB é proporcional às doses de radiações fornecidas, pois há formação de radicais livres que acarretam mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA), como por exemplo, a radioterapia pélvica (JUNG; MESSING, 2000; POMPEO ACL, CARRERETTE FB, GLINA S et al., 2006).

Dessa forma, quando os pacientes se submetem à radioterapia devido a cânceres geniturinários e ginecológicos, como câncer cervical, pélvico, próstata aumenta considerável o risco de desencadear o CB, mas decorrente dos avanços na terapia por radiação espera-se que diminuam essas chances (FARLING, 2017).

1.3 Histologia

O subtipo histológico do câncer de bexiga mais frequente é o carcinoma urotelial, que corresponde a 90% dos casos, seguido pelo carcinoma de células escamosas (CCE) (Figura 01). Estas incidências variam conforme áreas geográficas distintas, como no Mediterrâneo que possui elevada incidência de CCE decorrente de acentuados índices de infecções crônicas da bexiga por *Schistosoma haematobium*, sendo mais prevalente em indivíduos com idade de 50 e 60 anos de idade, e associado a um prognóstico desfavorável (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020).

O carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma são menos frequentes, correspondendo 2% dos casos, estão associados ao estágio mais avançado e com maiores índices de mortalidade do que o carcinoma urotelial usual. O carcinoma de células escamosas atinge as células finas e planas do revestimento da bexiga, que são oriundas de um processo infeccioso ou irritação prolongada, enquanto o adenocarcinoma inicia nas células glandulares que podem aparecer com irritações locais ou infecções recorrentes (FARLING, 2017).

O carcinoma plano não invasivo também denominado como carcinoma *in situ* (CIS) é um tumor pouco diferenciado, restrito ao epitélio, sendo difícil visualizar por exames de imagem em decorrência a seu aspecto plano. São tumores pouco diferenciados, associado a um tumor primário da bexiga, ou secundários de cunho metastático do câncer de reto, estômago, ovário, próstata ou mama (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020; LOBO et al., 2017).



Figura 01: Cistectomia total é considerada a primeira opção de escolha para tumor de bexiga com invasão da camada muscular.

Fonte: Acervo do Biobanco do Instituto do Câncer do Ceará.

1.4 Estadiamento patológico

O câncer deve ser classificado conforme sua extensão, denominada estadiamento; este pode ser clínico ou patológico, sendo fundamental em caso de avaliar o grau de disseminação tumoral, permitindo ao oncologista definir um tratamento adequado (BRASIL, 2011).

A avaliação do estadiamento é direcionada pela “*American Joint Committee on Cancer and International Union Against Cancer*”, por meio da classificação dos tumores malignos. O sistema TNM destina-se à classificação de Tumores Malignos onde permite uma avaliação do tumor primário e sua capacidade de extensão local (T), característica dos linfonodos em sua cadeia linfática onde o tumor encontra-se localizado (N), avaliando também a presença de metástase (M), e assim, analisado as graduações nomeadas como T0 a T4; N0 a N3; e M0 a M1. Não obstante, a avaliação do tumor, é vista de forma holística, compreendendo desde a taxa do seu crescimento, extensão, localização, manifestações clínicas, características biológicas do paciente, tipo histológico, produção de substâncias, sexo e idade (BRASIL, 2011).

No estadiamento patológico do câncer de bexiga, a categoria pT1 corresponde aos casos que possuem apenas invasão na lâmina própria, pT2 é subdividida em pT2a quando ingressa até metade da camada muscular e pT2b até a parte externa da camada muscular; pT3a destina-se a invasão microscópica do tecido peri vesical e pT3b responde a invasão macroscópica. O estadiamento pT4a corresponde a casos que possuem uma invasão no estroma prostático, vesículas seminais, vagina ou útero, e pT4b estão os casos com invasão nas paredes pélvicas ou abdominais (EDGE, et al. 2010).

1.5 Fatores prognósticos

Avaliar o prognóstico do câncer de bexiga é primordial para predizer os riscos de recidiva ou óbito do indivíduo. Assim diversos cenários clínicos podem ser

avaliados, como a evolução do tumor, a presença de invasão linfovascular, tempo de recidiva pós tratamento, invasão prostática e presença de carcinoma *in situ* associado (TRAPP; MATTIELLO; NETO, 2018).

Por meio do estadiamento TNM é possível classificar se tumores invasivos vesicais podem levar a metástases, ou a recidivas pélvicas. As principais observações feitas correspondem à avaliação da profundidade de invasão da parede vesical, carcinoma *in situ* associado, variação histológica, graduação histológica, invasão linfovascular e a multicentricidade. Além disso, diversos outros fatores podem afetar o prognóstico, como o tipo e a localização tumoral, resposta ao tratamento e determinadas mutações genéticas (GLINA; BERNARDO, 2008).

O prognóstico para pacientes com câncer de bexiga superficial. No geral o Ta ou T1 raramente podem progredir para o óbito, porém o carcinoma *in situ* (Tis) está mais associado a agressividade; assim como o prognóstico para o carcinoma de células escamosas ou adenocarcinomas tendem a ser altamente infiltrativos e em muitas vezes detectados em estágio avançado (MARK, 2019).

1.6 Abordagem terapêutica

A abordagem terapêutica padrão para casos de invasão da camada muscular geralmente requer diante de uma estratégia mais agressiva, podendo ser terapia quimioterápica neoadjuvante seguida por cistectomia total, linfadenectomia pélvica estendida e desvio urinário, ou um protocolo de preservação da bexiga, como quimiorradiação ou cistectomia parcial, além do uso de uma terapia por radiação, com objetivo de reduzir o risco de metástase e mortalidade (PHAM; BALLAS, 2019). O tratamento de pacientes com doença avançada está passando por mudanças recentes, pois a imunoterapia com inibidores de *checkpoint*, terapias direcionadas e conjugados de anticorpo-droga se tornaram opções para certos pacientes, em vários estágios da doença (MARTINEZ RODRIGUEZ; BUISAN RUEDA; IBARZ, 2017).

Para o CB é realizada a terapia intravesical e o medicamento é administrado na bexiga por meio do cateter; o tratamento pode variar conforme os estágios de infiltração devido à disseminação tumoral na camada de revestimento da bexiga. Assim, a abordagem da imunoterapia intravesical induz o próprio sistema imunológico atacar as células cancerígenas, podendo ser terapia com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) sendo

uma bactéria associada à tuberculose, outra abordagem é a quimioterapia intravesical que pode ser administrado por via sistêmica como mitomicina, gencitabina e valrubicina (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020).

1.7 Infiltrado imunológico

O uso da imunoterapia recente mudou consideravelmente o panorama do tratamento do CB, acarretando resposta fidedigna e duradoura em alguns casos consistentes (RASKOV et al., 2021a). Diversas pesquisas avaliaram o microambiente tumoral e afirmam que o sistema imunológico pode estar implicado na patogênese de tumores uroteliais, resultando na predição de uma melhor resposta a imunoterapia, embora à ainda uma restrita minoria dos pacientes com câncer de bexiga (JIANG et al., 2020; SWEIS et al., 2016a).

Alguns estudos que investigam expressão de infiltrado imunológico verificaram, por meio de imunoistoquímica (IHQ), a presença de infiltrado de células T CD8+ e estas tiveram correlação com a expressão de PD-L1, além de outros biomarcadores preditivos como FOXP3 e Beta-catenina (SWEIS et al., 2016a).

A infiltração por células T reguladoras vem sendo relatada na literatura como um atuante nos efeitos antitumorais, mostrando forte presença em câncer de bexiga, câncer de pulmão e câncer de mama (WEINSTEIN et al., 2014).

A presença de células imunológicas que infiltram o tumor, como células T reguladore (Tregs), macrófagos, mastócitos e células B, podem afetar o equilíbrio da imunidade antitumoral e evasão imunológica em CB. Assim, as células T CD8+ são essenciais para o início e progressão tumoral (LIU et al., 2020; VESELY et al., 2011).

Liu et al., 2020, verificaram que a infiltração de células CD8 positivas foram correlacionadas com células pró-tumorais Th2, mastócitos, células NK antitumorais e macrófagos M1, constatando que essa abundância intratumoral de células CD8 é um marcador eficaz para prever a resposta ao tratamento com inibidor de *checkpoint* imunológico em pacientes com câncer de bexiga (LIU et al., 2020).

1.8 Células T CD8

As células T CD8 + citotóxicas são os principais agentes contra patógenos e contra células neoplásicas. As células T CD4 + desempenham papel importante no

controle tumoral local, promovendo ou inibindo uma resposta antitumoral (VAN DER LEUN; THOMMEN; SCHUMACHER, 2020). Dessa forma, a resposta imune é mediada pela atividade citotóxica, sendo um processo de indução da morte celular de células-alvo por meio de células citotóxicas efetoras, que consistem nas células NK e linfócitos T citotóxicos (LTC). As células T virgens diferenciam-se em células T citotóxicas CD8 por meio da ativação das células dendríticas maduras (FARHOOD; NAJAFI; MORTEZAEI, 2019).

As interações iniciais da ativação de células T iniciam quando começam a interagir com o complexo de histocompatibilidade classe 1 (MHC-1) na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs) e células-alvo, que resultam na produção de fragmentos de peptídeos antigênicos oriundos da degradação proteossômica de proteínas citoplasmáticas. Então, o complexo MHC-antígeno-peptídeo são reconhecidos pelas células CD8, que se ligam em uma APC ou célula-alvo e assim se movimentam desencadeando sinais biomecânicos que acarretam em papéis cruciais na ativação do receptor de células T (RCT), e posteriormente tradução desse sinal é emitido um sinal a co-estimulatório do co-receptor CD28 (DURGEAU et al., 2018; RASKOV et al., 2021b).

Diversas pesquisas inferem que os linfócitos T citotóxicos acarretam uma resposta imunomediada antineoplásica que contribui na eliminação tumoral, como mostrado por Nakano et al., (2001), que avaliaram elevados índices de CD8+ em carcinoma renal e carcinoma ovário, estabelecendo melhor compreensão da atividade antineoplásica de células efetoras na imunidade tumoral.

Deng et al., (2018) realizaram uma busca ativa em CB tratados previamente com inibidores de *checkpoint* imunológico que apresentaram alta infiltração intratumoral de linfócitos CD8+; os grupos que obtiveram elevada expressão tiveram melhor sobrevida média de 673 dias, do que o grupo de baixa expressão de CD8 com sobrevida média de 271 dias ($P = 0,0012$). Esse achado indica que a alta expressão de CD8 em infiltrados imunológicos pode ser um preditor de melhor resposta à terapia de bloqueio PD1/PD-L1 (BÜCHLER, 2017; DENG et al., 2018). A expressão desses marcadores no câncer vem sendo elucidado cada dia mais em diversos tipos tumorais, dentre eles o câncer gástrico, onde o aumento da densidade de CD8 foi associado com o aumento da expressão de PD-L1 em células tumorais e no estroma imunológico (THOMPSON et al., 2016).

Em estudo recente, foram analisadas 267 amostras de CB no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) para avaliar a presença do infiltrado de células T CD8 em câncer de bexiga. Sessenta e três por cento das amostras apresentaram infiltração significativa de CD8, contendo em média 14 células marcadas com coloração de IHQ por campo de grande aumento, constatando que a presença desse marcador pode estar associada ao perfil de expressão gênica. Nesta pesquisa também foi constatado associação significativa entre expressão de PD-L1 com infiltrado CD8+ ($P < 0,0001$) (MCLANE; ABDEL-HAKEEM; WHERRY, 2019; SWEIS et al., 2016b).

1.9 PD-L1

A proteína de morte celular programada-1 (PD-1) é um receptor da membrana de células T, B, NK e células supressoras de origem mieloide (MDSCs). Após a interação do ligante-1 de morte programada (PD-L1) há uma inibição nas vias de sinalização associadas a proliferação, sobrevivência e funções efetoras das células T, como também, uma diferenciação dos linfócitos T CD4 em células T reguladores denominadas de Treg. A inibição dessa cascata nos linfócitos T, acarreta um controle no dano tecidual e reparo da autotolerância (POSTOW; CALLAHAN; WOLCHOK, 2015).

Sabe-se que PD-L1 é um mecanismo de evasão imune explorado por várias malignidades, amplamente expresso em diversos tecidos que compreendem o endotélio, células epiteliais, particularmente em condições inflamatórias, e células hematopoiéticas, como os mastócitos, linfócitos T, macrófagos e células dendríticas (SHARPE et al., 2007; STENEHJEM et al., 2018).

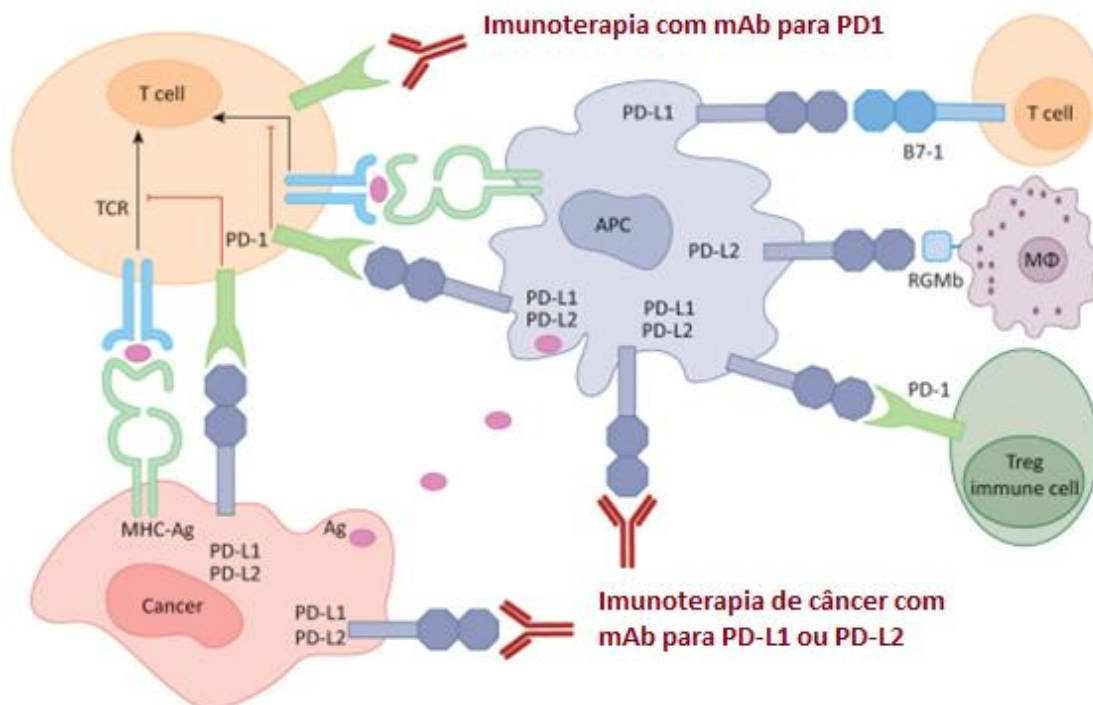
Ele possui atividade pró-tumorigênica em células cancerígenas a partir de ligação com seus respectivos receptores e ativação das vias de sinalização proliferativas, sobrevivência e progressão tumoral. Desse modo, a expressão de PD-L1 em células tumorais em modelos de transição epitélio mesenquimal induzida por PD-L1 e fenótipos semelhantes em células-tronco nas células cancerosas renais, por exemplo, corroboram a teoria que a presença da via intrínseca de PD-L1 de forma independente promove a progressão tumoral, principalmente no câncer renal, dessa forma, o desenvolvimento de anticorpos anti-PD1/PD-L1 mostrou ser um ponto bastante importante na imunoterapia contra o câncer (XAVIER et al., 2019).

O advento da imunoterapia mudou totalmente a abordagem terapêutica do

câncer. Assim, diversas drogas foram desenvolvidas, como por exemplo o inibidor de checkpoint, o inibidor de receptor de células T (TCR), anticorpos agonistas contra receptores coestimuladores e vacinas contra o câncer. Desse modo, os agentes imunoterápicos possuem finalidade de ativar ou potencializar o sistema imunológico por mecanismos naturais (RILEY et al., 2019; YANG, 2015).

A imunoterapia baseada no processo anti-PD-1 ou anti-PD-L1 / PD-L2 inicia quando as células apresentadoras de antígenos (APC) absorvem os antígenos liberados das células cancerígenas e os apresentam às células T que foram ativadas pelo principal complexo de histocompatibilidade (MHC); posteriormente os receptores PD-1 serão expressos nas células T e inibirão as respostas imunes pelo envolvimento de ligantes PD-L1 e PD-L2 nas células apresentadoras de antígenos (APC's) e PD-L1 nas células cancerosas, como podemos visualizar na figura 02 o mecanismos dos inibidores. Por isso, induzir o bloqueio específico da via PD-1 / PD-L1 / PD-L2 imuno mediada por anticorpo monoclonal (mAb) aumentam a imunidade antitumoral (Figura 02) (OHAEBULAM et al., 2015).

Figure 02. Imunoterapia anti-PD-1 e anti-PD-L1 / L2.



Fonte: Adaptado de Ohaegbulam et al., 2015.

Portanto, o desenvolvimento de uma imunoterapia contra o câncer iniciada através de anticorpos monoclonais (mAbs) intensificam a função das células T através

da ligação entre PD-1 e PD-L1 ou PD-L2. Muitos pesquisadores mostraram que o bloqueio de PD-1 sozinho ou PD-L1 acarretou no aumento de células T e IFN- γ no tumor e, como resultado, na neutralização de PD-1, PD-L1 ou PD-L2, sendo eficaz contra o crescimento tumoral (JOHN et al., 2013; OHAEGBULAM et al., 2015; ZANG; ALLISON, 2007).

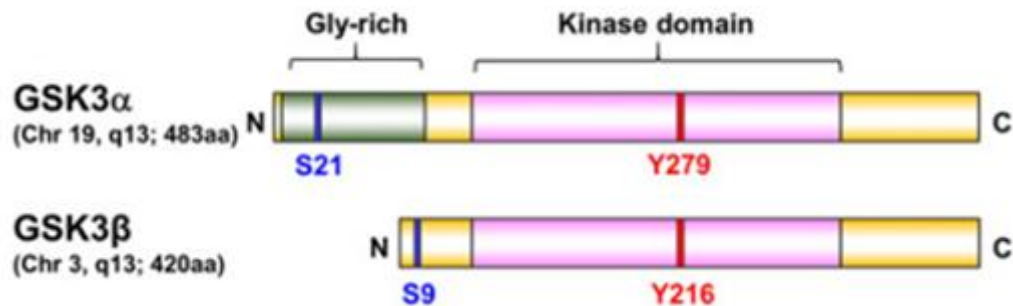
Diante dessa relação, os inibidores de verificação PD1 e PD-L1 surgiram como uma opção de tratamento para câncer de bexiga em estágio avançado ou em metástase. Pembrolizumabe e Nivolumabe são dois inibidores de PD1 e Atezolizumabe, Durvalumabe e avelumabe são inibidores de PD-L1 aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para carcinoma urotelial avançado e refratário a tratamento convencional (STENEHJEM et al., 2018).

A expressão de PD-L1 no câncer de bexiga está associada intimamente ao grau tumoral mais avançado (GULINAC et al., 2020). Alguns trabalhos apontaram que os tumores com elevada expressão de PD-L1 possuem maior probabilidade de serem agressivos, com recorrência e com menor índice de sobrevivência em longo prazo (DONG et al., 2018). Contudo, outros estudos revelaram que uma terapia combinada com inibidores da *autophagy-related gene 7* (ATG7) e inibidores do ponto de verificação imunológica PD-1 / PD-L1 pode aumentar a eficácia da terapia com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) em humanos (BELLMUNT; POWLES; VOGELZANG, 2017; NAKANISHI et al., 2007; ZHU et al., 2019).

1.10 GSK3- β

O glicogênio sintase quinase (GSK) 3 pertence à família de proteínas serina (S) 21 (pGSK3 α S21) e 9 (pGSK3 β S9) (ambas as formas inativas) / tirosina (Y) 279 (pGSK3 α Y279) e 216 (pGSK3 β Y216) quinase que foi originalmente identificada como um regulador do metabolismo de glicogênio, composta por duas isoformas altamente conservadas denominadas de GSK- α e de GSK- β e ambas codificadas por genes diferentes, localizados no cromossomo/7, cromossomo/19, cromossomo/16, cromossomo/3 (Figura 03) (BILIM et al., 2009; COHEN; FRAME, 2001; K Aidanovich-Beilin; Woodgett, 2011).

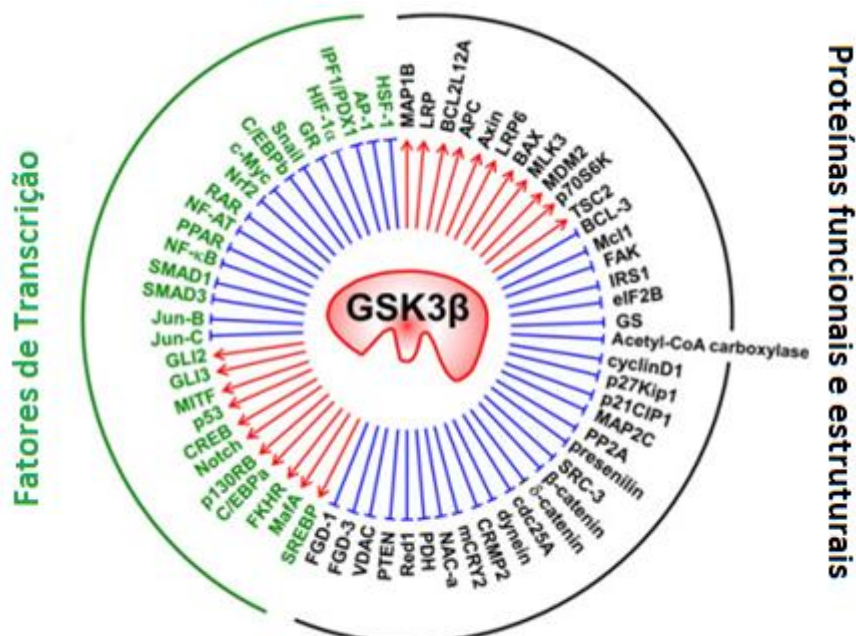
Figura 03: Representação do GSK-3 α e GSK-3 β de mamífero.



Fonte: (DOMOTO et al., 2016).

Estima-se que cerca de 100 proteínas são fosforiladas pelo GSK3- β (SUTHERLAND, 2011). Diversos substratos dessa molécula nos levam a avaliar a possibilidade de uma adaptação nas vias de sinalização e regulação de GSK3- β , que correspondem a regulação da disponibilidade de substrato e localização subcelular; acredita-se que devido ao grande número de substratos, o GSK possa ter vários papéis na promoção ou diminuição da proliferação celular (DUDA et al., 2020).

Figura 04: GSK3- β estabiliza / ativa (setas vermelhas) e desestabiliza / inativa (linhas azuis) vários fatores de transcrição, proteínas estruturais e funcionais.



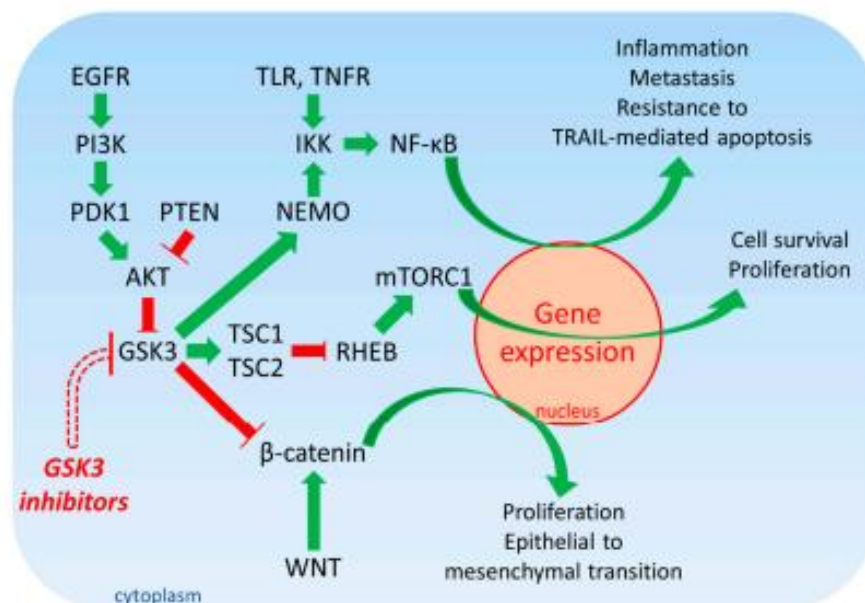
Fonte: Adaptado de Domoto et al., 2016.

Como descrito na figura 04, o GSK-3 β é responsável pela regulação do metabolismo do glicogênio e afeta a permeabilidade das mitocôndrias e a liberação de citocromo C para regular a apoptose (LIN et al., 2020). Desde a última década, diversas pesquisas abordaram o GSK-3 β como regulador positivo da proliferação de células cancerosas, estando localizado na membrana plasmática, retículo endoplasmático, mitocôndria; responsável por diversas vias de sinalização de morte da membrana, metabolismo energético, sobrevivência de células tronco adultas e transcrição gênica (RACAUD-SULTAN; VERGNOLLE, 2021).

Diversas pesquisas sugerem que GSK-3 β é um potencial terapêutico em pacientes com Alzheimer, osteoporose, diabetes mellitus não dependentes de insulina, doenças inflamatórias e no câncer (LIANG; CHUANG, 2006; LIN et al., 2020; MISHRA, 2010; SAYAS; ÁVILA, 2021).

GSK-3 β possui atividade multifuncional por meio de fosforilação direta de uma ampla gama de substratos, como ciclinaD1, eIF2B, c-Jun, c-myc, NFATe MCL-1 (DOBLE; WOODGETT, 2003). Sabe-se que o GSK-3 β está interligado com várias vias bioquímicas, de EGFR / RAS / PIK / PTEN / AKT / mTORC1 são mais comuns; então, ambas são fundamentais no processo de crescimento celular normal, atividade exacerbada decorrente das mutações em RAS, PI3K (PIK3CA), PTEN, NF- κ B e WNT / β -catenina e outros genes como mostrado na figura 05 (ALVES et al., 2021; DUDA et al., 2020; KAZI et al., 2018).

Figure 05. Expressão elevada de EGFR/PI3K/PDK1/AKT/GSK-3/mTORC1. Setas verdes indicam estimulação e as setas vermelhas bloqueadas indicam inibição.



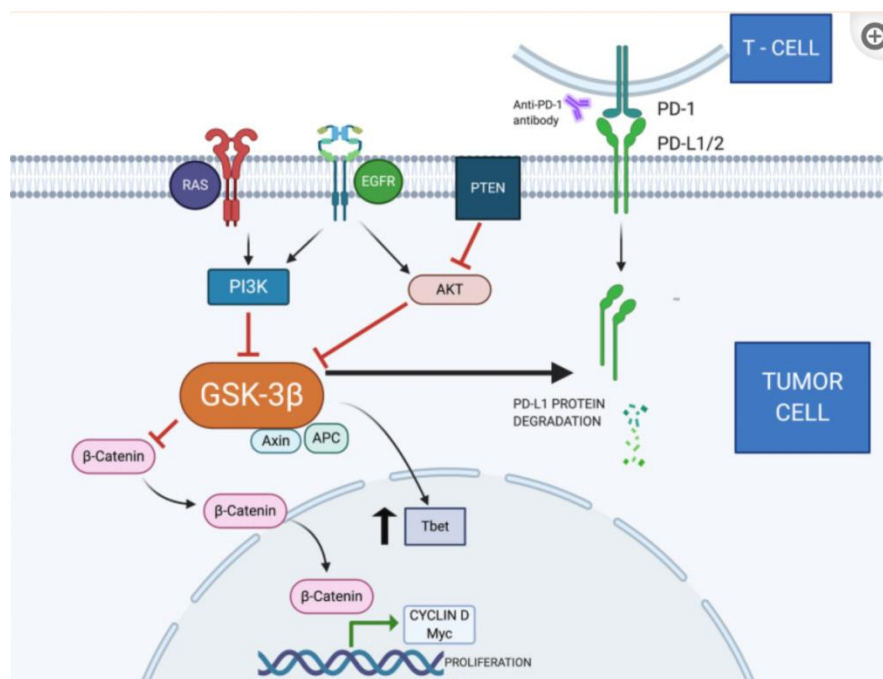
Fonte: (DUDA et al., 2020).

O GSK3- β vem sendo descrito na literatura como agente de atividade bifuncional, como proto-oncogene e atividade de supressão tumoral, onde a interação de GSK3- β com PD-L1 induz a degradação de proteossoma dependente de fosforilação do PD-L1 com β -TrCp; como também, a estabilização de PD-L1 é ocasionada pela inativação de GSK3- β que aumenta a função imunossupressora do tumor em testes *in vivo* (BANG et al., 2013; KAZI et al., 2018b; LI et al., 2016).

Recentemente, diversas pesquisas observaram que o GSK3- β está interligado diretamente aos processos de transformação neoplásica, crescimento tumoral e metástase (MISHRA, 2010; MISHRA; NAGINI; RANA, 2015). Em pulmão, foi verificada expressão elevada em tumores de estágio avançado (III / IV) com 84%, mostrando diferença significativa de $p=0,007$, além disso, quando visto o tamanho tumoral, T1/T2 apresentou maior positividade desse marcador, ou seja, a elevada expressão foi correlacionada a um pior prognóstico, assim acredita-se que este marcador pode ser um potencial alvo terapêutico (ALVES et al., 2021).

Na figura 06 podemos visualizar vários ligantes na superfície celular estimulam a produção de PIP3 (fosfatidilinositol trifosfato) por PI3K. Essas moléculas atuam como substrato para ativação de proteínas, incluindo AKT. Esta proteína fosforila GSK3, inibindo sua função. O gene supressor tumoral PTEN bloqueia a atividade de AKT desfosforilando PIP3 e PI3K. Além disso, ativar o complexo I κ B (IKK), que fosforila AKT, tornando-se um importante estímulo para NF κ B. O NF κ B é translocado para o núcleo, promovendo a produção de COX-2, enzima associada à angiogênese, invasão e metástase. Um complexo composto por AXIN, APC e GSK3 é responsável pela destruição e regulação negativa da B-catenina. A via de sinalização Wnt/ β -catenina está relacionada à proliferação celular, autorrenovação de células-tronco e diferenciação celular. Ciclina D1, β -catenina e C-myc são oncogenes associados à proliferação e diferenciação celular.

Figure 06. Ativação de várias proteínas por meio dos ligantes na superfície celular.



Fonte: (ALVES et al., 2021).

Na literatura o GSK3-β no pâncreas vem sendo descrito com atividade proto-oncogene e supressor tumoral, ambos correlacionados positivamente com KRAS em pesquisas de formatos *in vitro* e *in vivo* (BANG et al., 2013; KAZI et al., 2018b). BORDEN et al., 2021 descreveram que através da técnica de sequenciamento alterações genômicas em GSK3-β presentes no câncer colorretal, endometrial, melanoma, ovário carcinoma e sarcoma uterino, em ambos, a frequência de PD-L1 foi maior entre os tumores com mutação GSK3-β.

Alves et al., 2021, investigaram a correlação entre a expressão de GSK-3β e as características moleculares clinicamente relevantes do adenocarcinoma de pulmão. GSK-3β foi positivo em 75 tumores (78%) e tumores GSK3-positivos tendiam a ser diagnosticados em estágios avançados. Entre os tumores em estágio III/IV, 84% apresentaram positividade para GSK3 (p= 0,007). Identificando uma associação direta e estatisticamente significativa entre GSK-3β e PTEN na análise qualitativa (p 0,021). Tumores GSK-3β positivos com alto escore histológico tiveram pior sobrevida global (ALVES et al., 2021).

1.11 Patologia digital

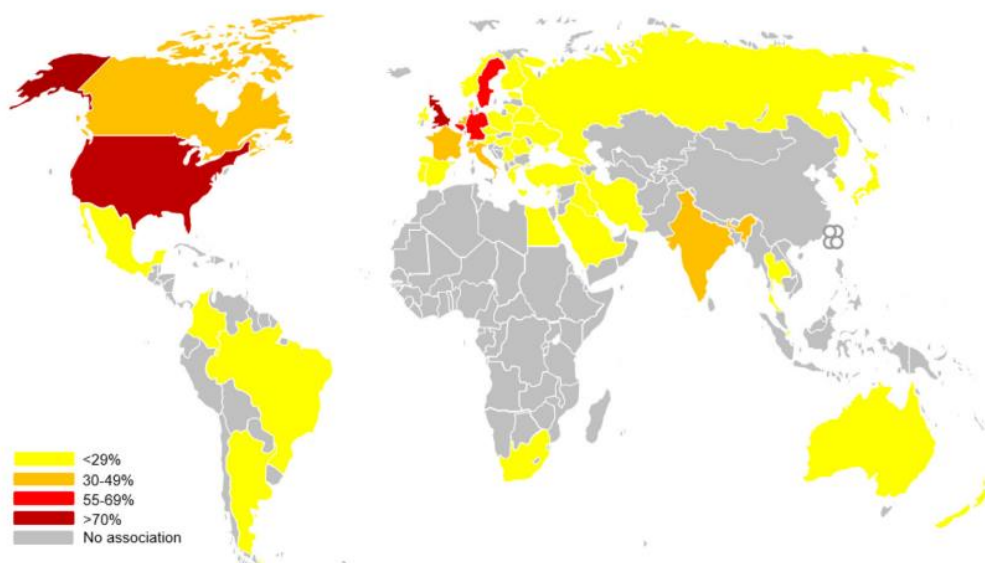
O uso da inteligência artificial no mundo da patologia diagnóstica e na pesquisa científica tem mostrado grandes avanços frente ao atendimento ao cliente, pois permite uma identificação dos marcadores de imagem de forma mais precoce, estabelecer um prognóstico e defini um tratamento mais direcionado e específico, além de permitir que os patologistas atendam mais pacientes; e aos pesquisadores melhor gerenciamento de imagens digitais (NIAZI; PARWANI; GURCAN, 2019).

Em 1950 McCarthy denominou a inteligência artificial (IA) como uma área da ciência da computação que utilizava máquinas para mimetizar a inteligência humana, mas somente após dez anos foi feito o processo de digitalização de imagens de um campo do esfregaço de sangue e transformada em uma matriz de valores de densidade óptica para análise automatizada, dando início aos primeiros passos para a patologia digital. Porém, somente em 1999 iniciou-se o escâner de lâminas por inteiro e a leitura feita utilizando abordagens computacionais (MCCARTHY et al., 2006; PREWITT; MENDELSON, 1966).

Atualmente, novas plataformas de código aberto estão sendo desenvolvidas a fim de garantir análises personalizadas, ofertando um aprimoramento na imagem e reprodutibilidade da pesquisa (BANKHEAD et al., 2017). Software, como Fiji, Icy, CellProfiler e QuPath (Queen's University of Belfast, Irlanda do Norte, Reino Unido), possibilitam a criação de métodos analíticos de visualizações em imagem de forma muito mais ampla, porém, há desafios de formatos de visualizações e manuseios, mas, com a criação de bibliotecas digitais é possível realizar análises de imagens, gerenciamento de dados, criação de fluxos de trabalhos que criam históricos de comandos, podendo ser aplicáveis a outras imagens, garantindo-se uma leitura reproduzível (DE CHAUMONT et al., 2012; HUMPHRIES; MAXWELL; SALTO-TELLEZ, 2021a; LAMPRECHT; SABATINI; CARPENTER, 2007; SCHINDELIN et al., 2012).

Diversas especialidades fazem o uso do software, sendo mais comum na área da oncologia, biologia celular e patologia, em mais de cinquenta países sendo utilizado conforme mostrado na figura 07 abaixo. Assim, por ser um software aberto, existe uma plataforma comunitária que permite a comunicação direta, com desenvolvimento de novos fluxos de trabalho, soluções de erros e criação de novos algoritmos (HUMPHRIES; MAXWELL; SALTO-TELLEZ, 2021b).

Figure 07. Distribuição do uso do Qupath no mundo.



Fonte: (HUMPHRIES; MAXWELL; SALTO-TELLEZ, 2021b).

A priori, o software foi criado para avaliar imagens de lâminas de forma mais ampla, assim, utilizando a patologia digital, permitindo análise de forma holística de reações de IHQ no campo claro ou fluorescência, hematoxilina e eosina (H&E). Embora tenha sido criado e usado principalmente em pesquisa com câncer, o mesmo, atende as necessidades de pesquisadores de laboratório para compreensão de dados quantitativos brutos; como também, pode ser utilizado por cientistas computacionais que objetivam desenvolver projetos e testes de algoritmos (HUMPHRIES; MAXWELL; SALTO-TELLEZ, 2021b).

Está ferramenta é econômica e acreditada por agencias de qualidade, diagnóstico remoto de patologia, destinada a analisar e a explorar dados de bioimagens, com ferramentas de anotações, presença, localização e intensidade de expressão de biomarcadores por meio de visualizações das marcações de reações de imunoistoquímica (IHQ), a partir de configuração prévia do que é positivo, possui capacidade de ler muitas imagens concomitantes, ofertando um diagnóstico rápido e fidedigno (HUMPHRIES; MAXWELL; SALTO-TELLEZ, 2021; LOUGHREY et al., 2018).

Mi et al., (2020) avaliaram por meio do QuPath amplamente o microambiente tumoral no controle da progressão tumoral em pacientes com câncer de mama triplo-negativo, investigando o padrão de distribuição dos marcadores CD3, CD4, CD8, CD20 e FoxP3, resultando em uma visualização mais ampla e integra do centro e área

infiltrativa do tumor, contrastando com região normal. ZAHND et al., (2019), agruparam duas ferramentas digitais, QuPath e Brightness_Max para análise estatística e associações clínico patológicas, destinadas a um biomarcador prognóstico e preditivo no câncer colorretal, assim os resultados foram significativos, mas torna-se necessário um olhar cauteloso na identificação da intensidade de marcação para distinguir o que é artefato e células de interesse.

Viratham Pulsawatdi et al. (2020a) realizaram uma validação de amplo espectro, utilizando a imunofluorescência e imunoistoquímica cromógena, ambas espectro multiplex por meio da técnica Opal, para detectar de forma simultânea alguns biomarcadores, permitindo a identificação de diferentes populações de células no microambiente tumoral em tecido de câncer colorretal, resultando em correlações significativas ($P - Valor < 0,0001$). Quando comparada ambas as técnicas por meio do software QuPath, JHUN et al. (2021b) avaliaram a densidade de linfócitos infiltrantes pela detecção de CD8 no estroma, permitindo uma ponderação de indicador de prognóstico preditivo no câncer de pulmão de não pequenas células, afirmando assim, que esta ferramenta permite uma abordagem de trabalho eficiente e padronizada de análise.

2. JUSTIFICATIVA

O CB é o câncer mais comum do sistema urinário, com o carcinoma urotelial usual o mais comum subtipo histológico, ocupando a 13^a posição de causas de mortes por câncer mundialmente.

A abordagem terapêutica para CB pode ser bastante agressiva, mas a imunoterapia é vista como sucesso notável em vários estágios da doença. A imunoterapia é menos suscetíveis de afetar as células normais, que tem como alvo o *checkpoint* PD-L1, o biomarcador GSK-3 β e a infiltração tumoral por linfócitos CD8+, pode representar uma opção terapêutica promissora para vários tipos de câncer e assim direcionar uma resposta a terapia imunológica ou associação com outras terapias tradicionalmente utilizadas.

Com o avanço da patologia digital, utilizar esta plataforma pode gerar resultados fidedignos, rápidos, e acessíveis para todos os profissionais da área da saúde, além de gerar uma leitura minuciosa para avaliar a imunoexpressão o que pode ser fundamental para o prognóstico do paciente com uso em larga escala.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a expressão proteica de PD-L1 e GSK-3 β e do infiltrado imune CD8+ em carcinomas de bexiga

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e correlacionar a expressões de CD8, PD-L1 e GSK-3 β com dados clínicos histopatológicos e a abordagem terapêutica utilizada.
- Avaliar a sobrevida global e sobrevida livre de eventos dos pacientes com câncer de bexiga com invasão da camada muscular.
- Comparar a leitura tradicional semi-quantitativa do patologista com o software Qupath para os marcadores PD-L1 e GSK-3 β no tumor e a densidade de células CD8+.

4. CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no Artigo 30, parágrafo 04 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta a inserção de artigos científicos de autoria do candidato para trabalhos de conclusão de mestrado e doutorado (dissertações e teses).

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS protocolado com número 3.997.304 (ANEXO D). Foram respeitados todos os aspectos éticos expressos na Resolução nº 466 de 2012, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, que é direcionada por Diretrizes e Normas Regulamentadoras de pesquisas com seres humanos e em concordância com a norma do CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa).

Deste modo, a presente dissertação é composta por dois artigos científicos redigidos de acordo com as revistas científicas escolhidas.

4.1 Capítulo 1

“Classificação de tumor assistida por computador, validação da pontuação de PD-L1 e quantificação da densidade de células CD8 -positiva em carcinoma urotelial, um guia visual para patologistas usando QuPath.” (*Computer-assisted tumor grading, validation of PD-L1 scoring, and quantification of CD8-positive immune cell density in urothelial carcinoma, a visual guide for pathologists using QuPath*).

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico *Surgical and Experimental Pathology* (SAEP-D-22-00006R1).

Resumo

Introdução: Os avanços na imagem digital em patologia e a nova capacidade de digitalizar imagens de alta qualidade mudaram a forma de praticar e pesquisar em patologia cirúrgica. O QuPath é um software de patologia de código aberto que oferece uma maneira reproduzível de analisar variáveis quantificadas. Nosso objetivo foi apresentar a funcionalidade da pontuação de biomarcadores usando o QuPath e fornecer um guia para a validação da classificação patológica usando uma série de casos de carcinomas uroteliais. **Métodos:** Foram construídos e escaneados *Microarrays* teciduais de carcinomas uroteliais. As imagens foram coradas com HE e imunohistoquímica, para CD8 e PD-L1, importadas para o QuPath e corrigidas. Imagens de treinamento foram usadas para construir um classificador de notas e aplicadas a todos os casos. A quantificação de CD8 e PD-L1 foi realizada para cada poço de TMA usando segmentação de cor citoplasmática e de membrana, medição de saída e análise semiquantitativa comparada com leitura dos patologistas. **Resultados:** Foi verificada uma correlação forte entre o grau do tumor pelo patologista e pelo software QuPath (concordância Kappa 0,73). Para carcinomas de baixo grau (pelo laudo e patologista), a concordância não foi tão alta (24,1%). Dos 32 tumores de baixo grau, 22 foram corretamente classificados como de baixo grau, mas 11 (34%) foram classificados como de alto grau, com a razão de alto grau para baixo grau nesses casos mal classificados variando de 0,41 a 0,58. A razão mediana para carcinomas de alto grau genuínos foi de 0,59. A análise de correlação entre o software e o patologista mostrou que o marcador CD8 apresentou correlação moderada ($r=0,595$) e estatisticamente significativa ($p<0,001$). A consistência interna deste parâmetro apresentou índice de 0,470. A análise de correlação entre o software e o patologista mostrou que o marcador PDL1 apresentou correlação robusta ($r=0,834$) e significativa ($p<0,001$). A consistência interna deste parâmetro apresentou um CCI de 0,851. Tumores de baixo grau eram mais jovens ($p=0,008$) e pacientes com tumores invasivos eram mais velhos do que os não invasivos ($p=0,036$). **Conclusão:** Conclui-se que os dados do estudo demonstram uma forte correlação entre as duas metodologias em relação aos marcadores utilizados, logo, reforçando a importância do uso do QuPath como uma ferramenta promissora no diagnóstico, prognóstico e na avaliação da resposta ao tratamento no câncer de bexiga.

Introdução

Desde a década de 1970 e, mais importante, nos últimos 20 anos, a imunohistoquímica (IHQ) provou ser um método eficaz, bem estabelecido e amplamente aceito no laboratório de Patologia Cirúrgica para auxiliar nas colorações histoquímicas convencionais de cortes de tecidos. O diagnóstico de doenças, particularmente câncer, é baseado no exame das células por microscopia de luz e na detecção de moléculas específicas, como proteínas e ácidos nucléicos, que são rotineiramente identificadas em tecidos de biópsia por tecnologias de ligação a anticorpos ou hibridização nucléica. As técnicas melhoraram e, agora, centenas de anticorpos, sondas e protocolos de reação são realizados em todo o mundo para identificar tipos específicos de células, subclassificação de tumores, fornecer informações sobre fatores específicos de câncer, estimar a agressividade de neoplasias, prever a resposta à terapia, identificar agentes infecciosos, e muitas outras aplicações. [1-6] Diretrizes para padronização e validação analítica de IHQ foram estabelecidas pelo *College of American Pathologists*, com atualizações regulares. [7, 8]

De acordo com os tipos específicos de tumor e os anticorpos usados, os patologistas geralmente classificam os achados de maneira semiquantitativa, com base na distribuição do marcador, porcentagem de células positivas e/ou intensidade da coloração. As lâminas de IHC são predominantemente coradas com 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) e contrastadas com hematoxilina. Relatos de patologia cirúrgica bem-sucedida incluem a avaliação da positividade de HER2 em câncer de mama, quantificação de ki67 em várias neoplasias e, mais recentemente, o uso de pontuação PD-L1 (em células tumorais e imunes) para prever a resposta à imunoterapia em uma infinidade de tipos de câncer. [1, 9, 10] Tanto na pesquisa quanto no cenário clínico, os sistemas de pontuação H e *Allred* têm décadas e ainda são usados para avaliar a porcentagem e a intensidade da coloração celular. [11, 12]

Vários estudos de pesquisa se basearam em *microarrays* de tecido (TMA) combinados com IHC, para permitir a análise de alto rendimento de várias amostras de tumor. [13] [14] [15] [16, 17] [18] Com a patologia digital e a capacidade de escanear lâminas inteiras com imagens de alta qualidade, novos softwares e plataformas foram criados para ajudar pesquisadores e patologistas a quantificar, classificar tecidos e tumores. O QuPath é um software de análise de patologia de código aberto que oferece

uma maneira reproduzível de analisar e fornecer variáveis quantificadas e permite o treinamento e a classificação subsequente de células usando algoritmos digitais automatizados. [19, 20]

Neste estudo, nosso objetivo foi avaliar a (1) viabilidade de escanear e analisar TMAs de tecido para câncer de bexiga, (2) mostrar a funcionalidade da pontuação de biomarcadores usando QuPath e (3) fornecer um guia com passo a passo para a validação de graduação patológica usando uma série de casos de carcinoma urotelial corados com HE, CD8 e PD-L1.

Materiais e métodos

Pacientes e amostras de tumor

A coorte foi composta por cento e quarenta pacientes com câncer de bexiga com amostras provenientes de ressecções transuretrais e cistectomias radicais de um laboratório de referência em patologia geniturinária localizada em Fortaleza no Brasil. Os dados clínicos, laboratoriais, demográficos, sexo, idade, tabagismo e sobrevida global foram coletados em prontuários eletrônicos nas Unidades Hospitalares onde o paciente estava sendo acompanhado. Indivíduos com terapia neoadjuvante, terapia BCG prévia ou radioterapia foram excluídos. Tumores obtidos de espécimes fixados em formalina e incluídos em parafina (FFPE) foram coletados retrospectivamente dos arquivos de um laboratório de referência no Nordeste do Brasil após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. As seções de tecido foram recuperadas de focos tumorais dominantes. As amostras de tumor foram classificadas como de baixo ou alto grau de acordo com o sistema de classificação aceito pela OMS em 2016.

Construção de Microarranjo Tecidual (TMA):

Dois *microarrays* de tecido (TMAs) foram construídos usando um organizador de tecido manual como descrito anteriormente. [16] Para cada caso, um poço de 2 mm de uma área representativa foi selecionado a partir de seções coradas com hematoxilina-eosina (HE) de espécimes da bexiga por um patologista geniturinário experiente. Os poços de tecido que continham <100 células tumorais foram removidas da análise.

Análises imuno-histoquímicas

A IHC foi realizada em um laboratório privado que possui o selo do programa de acreditação de qualidade da Sociedade Brasileira de Patologia. PD-L1 e CD8 foram escolhidos para provar a versatilidade e o uso potencial do QuPath em um marcador de células T específico (CD8) e PD-L1, que é o marcador mais importante para avaliar a resposta à imunoterapia. Esses biomarcadores foram escolhidos porque ambos são bem caracterizados e os anticorpos estão em uso clínico de rotina na maioria dos laboratórios de patologia. Além disso, esses marcadores mostram padrões muito diferentes. O CD8 marca especificamente uma subclasse de células T de maneira uniforme, enquanto o PD-L1 marca membranas e citoplasmas de células tumorais e imunes com intensidade variável.

Seções sequenciais foram cortadas de cada bloco de TMA e montadas em lâminas de vidro de microscopia carregadas para coloração imuno-histoquímica. A análise de PD-L1 IHC (22C3 pharmDx, Agilent, clone 22c3) foi realizada usando PT-Link (Dako PT100), seguida de recuperação do alvo com tampão EnVision™ FLEX pH 6.0, usando o sistema de visualização Agilent Technologies®, EUA no Autostainer Link 48® equipamentos. A positividade de PD-L1 foi avaliada de acordo com o protocolo atual.

A caracterização do infiltrado imune de células T tumorais foi realizada avaliando CD8 (DAKO, clone C8/144b) por imuno-histoquímica em todas as TMAs. A densidade de células T CD8+ foi avaliada como a porcentagem geral da área dentro das fronteiras dos tumores cobertas por células imunes positivas. Este método é baseado na proposta de um método padronizado *do International Immuno-Oncology Biomarkers Working group*. [21]

Análises de imagens morfométricas assistidas por computador

Lâminas coradas com TMA (HE, CD8 e PD-L1) foram digitalizadas com ampliação de 40x (*scanner Motic EasyScan Infinity 100*, Vancouver, CA) e analisadas por dois patologistas independentemente usando um escore semiquantitativo. Ambos os patologistas também classificaram os tumores como de baixo e alto grau de acordo com a atual Classificação da Organização Mundial da Saúde.

Os arquivos foram carregados em um projeto no software QuPath (código-fonte do QuPath, documentação, links para download do software estão disponíveis em <https://qupath.github.io>). O recurso de segmentação do QuPath é capaz de detectar

milhares de células, identificá-las como objetos de maneira hierárquica abaixo da anotação, poços de TMA ou casos e medir a morfologia celular e a expressão de biomarcadores ao mesmo tempo. [22] As imagens estavam desordenadas e todos os poços separados de forma contínua de 1-140. O comando *Cell Detection* foi usado para identificar todas as células em todos os poços de TMA com base na densidade óptica da coloração de hematoxilina nuclear. Em seguida, usando medições selecionadas de intensidade e morfologia de todas as células, aplicando um classificador de árvores aleatórias bidirecional para treinar o QuPath interativamente para distinguir células de poços tumorais do estroma e poços tumorais predominantes de baixo grau predominantes de alto grau. Isso exigia o desenho de células tumorais por um patologista experiente, e o QuPath foi capaz de fornecer feedback imediato em todos os tumores. Uma vez que a classificação foi adequada para imagens de treinamento, os autores expandiram o classificador para identificar todas as células em todos os poços e estimar o percentual de carcinomas de alto e baixo grau para comparar a classificação do patologista original e a confirmada. Se a saída do QuPath mostrasse que células de alto grau estavam presentes em mais de 10% das células tumorais em cada poço, em uma planilha do Excel, o tumor era considerado de alto grau pelas análises de software. Selecionamos aleatoriamente 7 casos de carcinoma de alto grau e 3 de baixo grau como um conjunto de treinamento para o algoritmo, anotado por um dos autores, para identificar células tumorais de baixo grau e alto grau e estroma. A hipótese é avaliar se usando apenas 7% dos poços (10/140), o QuPath seria capaz de classificar com precisão o restante dos tumores nos poços de TMA.

Para medições de densidade de CD8, uma detecção de tecido simples foi realizada para avaliar a área de tecido de cada poços de TMA, seguida por contagens de células CD8 com o comando de detecção de célula positiva dentro do software (os parâmetros para cada comando foram ajustados por um dos autores). Estas medições permitiram a contagem de células CD8 positivas/mm² de tecido. O *script* correspondente foi então aplicada a todos os poços de TMA, e os dados foram exportados para um software de análise estatística (JMP, 2021 SAS Institute Inc). Esta avaliação de um marcador de CD no poços de TMA foi descrita anteriormente. [14] O resultado de análise para esta variável foi o número de células CD8+ por mm², e foi comparada com as análises de um patologista que avaliou cegamente cada um dos

poços de TMA e avaliou um escore semiquantitativo percentual de 0-100% (área total envolvida por linfócitos CD8+ infiltrantes ou peritumorais).

Para pontuação de PD-L1, as análises foram executadas com base no algoritmo treinado descrito acima e quantificação de citoplasma positivo (coloração DAB média) apenas em células detectadas como células tumorais, e não estroma e outras células. A saída do QuPath foi capaz de identificar o número de células positivas para PDL1/mm² e, além disso, o método Hitoscore (H-score para avaliação semiquantitativa da intensidade e porcentagem de células positivas) foi aplicado pelo software, baseado na extensão e intensidade da coloração citoplasmática (1-3), multiplicada pela porcentagem de células positivo, com uma pontuação potencial variando de 0-300. [19] Um patologista pontua PD-L1 em cada poço usando o método estabelecido de Score de pontuação tumoral (TPS). Foi definido como a porcentagem de células tumorais viáveis mostrando coloração PD-L1 de membrana parcial ou completa em qualquer intensidade. A comparação entre as análises dos patologistas e as medidas assistidas por computador foram avaliadas por pontuações de concordância.

Análise estatística

Os dados de CD8 e PDL1 foram avaliados pela correlação de Spearman e análise de consistência interna por meio do cálculo do coeficiente de correlação interclasses. Adicionalmente, o coeficiente kappa foi calculado para os pontos de corte (Alto vs Baixo). O kappa de Cohen variou de -1,0 (discordância total) a +1,0 (concordância total). Valores entre 0,6 a 0,8 estão relacionados à concordância adequada e 0,8 a 1,0 estão relacionados à concordância forte. Valores inferiores a 0,6 são considerados concordância inadequada. Em todas as instâncias, foi adotado um nível de confiança de 95% (SPSS® v20.0 para Windows).

Resultados

Dados clínico-patológicos

A coorte consistiu de 140 pacientes, mas 9 foram imediatamente excluídos nas análises de grau devido à falta de poços de tecido nos cortes histológicos de TMA corados com hematoxilina e eosina (Figura 1) (131 casos no total, sendo 105/76% do sexo masculino) com a idade média 74,2 anos (57% acima de 75 anos). As secções para

imuno-histoquímica estavam com os tecidos íntegros, e todos os 140 poços de TMA foram usados para análises (140 poços no total, idade média de 71,4 anos, 77% do sexo masculino). De acordo com os relatórios de patologia originais, havia 99 carcinomas uroteliais de alto grau (75,5%) e 32 de baixo grau, que foram confirmados por avaliação cega de cada poço por um patologista geniturinário experiente. Por laudos anatomopatológicos, 83 casos (59%) eram invasivos pelo menos na lâmina própria (todas lesões de alto grau), enquanto 56 eram não invasivos – esse dado não foi confirmado em poços de tecidos devido à impossibilidade de avaliar a invasão em TMAs. Os pacientes com tumores de baixo grau eram mais jovens (69.45 ± 17.96) em relação aos de alto grau (76.62 ± 11.04) apresentando $p=0,0062$. Os pacientes com tumores invasivos também eram mais velhos (média 76,1 anos) do que os não invasivos (média 71 anos, $p=0,036$).

Detecção de células

Depois de organizar o TMA e executar um *script* para enumerar os poços de tecido de 1 a 140, o QuPath conseguiu tratar cada poço como uma unidade separada de maneira hierárquica para saída de dados e medições. Uma das principais funções básicas do QuPath (e qualquer software de análise de patologia cirúrgica para esse assunto) é identificar células e calcular características individuais. Executamos o comando *Cell Detection* usando a densidade óptica da hematoxilina como alvo para os poços, com tamanho de pixel de 0,5 μ m e 3 μ m de expansão celular. A Figura 2 mostra um dos poços (#61) como exemplo. Para este poço, houve 30.204 detecções celulares. Mais importante, para cada célula, o programa pode fornecer todas as medições e exportá-las para uma planilha. Se o delineamento de células for aceitável, a detecção de células pode ser executada para todos os poços de tecido. O número médio de células detectadas para todos os poços foi de 25.921 células (intervalo 3.197-64.144). Um total de 3.283.282 células foram identificadas em todos os 131 poços. Os autores usaram um computador PC Core i7 rodando Windows 10, com 16 GB de memória RAM e um disco rígido SSD de 512 GB. Para cada TMA compreendendo 7 poços, a Detecção de Células foi executada por cerca de 3 minutos.

Um recurso útil para os pesquisadores é a capacidade de distinguir entre diferentes tipos de células dependendo de quais medições foram feitas e apresentá-las como um mapa de calor visual. A Figura 3 mostra um exemplo (poço nº 34) de um

tumor de alto grau com o mapa do resultado da razão poço/área da célula para cada célula e o mapa de calor para todo o bloco (poços 1-70) com o mesmo mapa de medição. Para a razão poço do TMA/área da célula, foram medidas 1.791.467 células, com média de 0,289 (Std. Dev 0,077). Na figura, o amarelo representa uma alta relação N:C, enquanto o roxo uma menor.

Reconhecimento automatizado de grau de tumor

Para treinar o algoritmo do software no reconhecimento de células tumorais e diferenciação de classes celulares, foram anotados 7 casos de carcinoma urotelial (AG) de alto grau e 3 casos de carcinoma urotelial (BG) de baixo grau, bem como 4 casos distintos de não tumoral tecido (rotulado "estroma" e representando componentes não tumorais, como tecido fibroadiposo, estroma desmoplásico ou feixes musculares (Figura 4, anotações dos poços de ensino). Dentro do conjunto de treinamento, 4.231 células tumorais em 7 casos de alto grau, 4.906 tumores células em 4 casos de baixo grau e 8023 células de estroma foram anotadas. Um *script* contendo todos os procedimentos e etapas na detecção e classificação foi salvo e executado em todas as imagens TMA importadas, automatizando assim a detecção e entre os slides, conforme descrito anteriormente. [14] Este é um recurso particularmente útil do programa para aumentar a reprodutibilidade em diferentes casos. [23, 24]

Usando o classificador de análises aleatórias por *Random Trees* cuja finalidade é gerar muitos parâmetros de análise e combinar com os resultados da classificação de todos eles, baseado em características nucleares e citoplasmáticas (área, perímetro, circularidade, calibre, excentricidade nuclear, densidade óptica de hematoxilina, densidade óptica de eosina (com médias e variância) e razão de área nuclear para célula, testamos o algoritmo no primeiro tecido bloco com 70 casos e correções adicionais de treinamento. Quando o patologista sênior ficou satisfeito, a classificação foi implantada em todos os poços de tecido, criando um mapa de cada uma das milhares de células. Os dados foram exportados para uma planilha. Para cada poço do TMA, a saída mostrou o número de células designadas de alto grau, baixo grau e estroma (vermelho, azul e verde, respectivamente, consulte a Figura 5). Se as células de alto grau foram atribuídas em mais de 10% das células tumorais para cada core, o core foi designado de alto grau pelo software e esses resultados foram comparados com o grau atribuído pelo patologista.

Houve uma boa correlação entre o grau do tumor pelo patologista e pelo software QuPath (concordância Kappa 0,73). Curiosamente, o algoritmo foi quase perfeito no diagnóstico de tumores de alto grau (98 de 99 tumores). O único tumor de alto grau classificado como de baixo grau pelo QuPath foi o poço #14. Este poço mostrou 19.552 células com previsão de baixo grau e apenas 2.280 com previsão de alto grau, tornando-o um caso difícil de classificar. Para carcinomas de baixo grau (pelo laudo e patologista), a concordância não foi tão alta. Dos 32 tumores de baixo grau, 22 foram corretamente classificados como de baixo grau, mas 11 (34%) foram diagnosticados como de alto grau, com a proporção de alto grau para baixo grau nesses casos mal classificados variando de 0,41 a 0,58. A razão mediana para carcinomas de alto grau genuínos foi de 0,59. Algumas das razões que os autores listam como potenciais imitadores para casos de alto grau são artefato de fulguração, hipercromasia nuclear, tecidos dobrados e inconsistência na coloração.

O software também foi capaz de informar quais eram as características celulares mais importantes para prever entre baixo e alto grau, nesta ordem de importância (entre parênteses, o software fornece um número de importância para cada variável: (1) área do poço (0,0805); (2) média da densidade óptica da hematoxilina nuclear (0,0705); (3) circularidade do poço (0,0679); (4) razão poço/área da célula (0,0645); (5) perímetro do poço (0,0531); (6) área celular (0,460) e (7) calibrador mínimo de células (0,0460).

Quantificação de CD-8 e PD-L1

Para validar a capacidade de contar células positivas por imunohistoquímica, os autores pontuaram visualmente a presença de células CD8+ dentro de cada poço e avaliaram a pontuação da proporção do tumor PD-L1. Esses dados foram comparados com os resultados da detecção de células positivas e detecção de tecidos automatizadas do QuPath. A saída QuPath escolhida para a quantificação de CD8 foi a densidade (células/mm²), enquanto comparamos a densidade de células positivas para PD-L1 e o H-score de PD-L1 com o score de proporção tumoral (TPS) dos patologistas.

A análise de correlação entre o software e o patologista mostrou que o marcador CD8 apresentou correlação moderada ($r=0,595$) e estatisticamente significativa ($p<0,001$). A consistência interna deste parâmetro apresentou índice de 0,470. A análise de correlação entre o software e o patologista mostrou que o marcador

PD-L1 apresentou correlação robusta ($r=0,834$) e significativa ($p<0,001$). A consistência interna deste parâmetro apresentou um CCI de 0,851. Quando considerado o H-score para correlação e análise de consistência interna, a correlação também foi muito forte ($r=0,997$) e significativa ($p<0,001$) e o CCI foi de 0,919. A concordância mostrou um coeficiente kappa estatisticamente significativo ($p<0,001$) de 0,724. Esses dados são ilustrados nas Figuras 6 e 7.

Discussão

Há uma forte necessidade de quantificação precisa da expressão de biomarcadores em seções de tecido, tanto no cenário de diagnóstico quanto nos fluxos de trabalho de pesquisa translacional. Embora as técnicas moleculares tenham revolucionado as análises de previsão e prognóstico baseadas em tecidos, especialmente em câncer de pulmão, mama e cólon, as seções básicas de patologia cirúrgica são de menor custo e a imuno-histoquímica está amplamente disponível em todo o mundo.

As análises digitais superaram algumas limitações de pontuação quantitativa convencional por patologistas: capacidade de avaliar milhares ou milhões de células, maior reprodutibilidade nas imagens digitalizadas de lâmina inteira e velocidade na avaliação de múltiplas lâminas ou casos no cenário de pesquisa. [24, 26, 27] Outro obstáculo com a semiquantitativa visual é o curto alcance dinâmico de muitos sistemas. O método *Allred* usado no câncer de mama atribui pontuações para intensidade (0-3) e porcentagem de células (0-5), por exemplo, tem um intervalo de 0-8, em comparação com a saída de análises digitais que podem gerar saída de decimais ou o H-score mais comumente usados (0-300). [28] [30-31] Nos últimos anos, vários estudos compararam a expressão tecidual avaliada por patologistas com algoritmos digitais e, mais importante, compararam digitalmente transcrições de mRNA e proteômica, ressaltando o poder da quantificação de proteínas teciduais na pesquisa e os resultados do paciente. [32] [33-35] Ram et al. quantificaram a expressão de proteínas (P-caderina, PD-L1 e 5T4) e mostraram uma alta concordância com os transcritos de mRNA e os patologistas atribuídos ao H-score. [25] Levy-Jurgenson et al usaram uma abordagem semelhante em um estudo elegante e usaram algoritmos de aprendizado profundo para quantificar a heterogeneidade do tumor com excelente correlação com a sobrevivência por meio da expressão de mRNA e miRNA de imagens de lâmina inteira. [34]

Avaliar o microambiente imune tumoral é árduo, uma vez que as amostras de tecido são geralmente limitadas e apenas uma representação estática de um processo dinâmico e contínuo. Para entender melhor a interação entre diferentes células, uma abordagem tem sido a utilização de imuno-histoquímica multiplex com os benefícios de utilizar vários epítomos para estudar composições e relações celulares, quantificando simultaneamente e localizando o microambiente tumoral. [49] [50]. Xie et al. usaram protocolos de IHQ e imunofluorescência multiplex para caracterizar marcadores imunológicos em carcinoma urotelial de alto grau e utilizaram QuPath para quantificação de infiltrado imune e encontraram boa correlação entre IHQ multiplex e singleplex e entre pontuação multiplex e manual. [50]

Enquanto outros estudos tentaram validar o uso de software e comparar com diagnósticos de patologistas da vida real, especialmente usando linfócitos infiltrantes de tumor e expressão de PD-L1 [21, 36-40], o presente trabalho pretende provar algo mais sutil, mas prático, ou seja, a capacidade de patologistas sem treinamento prévio em utilizar uma plataforma para quantificar e comparar dados morfométricos. Nenhum dos autores tinha experiência em *scripts*, codificação ou formação em ciências da computação. Bankhead testou o desempenho do QuPath em amostras de câncer de cólon usando microarrays de tecido e quantificou p53, PD-L1 e CD8, mostrando de forma elegante o poder do software em prever a sobrevida dos pacientes. [22]

A utilidade de avaliar PD-L1 em carcinoma urotelial na previsão de terapia com inibidores de checkpoint imunológico foi estabelecida recentemente na literatura têm mostrado fortes dados de apoio. [41] [43, 44] No entanto, a heterogeneidade intratumoral na expressão de PD-L1 pode explicar algumas das controvérsias da falta de consenso. [45] Um dos fatores atribuídos são o uso da imunoterapia, onde cinco diferentes anti-PD-1 (durvalumabe, nivolumabe e pembrolizumab) ou anticorpos anti-PD-L1 (atezolizumab e avelumab) são aprovados pelo FDA para pacientes com carcinoma urotelial localmente avançado. Além disso, a complexidade do ambiente imunológico do tumor não pode ser estabelecida para um limiar positivo/negativo para a expressão de PD-L1 sozinho (pembrolizumab: pontuação positiva combinada, CPS, cut-off = 10%; atezolizumab: pontuação de células imunes, cut-off = 5%; durvalumab: algoritmo de área de células tumorais/área de células imunes, ponto de corte = 25%). Portanto, análise mais minuciosas de outros preditores para oferecer um diagnóstico

mais fidedigno foi a avaliação, subtipagem e quantificação de linfócitos infiltrantes têm sido propostos. [45]

No manuscrito atual, avaliamos os linfócitos infiltrantes CD8+ em uma coorte de tamanho moderado de carcinoma urotelial de baixo e alto grau com boa concordância entre a avaliação do patologista usando % da área (nos poços) e a quantificação de QuPath do número de células/mm². De acordo com Weyerer et al., pouco se têm relatos do significado da expressão diferencial de PD-L1 em células tumorais e imunes, em relação à resposta à terapia, especialmente em pacientes virgens de terapia. [44] As informações de acompanhamento e tratamento não estão disponíveis para nossa coorte, e essa pode ser a grande limitação do artigo. Por isso a necessidade de validar uma forma de mensuração e não estabelecer correlações científicas per se.

Atualmente, vários algoritmos específicos de drogas em imunoterapia estão em uso em todo o mundo e, embora haja tentativas de padronização, há sensibilidade diferencial dos ensaios, protocolos distintos para tipos tumorais e múltiplas escolhas de drogas do ponto de vista dos oncologistas. Assim, os patologistas cirúrgicos enfrentam desafios diários na escolha de qual clone usar e como pontuar (células tumorais, células imunes, pontuações combinadas, etc.) [40] [46, 47].

A metodologia neste estudo incluiu o uso de TMAs, treinando o algoritmo para reconhecer os poços com morfologias predominantemente de baixo e alto grau, identificar e quantificar a expressão de PD-L1 no interior de células tumorais e calcular a densidade de células CD8 positivas dos poços do TMA. O uso do protocolo classificador de árvores aleatórias para treinar e testar o algoritmo foi tentado com resultados prévios. [14, 22] Em nossa coorte de câncer de bexiga, as características morfológicas que permitiram melhor distinção entre o grau do tumor são semelhantes às usadas rotineiramente pelos patologistas na atribuição de malignidade de forma subjetiva: tamanho nuclear e hiper cromasia (área do poço e densidade óptica), circularidade nuclear, perímetro nuclear, razão nuclear para citoplasmática ou celular e área celular. Essa característica complementado com a validação do cálculo da densidade celular calculada pela identificação de células DAB positivas (CD8 e PD-L1), e como PD-L1 é um marcador que pode positivar tanto células tumorais quanto imunológicas, após treinamento de identificação de células, o cálculo foi baseado apenas na morfologia de células tumorais positivas para PD-L1. Ambos tiveram correlação muito boa com o estado atual que é analisado por patologistas experientes

usando densidade de células imunes expressa por porcentagem de área ou porcentagem de células tumorais positivas para PD-L1, como o score de proporção tumoral.

Pudemos demonstrar a utilidade do QuPath na identificação e pontuação de células tumorais e na quantificação de IHC, bem como demonstramos passo a passo as direções de uso do programa de maneira muito básica. O objetivo foi ilustrar com imagens uma maneira fácil de usar esta plataforma gratuita com pouca experiência em programação ou mesmo em patologia digital. Com a disponibilidade crescente e custos decrescentes para hardware de digitalização de lâminas inteiras, a chance de usar um software em pesquisa e diagnóstico é reprodutível e produzirá grandes quantidades de dados e descoberta de biomarcadores. [51-53] No mundo pós-pandemia, esperamos que o uso de imagens digitais e a quantificação sejam amplamente utilizados tanto em diagnósticos clínicos quanto em pesquisas, pois foram validados em muitos centros [52, 54].

Conclui-se que a patologia digital é de fácil uso, disponibilidade e baixo custo, sendo concordante com a avaliação patológica em ambos os marcadores PD-L1 e CD8 nas amostras de câncer de bexiga.

Legenda das figuras

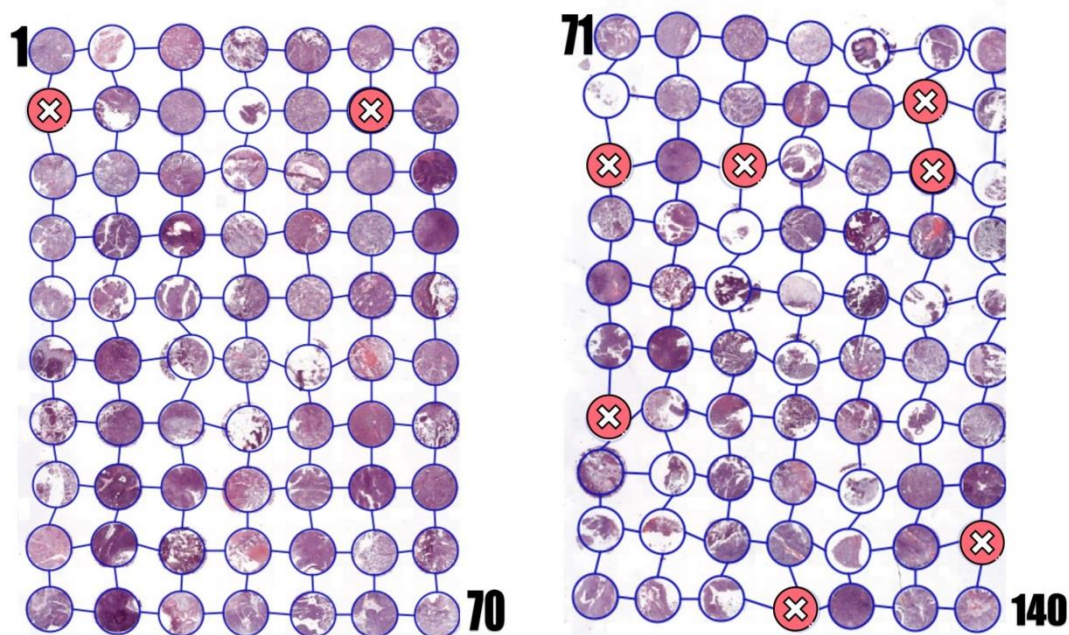


Figura 1 – Os dois blocos em *microarrays* de tecido compreendendo 140 poços (9 poços com tecido ausente), após procedimento de dearraying QuPath. Há 7 colunas e 10 linhas. Um pequeno script foi executado para renomear os poços de 1-140. Todos os poços restantes tinham pelo menos 200 células tumorais disponíveis para análise.

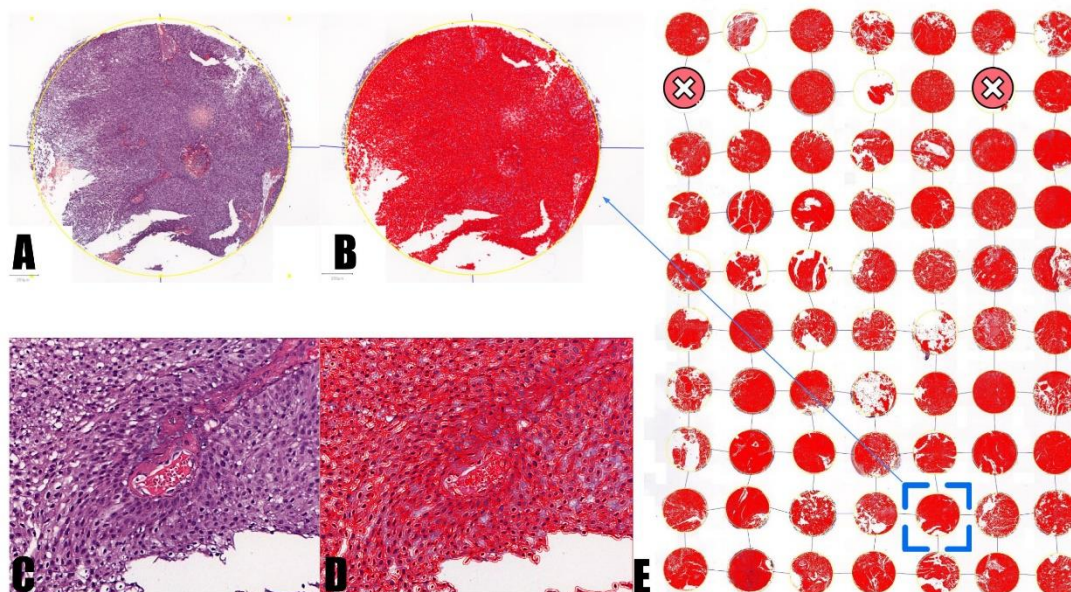


Figura 2 – A, core 61 mostrando tumor de alto grau com formação papilar. Após a Detecção de Células, o software mostra os poços detectados (contornos vermelhos) e a expansão celular para cada célula (Ampliar em C e D). Para este poço, houve 30.204 detecções de celular. O painel E mostra os poços de TMA de 1 a 70 e com o quadrado azul enfatizando o core #61.

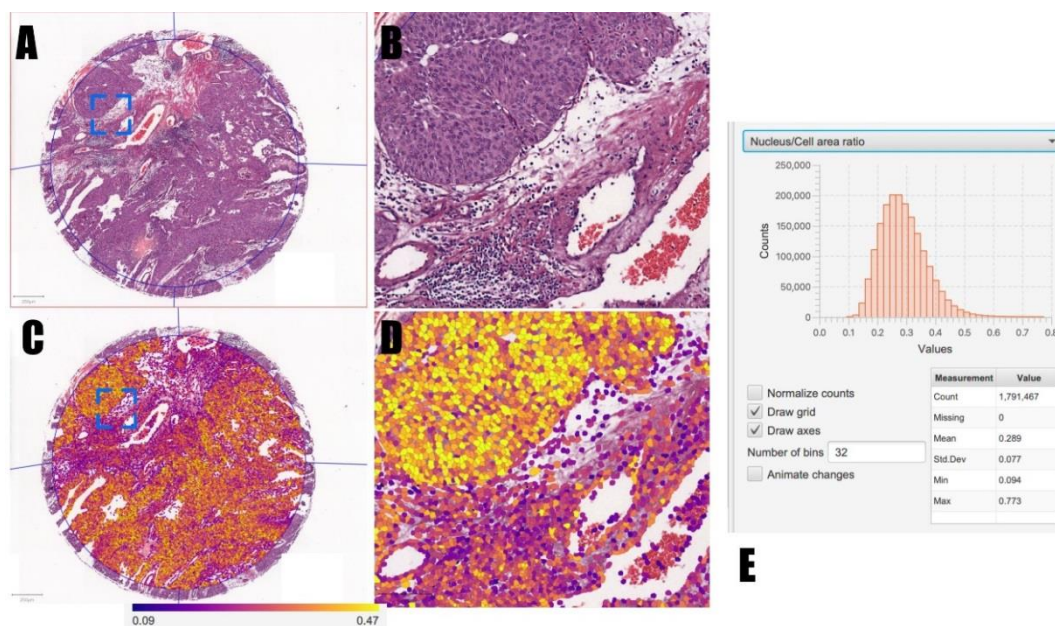


Figura 3 – Mapa de calor de medição de razão de área nuclear para célula. O painel A mostra a seção HE de carcinoma urotelial papilar invasivo de alto grau (poço 34), com o mapa de calor colorido em cada detecção celular (C). Para o roxo significa uma relação N:C mais baixa e para o amarelo uma relação mais alta. B e D são ampliados em áreas de imagens A e C correspondentes (quadrados azuis). As visualizações do mapa de calor podem ser definidas para qualquer uma das medições de saída. O painel E mostra o histograma para todas as células nas medições por valores normalizados no software.

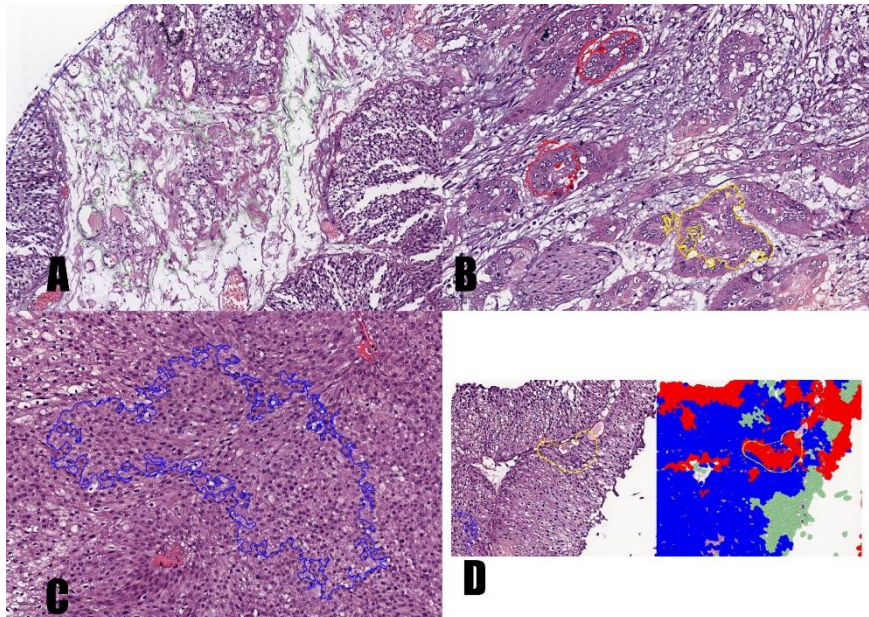


Figura 4 – Anotações de treinamento mostrando estroma (linha verde, painel A), carcinoma urotelial de alto grau (linhas verdes e amarelas, painel B), carcinoma urotelial de baixo grau, painel C. No painel D, após a primeira saída do mapa de calor colorido, o patologista corrigiu a área erroneamente atribuída como alto grau (vermelho).

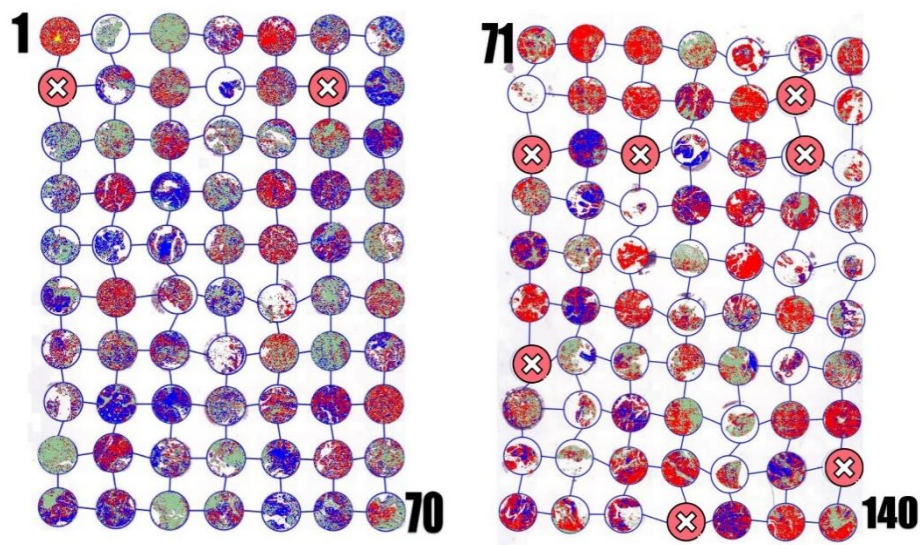


Figura 5 – Representação final do mapa de calor de grau tumoral em ambos os TMAs (vermelho é de baixo grau, verde é de alto grau e estroma (tecido não tumoral)).

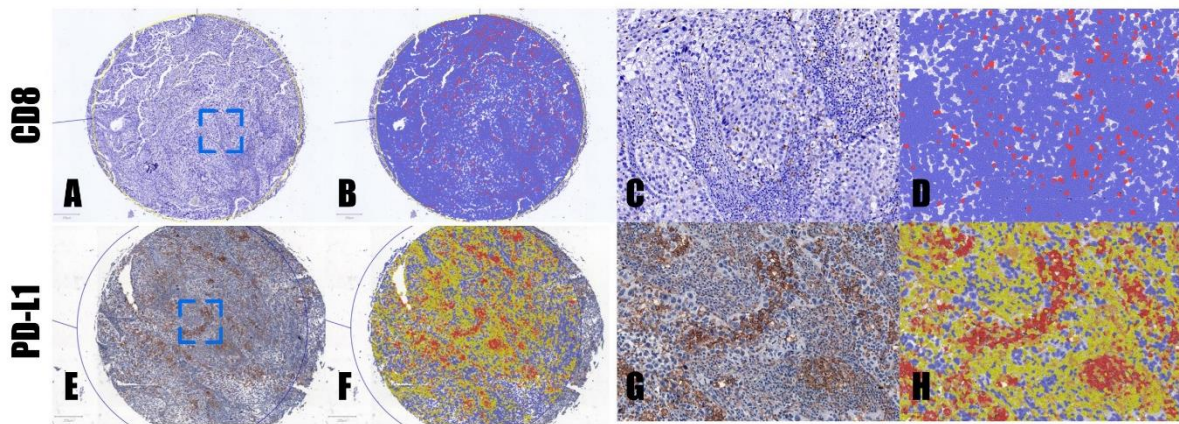


Figura 6 – Coloração IHC original para Core #119 mostrando CD8 em baixa potência (A) e colorido pelo software (vermelho é positivo e azul é negativo, B) e uma região de alta potência (C e D). Os painéis E, F, G e H são do mesmo poço corado com PD-L1 (as saídas de cores são azul para negativo, amarelo para positividade fraca, laranja para positividade moderada e vermelho para positividade forte). Essas pontuações são usadas para análise de H-score (0-300).

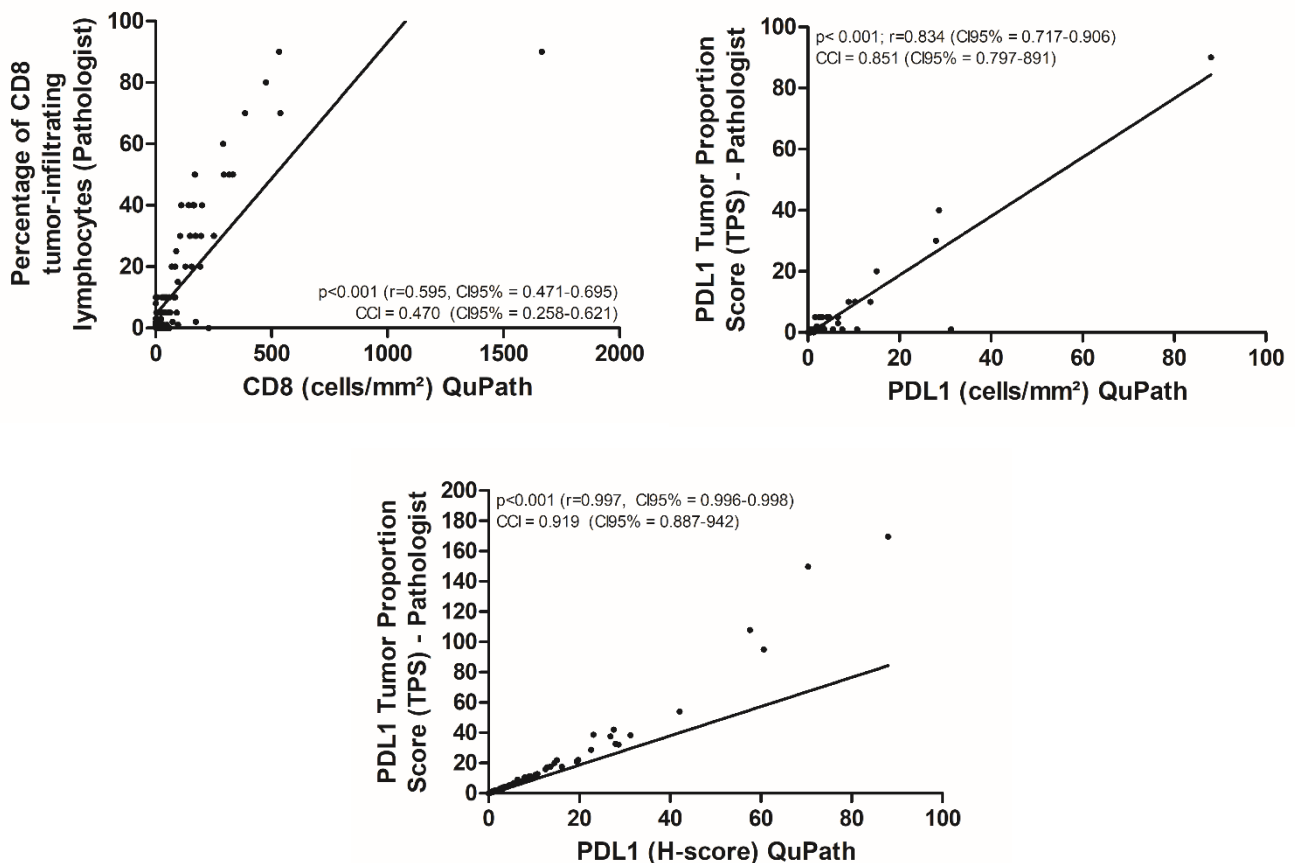


Figura 7 – Análise de correlação e consistência interna da imunexpressão para CD8 e PDL1 por meio de um algoritmo. * $p < 0,001$, correlação de Spearman no software Prisma.

Referências

1. Cimino-Mathews A: **Novel uses of immunohistochemistry in breast pathology: interpretation and pitfalls.** *Mod Pathol* 2021, **34**:62-77.
2. McGinnis LM, Ibarra-Lopez V, Rost S, Ziai J: **Clinical and research applications of multiplexed immunohistochemistry and in situ hybridization.** *J Pathol* 2021, **254**:405-417.
3. Oh KS, Mahalingam M: **Immunohistochemistry as a Genetic Surrogate in Dermatopathology: Pearls and Pitfalls.** *Adv Anat Pathol* 2019, **26**:390-420.
4. Ross J, Li G, Yang XJ: **Application and Pitfalls of Immunohistochemistry in Diagnosis of Challenging Genitourinary Cases.** *Arch Pathol Lab Med* 2020, **144**:290-304.
5. Shah AA, Bourne TD, Murali R: **BAP1 protein loss by immunohistochemistry: a potentially useful tool for prognostic prediction in patients with uveal melanoma.** In *Pathology*, vol. 45. pp. 651-656; 2013:651-656.
6. Shelton J, Purgina BM, Cipriani NA, Dupont WD, Plummer D, Lewis JS, Jr.: **p16 immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a comparison of antibody clones using patient outcomes and high-risk human papillomavirus RNA status.** *Mod Pathol* 2017, **30**:1194-1203.
7. Hardy LB, Fitzgibbons PL, Goldsmith JD, Eisen RN, Beasley MB, Souers RJ, Nakhleh RE: **Immunohistochemistry validation procedures and practices: a College of American Pathologists survey of 727 laboratories.** *Arch Pathol Lab Med* 2013, **137**:19-25.
8. Satturwar S, Malenie R, Sutton A, Dai D, Aly FZ: **Validation of immunohistochemical tests performed on cytology cell block material: Practical application of the College of American Pathologists' guidelines.** *Cytojournal* 2019, **16**:6.
9. Guo H, Ding Q, Gong Y, Gilcrease MZ, Zhao M, Zhao J, Sui D, Wu Y, Chen H, Liu H, et al: **Comparison of three scoring methods using the FDA-approved**

- 22C3 immunohistochemistry assay to evaluate PD-L1 expression in breast cancer and their association with clinicopathologic factors.** *Breast Cancer Res* 2020, **22**:69.
10. McGinnis LM, Ibarra-Lopez V, Rost S, Ziai J: **Clinical and research applications of multiplexed immunohistochemistry and in situ hybridization.** In *The Journal of pathology*, vol. 254. pp. 405-417; 2021:405-417.
 11. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC: **Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer.** *J Clin Oncol* 1999, **17**:1474-1481.
 12. McCarty KS, Jr., Szabo E, Flowers JL, Cox EB, Leight GS, Miller L, Konrath J, Soper JT, Budwit DA, Creasman WT, et al.: **Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors.** *Cancer Res* 1986, **46**:4244s-4248s.
 13. Ilyas M, Grabsch H, Ellis IO, Womack C, Brown R, Berney D, Fennell D, Salto-Tellez M, Jenkins M, Landberg G, et al: **Guidelines and considerations for conducting experiments using tissue microarrays.** *Histopathology* 2013, **62**:827-839.
 14. Loughrey MB, Bankhead P, Coleman HG, Hagan RS, Craig S, McCorry AMB, Gray RT, McQuaid S, Dunne PD, Hamilton PW, et al: **Validation of the systematic scoring of immunohistochemically stained tumour tissue microarrays using QuPath digital image analysis.** *Histopathology* 2018, **73**:327-338.
 15. Gray RT, Cantwell MM, Coleman HG, Loughrey MB, Bankhead P, McQuaid S, O'Neill RF, Arthur K, Bingham V, McGready C, et al: **Evaluation of PTGS2 Expression, PIK3CA Mutation, Aspirin Use and Colon Cancer Survival in a Population-Based Cohort Study.** *Clin Transl Gastroenterol* 2017, **8**:e91.
 16. Gurgel DC, Wong DVT, Bandeira AM, Pereira JFB, Gomes-Filho JV, Pereira AC, Barros Silva PG, Tavora FRF, Pereira AF, Lima-Junior RCP, Almeida

- PRC: **Cytoplasmic CCR7 (CCR7c) immunoexpression is associated with local tumor recurrence in triple-negative breast cancer.** *Pathol Res Pract* 2020, **216**:153265.
17. Ozbudak IH, Shilo K, Tavora F, Rassaei N, Chu WS, Fukuoka J, Jen J, Travis WD, Franks TJ: **Glucose transporter-1 in pulmonary neuroendocrine carcinomas: expression and survival analysis.** *Mod Pathol* 2009, **22**:633-638.
 18. Morais CE, Gurgel DC, Teixeira AC, Mattos TVA, Silva A, Tavora F: **Prevalence of ERG expression and PTEN loss in a Brazilian prostate cancer cohort.** *Braz J Med Biol Res* 2019, **52**:e8483.
 19. Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, et al: **QuPath: Open source software for digital pathology image analysis.** *Sci Rep* 2017, **7**:16878.
 20. Humphries MP, Maxwell P, Salto-Tellez M: **QuPath: The global impact of an open source digital pathology system.** In *Computational and structural biotechnology journal*, vol. 19. pp. 852-859; 2021:852-859.
 21. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PI, et al: **Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research.** *Advances in Anatomic Pathology* 2017, **24**:235-251.
 22. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, et al: **QuPath: Open source software for digital pathology image analysis.** *Scientific Reports* 2017, **7**.
 23. Kilvaer TK, Paulsen EE, Andersen S, Rakaee M, Bremnes RM, Busund LR, Donnem T: **Digitally quantified CD8+ cells: the best candidate marker for**

- an immune cell score in non-small cell lung cancer?** *Carcinogenesis* 2020, **41**:1671-1681.
24. Humphries MP, Hynes S, Bingham V, Cougot D, James J, Patel-Socha F, Parkes EE, Blayney JK, O'Rorke MA, Irwin GW, et al: **Automated Tumour Recognition and Digital Pathology Scoring Unravels New Role for PD-L1 in Predicting Good Outcome in ER-/HER2+ Breast Cancer.** *J Oncol* 2018, **2018**:2937012.
25. Ram S, Vizcarra P, Whalen P, Deng S, Painter CL, Jackson-Fisher A, Pirie-Shepherd S, Xia X, Powell EL: **Pixelwise H-score: A novel digital image analysis-based metric to quantify membrane biomarker expression from immunohistochemistry images.** *PLoS One* 2021, **16**:e0245638.
26. Morriss NJ, Conley GM, Ospina SM, Meehan WP, Qiu J, Mannix R: **Automated Quantification of Immunohistochemical Staining of Large Animal Brain Tissue Using QuPath Software.** In *Neuroscience*, vol. 429. pp. 235-244: Elsevier Ltd; 2020:235-244.
27. Oh KS, Mahalingam M: **Immunohistochemistry as a Genetic Surrogate in Dermatopathology: Pearls and Pitfalls.** In *Advances in anatomic pathology*, vol. 26. pp. 390-420; 2019:390-420.
28. Meyerholz DK, Beck AP: **Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research.** *Lab Invest* 2018, **98**:844-855.
29. Favresse J, Lardinois B, Chatelain B, Mullier F, Jacqmin H: **A reminder of the place of morphology and the H-score in the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH).** *Clin Case Rep* 2018, **6**:527-528.
30. Vougiouklakis T, Belovarac BJ, Lytle A, Chiriboga L, Ozerdem U: **The diagnostic utility of EZH2 H-score and Ki-67 index in non-invasive breast apocrine lesions.** *Pathol Res Pract* 2020, **216**:153041.
31. Yang Y, Xiao M, Song Y, Tang Y, Luo T, Yang S, He W, Cheng Q, Ma L, Zhang Y, et al: **H-score of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase in the histopathological diagnosis of adrenocortical tumors.** *Endocrine* 2019, **65**:683-691.

32. Lu X, Yu P, Tao H, Chen Y, Lu J: **[Correlation between TOPA2A gene expression and the number of CD4(+) T cells in hepatocellular carcinoma and its clinical prognostic significance]**. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2022, **38**:24-31.
33. Junger H, Dobi D, Chen A, Lee L, Vasquez JJ, Tang Q, Laszik ZG: **Novel In Situ Hybridization and Multiplex Immunofluorescence Technology Combined With Whole-slide Digital Image Analysis in Kidney Transplantation**. *J Histochem Cytochem* 2020, **68**:445-459.
34. Levy-Jurgenson A, Tekpli X, Kristensen VN, Yakhini Z: **Spatial transcriptomics inferred from pathology whole-slide images links tumor heterogeneity to survival in breast and lung cancer**. *Sci Rep* 2020, **10**:18802.
35. Officer LK, Andreou KE, Teodósio AV, He Z, Le Quesne JP: **Automated Co-in Situ Hybridization and Immunofluorescence Using Archival Tumor Tissue**. *Methods Mol Biol* 2020, **2148**:245-256.
36. Amgad M, Stovgaard ES, Balslev E, Thagaard J, Chen W, Dudgeon S, Sharma A, Kerner JK, Denkert C, Yuan Y, et al: **Report on computational assessment of Tumor Infiltrating Lymphocytes from the International Immunology Biomarker Working Group**. *npj Breast Cancer* 2020, **6**.
37. Corredor G, Wang X, Zhou Y, Lu C, Fu P, Syrigos K, Rimm DL, Yang M, Romero E, Schalper KA, et al: **Spatial Architecture and Arrangement of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Predicting Likelihood of Recurrence in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer**. *Clinical Cancer Research* 2018, **25**:1526-1534.
38. Klauschen F, Müller KR, Binder A, Bockmayr M, Hägele M, Seegerer P, Wienert S, Pruneri G, de Maria S, Badve S, et al: **Scoring of tumor-infiltrating lymphocytes: From visual estimation to machine learning**. *Seminars in Cancer Biology* 2018, **52**:151-157.
39. Lu S, Stein JE, Rimm DL, Wang DW, Bell JM, Johnson DB, Sosman JA, Schalper KA, Anders RA, Wang H, et al: **Comparison of Biomarker**

- Modalities for Predicting Response to PD-1/PD-L1 Checkpoint Blockade.** *JAMA Oncology* 2019, **5**:1195.
40. Udall M, Rizzo M, Kenny J, Doherty J, Dahm S, Robbins P, Faulkner E: **PD-L1 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics.** *Diagnostic Pathology* 2018, **13**.
 41. van der Heijden MS, Loriot Y, Duran I, Ravaud A, Retz M, Vogelzang NJ, Nelson B, Wang J, Shen X, Powles T: **Atezolizumab Versus Chemotherapy in Patients with Platinum-treated Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma: A Long-term Overall Survival and Safety Update from the Phase 3 IMvigor211 Clinical Trial.** *Eur Urol* 2021, **80**:7-11.
 42. Sotelo M, Alonso-Gordoa T, Gajate P, Gallardo E, Morales-Barrera R, Perez-Gracia JL, Puente J, Sanchez P, Castellano D, Duran I: **Atezolizumab in locally advanced or metastatic urothelial cancer: a pooled analysis from the Spanish patients of the IMvigor 210 cohort 2 and 211 studies.** *Clin Transl Oncol* 2021, **23**:882-891.
 43. Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, Powles T, Petrylak DP, Bellmunt J, Loriot Y, Necchi A, Hoffman-Censits J, Perez-Gracia JL, et al: **Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial.** *Lancet* 2017, **389**:67-76.
 44. Weyerer V, Strissel PL, Strick R, Sikic D, Geppert CI, Bertz S, Lange F, Taubert H, Wach S, Breyer J, et al: **Integration of Spatial PD-L1 Expression with the Tumor Immune Microenvironment Outperforms Standard PD-L1 Scoring in Outcome Prediction of Urothelial Cancer Patients.** *Cancers (Basel)* 2021, **13**.
 45. Gevaert T, Cimadamore A, Montironi R, Eckstein M: **PD-L1 Testing for Urothelial Carcinoma: Interchangeability, Reliability and Future Perspectives.** *Curr Drug Targets* 2021, **22**:162-170.

46. Tsao M, Kerr K, Yatabe Y, Hirsch FR: **PL 03.03 Blueprint 2: PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life, Clinical Samples.** *Journal of Thoracic Oncology* 2017, **12**:S1606.
47. Doroshow DB, Bhalla S, Beasley MB, Sholl LM, Kerr KM, Gnjatic S, Wistuba, II, Rimm DL, Tsao MS, Hirsch FR: **PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors.** *Nat Rev Clin Oncol* 2021, **18**:345-362.
48. Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, Ng HHM, Wu D, Wee YTF, Lim JCT, Yeong J, Lim TKH: **Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy.** *Cancer Commun (Lond)* 2020, **40**:135-153.
49. Viratham Pulsawatdi A, Craig SG, Bingham V, McCombe K, Humphries MP, Senevirathne S, Richman SD, Quirke P, Campo L, Domingo E, et al: **A robust multiplex immunofluorescence and digital pathology workflow for the characterisation of the tumour immune microenvironment.** *Mol Oncol* 2020, **14**:2384-2402.
50. Xie Y, Olkhov-Mitsel E, Alminawi S, Slodkowska E, Downes MR: **Development of a multiplex immuno-oncology biomarker and digital pathology workflow for assessment of urothelial carcinoma.** *Pathol Res Pract* 2021, **226**:153607.
51. Deroulers C, Ameisen D, Badoual M, Gerin C, Granier A, Lartaud M: **Analyzing huge pathology images with open source software.** *Diagn Pathol* 2013, **8**:92.
52. Huang W, Randhawa R, Jain P, Iczkowski KA, Hu R, Hubbard S, Eickhoff J, Basu H, Roy R: **Development and Validation of an Artificial Intelligence-Powered Platform for Prostate Cancer Grading and Quantification.** *JAMA Netw Open* 2021, **4**:e2132554.
53. Ryu HS, Jin MS, Park JH, Lee S, Cho J, Oh S, Kwak TY, Woo JI, Mun Y, Kim SW, et al: **Automated Gleason Scoring and Tumor Quantification in Prostate Core Needle Biopsy Images Using Deep Neural Networks and Its Comparison with Pathologist-Based Assessment.** *Cancers (Basel)* 2019, **11**.

54. Hanna MG, Reuter VE, Ardon O, Kim D, Sirintrapun SJ, Schöffler PJ, Busam KJ, Sauter JL, Brogi E, Tan LK, et al: **Validation of a digital pathology system including remote review during the COVID-19 pandemic.** *Mod Pathol* 2020, **33**:2115-2127.

4.2 Capítulo 2

“Expressão de GSK3- β , PD-L1 e CD8 em carcinomas uroteliais, associação com o grau do tumor e sobrevida global” (*Expression of tumoral GSK3- β , PD-L1, and CD8 cell density in urothelial carcinomas, association with tumor grade and overall survival*).

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology - the APMIS journal* (APMIS-0-0- 7534).

Resumo

Objetivo: Investigar a expressão proteica de PD-L1 e GSK-3 β e o infiltrado imunológico com CD8 em carcinomas de bexiga.

Materiais e métodos: Este foi um estudo transversal e retrospectivo, composto por 140 amostras de carcinomas uroteliais de 2015 a 2018. Análise de escore em uma plataforma automatizada digitalmente assistida e análises convencionais dos marcadores de GSK-3 β (27C10), CD8 (7103 β) e PDL-1 (22c3), foram revisados por dois patologistas de forma independente e um escore histológico foi calculado. A densidade de CD8 também foi avaliada. Testes de Mann-Whitney, X², Log-Rank Mantel-Cox e regressão de Cox foram usados (SPSS, p<0.05).

Resultados: A imunoexpressão de GSK-3 β (91%) esteve presente na maioria das amostras, PD-L1 em 62,9% e células CD8 presentes em 46,3% dos casos. Quando analisados em conjunto, os níveis de GSK-3 β e PD-L1 (p=0,033), e CD8 e PD-L1 (p<0,002) apresentaram correlações significativas. Não foram observadas associações significativas entre GSK-3 β e CD8. A positividade de GSK-3 β e PD-L1 foi predominante em tumores de alto grau e em análise multivariada o grau tumoral (p=0.040) e a imunoexpressão de PDL1 (p=0.043) influenciaram significativamente a sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Conclusão: Na maioria das amostras foram observados positividade de células CD8 no infiltrado, sendo os mesmos associados ao prognóstico. Dados esses que contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos imune envolvidos no câncer de bexiga. Um aumento da expressão de CD8, GSK-3 β e PDL1 pode ser valiosa e GSK-3 β pode ser um alvo potencial na detecção do câncer de bexiga avançado, especialmente no contexto da avaliação da resposta a imunoterapia.

Palavras chaves: Câncer de bexiga, Carcinoma urotelial, Imunoterapia, PD-L1, GSK-3 β , CD8, Imuno-histoquímica.

Introdução

O câncer de bexiga é a neoplasia mais comum do trato urinário e é a primeira causa de morte entre os cânceres urológicos humanos. Mais de 575 mil novos casos de câncer de bexiga são estimados em todo o mundo para 2020 - 2022, variando de acordo com regiões específicas. (1) Índices do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostraram que a taxa de novos casos de câncer de bexiga no Brasil de 2020 a 2022 seria de 7.590 casos para homens e 3.050 para mulheres. (2) O subtipo histológico mais comum é o carcinoma urotelial e suas variantes, seguido pelo carcinoma espinocelular e adenocarcinoma. O carcinoma urotelial é mais frequente em homens do que em mulheres, com proporções de 3:1, acompanhado por altas taxas de incidência proporcionalmente na faixa etária de 60 a 70 anos e por altas taxas de recidiva após a ressecção. (3)

A glicogênio sintase quinase (GSK-3) é uma serina/treonina quinase que foi originalmente identificada como reguladora do metabolismo do glicogênio, composta pelas duas isoformas GSK- α e GSK- β (GSK-3 β) e ambas codificadas por diferentes genes localizados no cromossomo /7, cromossomo/19, cromossomo/16, cromossomo/3. (4) (5) (6) Recentemente, vários estudos observaram que a GSK-3 β está diretamente ligada aos processos de transformação neoplásica, crescimento tumoral e metástase. (7, 8) A GSK-3 β foi identificada como um novo alvo terapêutico promissor no câncer de bexiga. (5) Mais recentemente, uma nova molécula que atua como inibidor de GSK-3 β , 9-ING-41, mostrou atividade antitumoral em linhagens celulares de câncer de bexiga. (9) Clinicamente, essa droga tem demonstrado efeitos antitumorais em neuroblastoma, linfoma de células B, glioblastoma, câncer de ovário, pâncreas, rim e mama. (6)

A GSK-3 β tem demonstrado atuar na regulação do ciclo celular, apoptose e resposta imune em diversos tipos de câncer, com sua marcação nuclear ligada ao alto grau tumoral. É constitutivamente ativo nas células T em repouso. (7,8) A proteína de morte celular programada 1 (PD-1) é um receptor inibitório também presente nas células T, e com seu ligante provoca a indução e manutenção da resposta imune. Assim, a interação de PD1 e PD-L1 aumenta a atividade das células T, causando uma reação antitumoral e a inativação de GSK- β bloqueia a expressão de PD1 em linfócitos CD8. (17) A expressão de GSK-3 β ativa também pode inibir a proliferação de células T. (18) Neste estudo, nosso objetivo foi avaliar a imunomarcação de GSK-3 β em câncer de

bexiga e sua associação com o escore de proporção tumoral PD-L1 e células infiltrantes CD8 positivas no microambiente tumoral, sobrevida global, livre da doença e série de carcinomas uroteliais.

Materiais e métodos

Amostras

Trata-se de um estudo observacional, transversal, retrospectivo e analítico em uma população diagnosticada com câncer de bexiga em uma única instituição entre 2015 e 2018.

Cento e quarenta (140) pacientes com carcinoma urotelial provenientes de amostras de ressecções transuretrais e cistectomias radicais, foram analisados e incluídos de acordo com os critérios de inclusão. Os dados clínicos e laboratoriais foram coletados em prontuários eletrônicos nas respectivas unidades hospitalares onde cada paciente estava sendo acompanhado. Foram incluídas todas as amostras de pacientes com diagnóstico de câncer de bexiga invasivo e não invasivo confirmado por análise histológica, com material suficiente para a construção do *Tissue Microarray* (TMA). Foram excluídas as amostras que não possuíam materiais disponíveis para a construção do TMA, que foram submetidas à terapia neoadjuvante, BCG e radioterapia antes da captação das amostras. Os blocos e lâminas foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (Protocolo: 3.997.304).

Microarray tecidual e imuno-histoquímica

O preparo da TMA foi descrito de acordo com Filho et al. (2021). Resumidamente, as lâminas histológicas foram revisadas por um patologista geniturinário experiente e foram selecionadas áreas da frente invasiva do tumor e áreas com presença de inflamação. Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos de 3µm, posteriormente fixados em lâminas de microscópio FLEX IHC (Agilent®). A imunocoloração GSK-3β (27C10, 1:100, CellSignaling®), CD8 (m7103, Dako®) e PDL-1 (22c3, Dako®) foi realizada de acordo com protocolos individuais para cada anticorpo em máquinas Ventana BenchMark GX, Agilent Autostainer e reação manual.

Resumidamente, o GSK-3 β seguiu o processo de recuperação do antígeno no equipamento PT Link com solução tampão pH 6,0, uso do kit Envision Flex (Agilent) para bloqueio da peroxidase endógena, incubação durante a noite com anticorpo primário (correspondente a 12 horas de reação), amplificação imunológica e contracoloração com EnVision FLEX (Dako® K4065) + DAB (Dako® K3469).

As lâminas foram digitalizadas no equipamento 3DHistech (Pannoramic Desk®). Os arquivos foram então importados para o software Qupath®, o que permitiu ampla análise. Os arquivos foram carregados em um projeto no software QuPath (código-fonte do QuPath, documentação e links para download do software estão disponíveis em <https://qupath.github.io>). O recurso de segmentação do QuPath pode detectar milhares de células, identificá-las como objetos de maneira hierárquica abaixo da anotação, poços de TMA ou casos e medir a morfologia celular e a expressão de biomarcadores ao mesmo tempo.

A densidade de CD8 foi calculada executando um script no QuPath com uma saída de células positivas para CD8/mm² de tecido (para cada poço). Para pontuação PD-L1 e GSK-3 β , as análises foram executadas com base na detecção de células positivas e coloração de membrana, nuclear e citoplasma. A quantificação de citoplasma positivo (coloração DAB média) foi medida apenas em células detectadas como tumorais e ausência de estroma e outras células. A saída do QuPath foi capaz de identificar números de células GSK-3B positivas/mm² e, além disso, o método H-score foi aplicado pelo software, baseado na extensão e intensidade da coloração citoplasmática (1-3), multiplicada pela porcentagem de células positivas (pontuação de proporção), com uma faixa de escore variando de 0-300.

Análise do patologista

Todos os casos avaliados por análises de software no QuPath foram confirmados por dois patologistas experientes (> 10 anos de experiência) (FT e CDN). As lâminas de avaliação foram digitalizadas em aumento de 400x digitalizadas no equipamento 3DHistech (Pannoramic Desk®). Essas análises foram calibradas com excelente concordância entre elas (coeficiente de correlação interclasse = 0,810, = 0,991 e 0,920 para CD8, PDL1 e GSK-3 β , respectivamente). A contagem do número de células, porcentagem e intensidade de imunocoloração foi realizada por cada patologista para marcação de CD8+/mm² e GSK-3 β para calcular o H-score. Um patologista pontua

PD-L1 em cada poço usando o método estabelecido de *Tumor Proportion Score* (TPS) (0-100) (DUDNIK et al., 2021; RODRIGUES et al., 2022). Foi definido como a porcentagem de células tumorais viáveis mostrando coloração PD-L1 de membrana parcial ou completa em qualquer intensidade.

Abordagem Estatística

A mediana \pm DP da imunocoloração foi calculada por cada método e analisada pela correlação de Spearman e teste de Mann-Whitney (ambos dados não paramétricos). Os dados clínicos foram apresentados como frequências absolutas e percentuais e a imunocoloração de cada imunomarcador foi categorizada por pontos de cortes por conveniência (ponto de corte GSK-3 β H-score = 100; CD8 = ponto de corte = 20; ponto de corte PDL1 = 0) e associada aos dados clínicos pelo teste de qui-quadrado. As curvas de Kaplan-Meier foram usadas para calcular o tempo livre de recorrência (recidiva local, segundo tumor primário, metástase por via linfonodal ou à distância, após o início do tratamento e óbito) e a sobrevida global (mortalidade dos pacientes com carcinoma urotelial) e o modelo de regressão Log-Rank de Mantel-Cox e Cox foram usados para determinar os fatores de risco para recorrência e óbito. Todas as análises foram realizadas no SPSS v20.0 for Windows (IMB®).

Adicionalmente, curvas ROC foram utilizadas para os marcadores tendo como desfecho o óbito, a fim de estimar pontos de imunoexpressão sugestivos de pior prognóstico.

Resultados

Caracterização clínica e epidemiológica de pacientes com carcinoma urotelial

Foram incluídos 140 pacientes, com amostras obtidas por ressecção transuretral ou cistectomias totais. A coorte final constituiu de 140 amostras de tecido de carcinoma urotelial, a maioria de homens (n=109, 77,9%). A média de idade dos pacientes foi de 74,9 \pm 13,1 anos, variando de 24 a 108 anos. A maioria dos pacientes tinha mais de 70 anos (n=93, 66,4%). Tabagismo e hipertensão arterial sistêmica foram descritos em 21 pacientes e diabetes mellitus em apenas quatro (Tabela 1).

A maioria foi submetida a cirurgia, seja ressecção transuretral da bexiga ou cistectomia, (n=73, 88,0%), 27 (32,5%) pacientes foram submetidos à quimioterapia

adjuvante e 8 (9,6%) à radioterapia adjuvante. Histologicamente, invasão do músculo esteve presente em 83 (59,3%) pacientes e necrose em 24 (17,1%). A maioria dos tumores foi classificada como de alto grau (n=101, 75,9%). Todos os tumores invasivos eram de alto grau (n=66, 65,3%) (Tabela 1).

As curvas ROC determinaram como pontos de corte sugestivos de prognóstico (>0%) para PDL1, (>200) para GSK e (>20) para CD8.

Perfil de imunexpressão para GSK-3 β em pacientes com câncer de bexiga e sua relação com a imunexpressão de CD8 e PDL1

Alta imunexpressão de GSK-3 β (H-score acima de 200) foi observada em 12 pacientes (9,0%) (Figura A e B) e seis amostras não puderam ser avaliadas devido à perda de tecido nos cortes. No geral, o escore H médio da GSK-3 β foi de $71,98 \pm 73,98$, variando de 0 a 300. A GSK-3 β nuclear foi observada em 25 casos (18,8%) indicando maior agressividade tumoral conforme exposto na literatura, dos quais 20 (80,0%) casos eram de alto grau (p = 0,598). Tumores com GSK-3 β nuclear apresentaram PD-L1 TPS+ de 60,7%, comparado a TPS de 63,4% em tumores sem GSK-3 β nuclear (p=0,793) (Tabela 2).

Em relação ao PDL1, 52 (37,1%) pacientes não apresentaram imunexpressão tumoral para PDL1 e 88 (62,9%) apresentaram marcação focal. A pontuação média de proporção tumoral PDL1 (TPS) foi de $9,00 \pm 23,60\%$, variando de 0 a 100 (Tabelas 2, 3 e 4, Figura 1c e d).

Os linfócitos CD8+ positivos estavam totalmente ausentes em apenas quatro amostras (2,9%). A densidade média de CD8 foi de $61,10 \pm 101,94$ células/mm², variando de 0 a 538 células/mm². Setenta e cinco (54,0%) amostras apresentaram menos de 20 células/mm² e 64 (46,0%) exibiram mais de 20 células/mm² (Figura 1E e F). Apenas uma amostra não foi avaliada devido à perda tecidual na coloração imunohistoquímica de CD8.

Houve associação significativa entre GSK-3 β e PDL1 (p=0,033), mas não do GSK-3 β com CD8 (p=0,760). No entanto, a imunexpressão de CD8 foi significativamente associada à positividade do tumor PDL1 (p<0,002) (Tabela 4).

A imunexpressão de GSK-3 β não foi significativamente influenciada por quaisquer características clínicas, terapêuticas e histopatológicas. A positividade de

PDL1 foi associada a tumores de alto grau ($p=0,030$) e a densidade de linfócitos CD8+ foi inversamente associada ao tratamento prévio com RT ($p=0,021$) (Tabela 4).

Análise da sobrevida global e livre de doença no câncer de bexiga com invasão da camada muscular

No geral, a sobrevida média livre de recidiva foi de $50,63 \pm 7,66$ meses, com 80,0% dos pacientes sem recidiva em 2021. A sobrevida global média foi de $76,06 \pm 4,69$, com 89,5% dos pacientes vivos no período avaliado. Na análise univariada, nenhuma variável afetou o tempo livre de recaída. A positividade de PDL1 na análise multivariada, teve um risco 5,81 vezes maior em pacientes com recorrência (IC 95% 1,06-31,80). Tumores de alto grau, como esperado, aumentam o risco de recorrência em 9,09 (IC 95% 1,11-100,00) vezes, independente das demais variáveis (Tabela 5).

Discussão

O estudo investigou 140 casos de câncer de bexiga, uma coorte predominante no sexo masculino com proporção de 3:1 e mais da metade dos pacientes tinha mais de 75 anos, semelhante à literatura recente. (1) (19) (20) A incidência de câncer de bexiga no mundo apresenta diferenças de acordo com os padrões geográficos, com maior prevalência em fumantes. Ao longo do tempo, alguns países, como Espanha, Holanda, Alemanha e Rússia, aumentaram o número de mulheres com câncer de bexiga devido ao aumento do consumo de tabaco. (21) Infelizmente, não tivemos história de tabagismo em todos os pacientes por falta de dados nos prontuários eletrônicos, sendo uma das limitações do estudo.

O bloqueio do checkpoint imunológico com anti-PD1 ou anti-PDL1 é um tratamento altamente promissor para carcinomas uroteliais. Um estudo recente de fase III para carcinoma de bexiga músculo-invasivo comparou nivolumabe adjuvante com placebo, mostrou uma sobrevida livre de doença mais prolongada, especialmente em pacientes com mais de 1% de expressão de PD-L1. (22) Neste estudo, mais de 60% dos pacientes apresentaram pelo menos 1% de positividade para PD-L1, com forte associação com infiltrados imunes CD8-positivos e uma associação em grau menor com a expressão de GSK-3 β . Outros estudos avaliaram pembrolizumabe e atezolizumabe em

combinação ou monoterapia, com melhor resposta global em pacientes com tumores PD-L1 positivos. (23) (24) Atualmente, esses medicamentos são aprovados em alguns países como monoterapia para pacientes positivos para PD-L1 (escore acima de 5%) considerados inelegíveis para cisplatina. (25)

A expressão de GSK-3 β já foi descrita em pacientes com câncer de mama, pulmão, pâncreas, câncer colorretal e leucemia. (26) (27) No entanto, o papel específico dessa proteína no câncer de bexiga ainda é desconhecido. (28) (9) (10) A associação de PD-L1 e GSK-3 β tem sido estudada em outras neoplasias, e os presentes achados de que pacientes com PD-L1 tiveram maior frequência de expressão forte de GSK-3 β , já foram relatados anteriormente. (29) Apesar de não encontrar uma correlação significativa de GSK-3 β com linfócitos infiltrantes de CD8, sugeriu-se que a inativação por GSK-3 β bloqueia a expressão de PD1 em linfócitos T citotóxicos CD8+, aumentando a imunidade celular por meio dessa regulação negativa de PD-1. (30, 31)

Os dados deste estudo mostraram uma correlação significativa entre a densidade de linfócitos CD8 e com a expressão tumoral de PD-L1. Além disso, pacientes com maior índice de GSK-3 β apresentaram positividade para PDL1, sugerindo desregulação do comportamento celular, causando maior expressão de PD-L1, e possivelmente causando evasão nos mecanismos de imunidade. (32) Com base nessa suposição, quando essa associação foi avaliada em pacientes tratados com radioterapia, as células T, que também podem superexpressar PDL-1, contribuem para a prevenção do reconhecimento de células tumorais. Assim, nossos dados mostraram que os tumores tratados com radioterapia apresentaram menor expressão de CD8, diferentemente dos casos não irradiados. Em um estudo “in vitro” de Lhuillier et al 2021, foi possível avaliar a imunogenicidade de neoepítomos que foram suprarregulados pela radiação, observando que a radioterapia aumenta a presença de genes codificadores de neoepítomos imunogênicos do MHC-I e MHC-II, resultando em expressão de TCD8 e resposta celular CD4, mas é necessários mais estudos complementares para compreender essa imoexpressão. (33)

Embora os achados não tenham encontrado associação significativa na análise da sobrevida global, a expressão de PD-L1 isoladamente foi associada à recorrência, como visto por Gu et al. no câncer gástrico. (34) No entanto, estes são resultados preliminares em um coorte retrospectiva de um cenário de tratamento heterogêneo. A regulação da expressão de PD-L1 pode afetar o efeito terapêutico dos inibidores do

checkpoint imunológico. Um estudo sugeriu que GSK-3 β interage e fosforila PD-L1, permitindo assim a estabilização de PD-L1 e, assim, suprimindo a atividade das células T. (35) Em um estudo de melanoma, por exemplo, eEF2K, que promove a proliferação de células cancerígenas regulando a glicólise aeróbica, foi positivamente correlacionado com a expressão de PD-L1 e fosfo-GSK-3 β , sugerindo um mecanismo molecular subjacente à regulação de PD-L1 tumoral e descoberto um papel inibitório de eEF2K e GSK-3 β na imunidade antitumoral. (36)

Neste estudo, foi usado uma poderosa ferramenta de patologia digital para medir a expressão de PD-L1 e GSK-3 β juntamente com infiltrados de células CD8-positivas, com confirmação por avaliação de um patologista. Sabe-se que no câncer a GSK-3 β tem atividades de promoção e supressão tumoral, assim, pode ser um alvo potencial no câncer de bexiga avançado, e os inibidores podem servir como terapia adjuvante, especialmente no contexto da imunoterapia, para pacientes que não são candidatos à terapia convencional ou cirurgia.

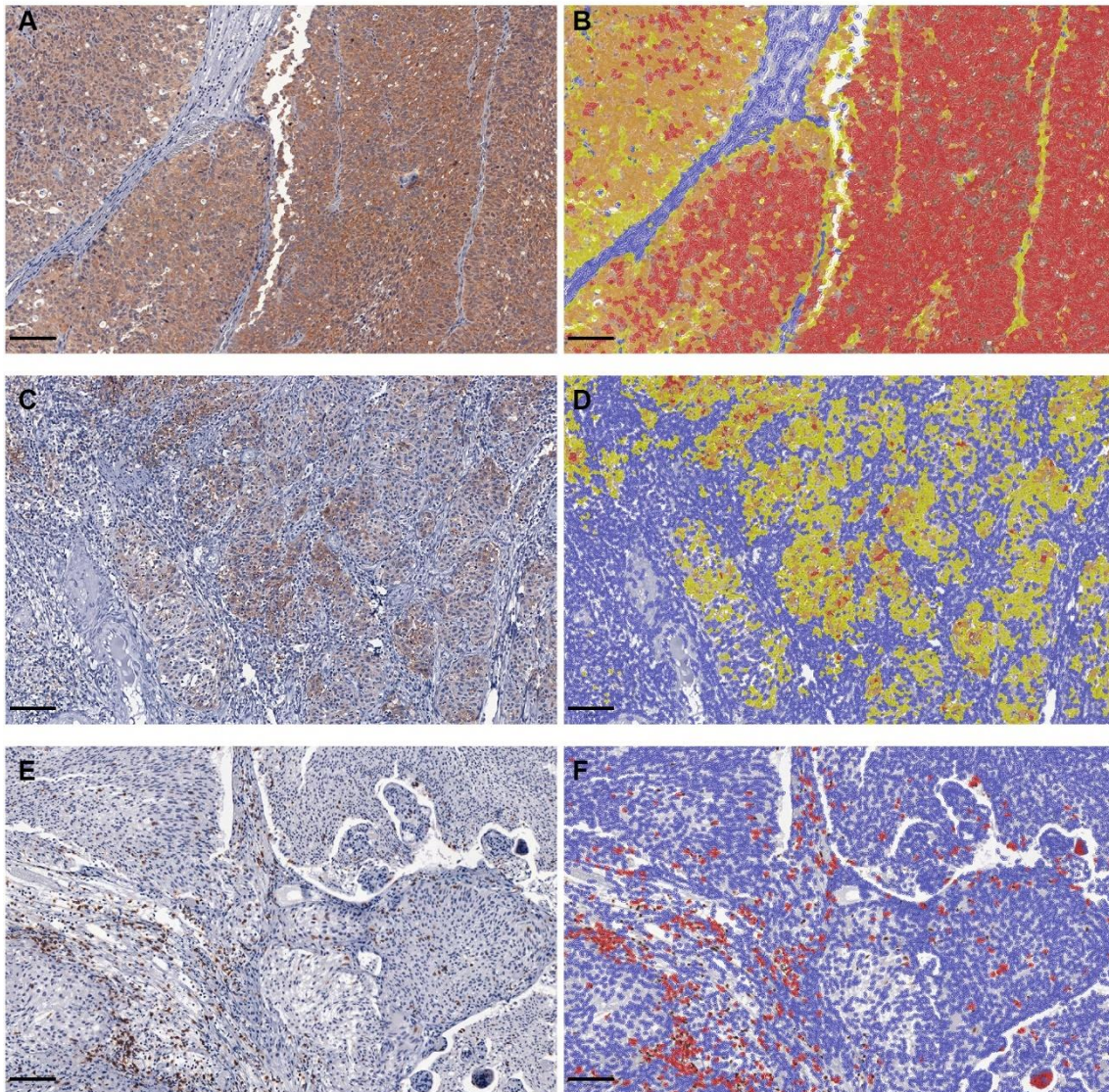


Figura 1. Painel esquemático mostrando os resultados da reação imuno-histoquímica para GSK-3 β (A e B), PD-L1 (C e D) e CD8 (E e F). Os painéis B, D e F são representações gráficas das saídas de cores do Qupath. As saídas de cores para PD-L1 e GSK são azul para negativo, amarelo para positividade fraca, laranja para positividade moderada e vermelho para positividade forte. Essas pontuações são usadas na calculadora o H-score. A saída de cor para detecção positiva de CD8 usou um único limite (vermelho) para células positivas. Barra = 100 μ m.

Referências

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Silva INdCJAGd. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. INCA Rio de Janeiro; 2019.
3. Richters A, Aben KKH, Kiemeny LALM. The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World Journal of Urology.* 2019;38(8):1895-904.
4. Bilim V, Ougolkov A, Yuuki K, Naito S, Kawazoe H, Muto A, et al. Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2009;101(12):2005-14.
5. Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2001;2(10):769-76.
6. Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR. GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2011;4.
7. Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Molecular Cancer.* 2010;9(1):144.
8. Mishra R, Nagini S, Rana A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. *Molecular Cancer.* 2015;14(1):20.
9. Kuroki H, Anraku T, Kazama A, Bilim V, Tasaki M, Schmitt D, et al. 9-ING-41, a small molecule inhibitor of GSK-3 β , potentiates the effects of anticancer therapeutics in bladder cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):19977.
10. Naito S, Bilim V, Yuuki K, Uolkov A, Motoyama T, Nagaoka A, et al. Glycogen synthase kinase-3 β : a prognostic marker and a potential therapeutic target in human bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(21):5124-32.
11. Gaisina IN, Gallier F, Ougolkov AV, Kim KH, Kurome T, Guo S, et al. From a Natural Product Lead to the Identification of Potent and Selective Benzofuran-3-yl-(indol-3-yl)maleimides as Glycogen Synthase Kinase 3 β Inhibitors That Suppress Proliferation and Survival of Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2009;52(7):1853-63.

12. Hilliard TS, Gaisina IN, Muehlbauer AG, Gaisin AM, Gallier F, Burdette JE. Glycogen synthase kinase 3 β inhibitors induce apoptosis in ovarian cancer cells and inhibit in-vivo tumor growth. *Anti-Cancer Drugs*. 2011;22(10):978-85.
13. Naito S, Bilim V, Yuuki K, Ugolkov A, Motoyama T, Nagaoka A, et al. Glycogen Synthase Kinase-3 β : A Prognostic Marker and a Potential Therapeutic Target in Human Bladder Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(21):5124-32.
14. Allen SD, Liu X, Jiang J, Liao Y-P, Chang CH, Nel AE, et al. Immune checkpoint inhibition in syngeneic mouse cancer models by a silicasome nanocarrier delivering a GSK3 inhibitor. *Biomaterials*. 2021;269:120635.
15. Jellusova J, Cato MH, Apgar JR, Ramezani-Rad P, Leung CR, Chen C, et al. Gsk3 is a metabolic checkpoint regulator in B cells. *Nature Immunology*. 2017;18(3):303-12.
16. Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J*. 1990;9(8):2431-8.
17. Taylor A, Rothstein D, Rudd CE. Small-Molecule Inhibition of PD-1 Transcription Is an Effective Alternative to Antibody Blockade in Cancer Therapy. *Cancer Res*. 2018;78(3):706-17.
18. Ohteki T, Parsons M, Zakarian A, Jones RG, Nguyen LT, Woodgett JR, et al. Negative regulation of T cell proliferation and interleukin 2 production by the serine threonine kinase GSK-3. *J Exp Med*. 2000;192(1):99-104.
19. Hashmi AA, Rafique S, Haider R, Munawar S, Irfan M, Ali J. Prognostic Implications of Deep Muscle Invasion and High Grade for Bladder Urothelial Carcinoma. *Cureus*. 2020.
20. Patel VG, Oh WK, Galsky MD. Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(5):404-23.
21. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, 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*. 2021;71(3):209-49.
22. Bajorin DF, Witjes JA, Gschwend JE, Schenker M, Valderrama BP, Tomita Y, et al. Adjuvant Nivolumab versus Placebo in Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 2021;384(22):2102-14.

23. Grivas P, Plimack ER, Balar AV, Castellano D, O'Donnell PH, Bellmunt J, et al. Pembrolizumab as First-line Therapy in Cisplatin-ineligible Advanced Urothelial Cancer (KEYNOTE-052): Outcomes in Older Patients by Age and Performance Status. *Eur Urol Oncol*. 2020;3(3):351-9.
24. Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, Powles T, Petrylak DP, Bellmunt J, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2017;389(10064):67-76.
25. Valderrama BP, Gonzalez-Del-Alba A, Morales-Barrera R, Pelaez Fernandez I, Vazquez S, Caballero Diaz C, et al. SEOM-SOGUG clinical guideline for localized muscle invasive and advanced bladder cancer (2021). *Clin Transl Oncol*. 2022.
26. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015;148:114-31.
27. McCubrey JA, Rakus D, Gizak A, Steelman LS, Abrams SL, Lertpiriyapong K, et al. Effects of mutations in Wnt/beta-catenin, hedgehog, Notch and PI3K pathways on GSK-3 activity-Diverse effects on cell growth, metabolism and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(12):2942-76.
28. Agostinelli C, Carloni S, Limarzi F, Righi S, Laginestra MA, Musuraca G, et al. The emerging role of GSK-3 β in the pathobiology of classical Hodgkin lymphoma. *Histopathology*. 2017;71(1):72-80.
29. Zou W, Ye D, Liu S, Hu J, Zhu T, He F, et al. GSK-3 β Inhibitors Attenuate the PM2.5-Induced Inflammatory Response in Bronchial Epithelial Cells. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2021;16:2845-56.
30. Chen X, Wang K, Jiang S, Sun H, Che X, Zhang M, et al. eEF2K promotes PD-L1 stabilization through inactivating GSK3 β in melanoma. *J Immunother Cancer*. 2022;10(3).
31. Taylor A, Rudd CE. Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation Compensates for the Lack of CD28 in the Priming of CD8(+) Cytotoxic T-Cells: Implications for anti-PD-1 Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017;8:1653.
32. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;234(6):8509-21.

33. Lhuillier C, Rudqvist N-P, Yamazaki T, Zhang T, Charpentier M, Galluzzi L, et al. Radiotherapy-exposed CD8⁺ and CD4⁺ neoantigens enhance tumor control. *Journal of Clinical Investigation*. 2021;131(5).
34. Gu L, Chen M, Guo D, Zhu H, Zhang W, Pan J, et al. PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*. 2017;12(8):e0182692.
35. Li CW, Lim SO, Xia W, Lee HH, Chan LC, Kuo CW, et al. Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat Commun*. 2016;7:12632.
36. Chen X, Wang K, Jiang S, Sun H, Che X, Zhang M, et al. eEF2K promotes PD-L1 stabilization through inactivating GSK-3 β in melanoma. *J Immunother Cancer*. 2022;10(3).
37. Rodrigues, A.; Nogueira, C.; Marinho, L.C.; Velozo, G.; Sousa, J.; Silva, P. G.; Tavora, F. Computer-assisted tumor grading, validation of PD-L1 scoring, and quantification of CD8-positive immune cell density in urothelial carcinoma, a visual guide for pathologists using QuPath. *Surgical and Experimental Pathology*, v. 5, n. 1, dez. 2022.

6.TABELAS

Tabela 1: Perfil clínico e histopatológico de pacientes com câncer de bexiga

	n (%)
Sexo	
Feminino	31 (22.1%)
Masculino	109 (77.9%)
Idade (Média 74.9±13.1; Amplitude 24-108)	
Abaixo de 70	47 (33.6%)
>70	93 (66.4%)
Fatores de risco	
Tabagista	21 (15.1%)
Hipertensão	21 (15.0%)
<i>Diabetes Mellitos (DM)</i>	4 (2.9%)
Tratamento	
Cirurgia	73 (88.0%)
Quimioterapia adjuvante	27 (32.5%)
Radioterapia Adjuvante	8 (9.6%)
Características Histológicas	
Invasão muscular	83 (59.3%)
Invasão / Baixo grau	14 (43.8%)
Invasão / Alto grau	66 (65.3%)
Necrose	24 (17.1%)
Grau Patológico	
Baixo grau	32 (24.1%)
Alto grau	101 (75.9%)

Tabela 2: Influência de variáveis sociodemográficas na densidade celular CD8 positiva, imunexpressão de PD-L1 e GSK-3 β , tempo livre de recidiva e sobrevida global de pacientes com carcinoma urotelial de bexiga.

	GSK-3 β H-score		p	PDL1 TPS		p-	CD8 (cells/mm ²)		p-	RFT (%)	Tempo livre de recorrência		p-	Sobrevida global			p-
	Menor 200	>200		Valor ^a	0%		>0%	Menor 20			>20	Valor ^a		Média \pm SD (CI95%)	Média (CI95%)	Valor ^c	
Total	122 (91.0%)	12 (9.0%)	-	52 (37.1%)	88 (62.9%)	-	75 (54.0%)	64 (46.0%)	0	68 (80.0%)	50.63\pm7.66 (35.63-65.64)	47 (40.26-53.74)	-	77 (89.5%)	76.06\pm4.69 (66.86-85.26)	(-)	
Sexo																	
Feminino	20 (21.3%)	10 (25.0%)	0.636	10 (19.2%)	21 (23.9%)	0.524	16 (21.3%)	15 (23.4%)	0.766	12 (75.0%)	41.05 \pm 3.61 (33.98-48.12)	47 (40.51-53.49)	0.947	15 (93.8%)	46.00 \pm 2.85 (40.42-51.58)	(-)	0.441
Masculino	74 (78.7%)	30 (75.0%)		42 (80.8%)	67 (76.1%)		59 (78.7%)	49 (76.6%)		56 (81.2%)	53.75 \pm 9.37 (35.39-72.11)	52 (36.26-67.74)		62 (88.6%)	74.11 \pm 5.91 (62.54-85.69)	(-)	
Idade																	
Menor 70	34 (36.2%)	10 (25.0%)	0.208	22 (42.3%)	25 (28.4%)	0.092	28 (37.3%)	18 (28.1%)	0.250	26 (81.3%)	44.34 \pm 3.17 (38.13-50.55)	47 (38.89-55.11)	0.470	32 (100.0%)	(-)	(-)	0.014
>70	60 (63.8%)	30 (75.0%)		30 (57.7%)	63 (71.6%)		47 (62.7%)	46 (71.9%)		42 (79.2%)	59.08 \pm 7.97 (43.46-74.69)	(-)		45 (83.3%)	68.58 \pm 6.81 (55.22-81.93)	(-)	
Tabagista																	
No	77 (82.8%)	35 (87.5%)	0.495	41 (80.4%)	77 (87.5%)	0.259	64 (86.5%)	53 (82.8%)	0.549	51 (78.5%)	51.16 \pm 8.36 (34.77-67.55)	52 (43.08-60.92)	0.699	59 (90.8%)	79.76 \pm 3.61 (72.69-86.84)	(-)	0.529
Yes	16 (17.2%)	5 (12.5%)		10 (19.6%)	11 (12.5%)		10 (13.5%)	11 (17.2%)		17 (85.0%)	39.14 \pm 2.19 (34.85-43.42)	41 (36.63-45.37)		18 (85.7%)	38.04 \pm 2.72 (32.71-43.38)	41 (0.00-88.42)	
Hipertensão																	
No	80 (85.1%)	34 (85.0%)	0.987	47 (90.4%)	72 (81.8%)	0.170	64 (85.3%)	54 (84.4%)	0.875	53 (81.5%)	53.03 \pm 8.31 (36.75-69.32)	52 (43.06-60.94)	0.170	60 (92.3%)	79.09 \pm 4.71 (69.86-88.32)	(-)	0.084
Yes	14 (14.9%)	6 (15.0%)		5 (9.6%)	16 (18.2%)		11 (14.7%)	10 (15.6%)		15 (75.0%)	32.23 \pm 3.19 (25.96-38.49)	(-)		17 (81.0%)	32.90 \pm 3.18 (26.65-39.14)	(-)	
DM																	
No	92 (97.9%)	38 (95.0%)	0.371	51 (98.1%)	85 (96.6%)	0.610	73 (97.3%)	62 (96.9%)	0.872	65 (80.2%)	50.89 \pm 7.68 (35.83-65.96)	47 (40.25-53.75)	0.477	74 (90.2%)	76.68 \pm 4.71 (67.46-85.91)	(-)	0.198
Yes	2 (2.1%)	2 (5.0%)		1 (1.9%)	3 (3.4%)		2 (2.7%)	2 (3.1%)		3 (75.0%)	26.50 \pm 7.36 (12.07-40.93)	(-)		3 (75.0%)	26.50 \pm 7.36 (12.07-40.93)	(-)	

*p<0,05, a) Teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher (n, %); b) Teste de Mann-Whitney (Média \pm DP); Teste de Mantel-Cox c) Log-Rank tempo mediano \pm DP e tempo mediano de sobrevida livre de recorrência e sobrevida global calculados usando curvas de Kaplan-Meier). IC95% = intervalo de confiança de 95%; SLR = Sobrevida livre de recidiva; GS = sobrevida global; H-score = HistoScore.

*p<0,05, a - Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (n, %);

Tabela 3: Influência das modalidades terapêuticas na imunoeexpressão de GSK-3 β , tempo livre de recorrência e sobrevida global de pacientes com carcinoma urotelial de bexiga.

	GSK-3 β H-score		p- valor	PDL1 TPS		p- valor ^a	CD8 (cells/mm ²)		p- Valor ^a	RSL (%)	Tempo livre de recorrência		p- Valor	Sobrevida Global		p- Valor	
	Menor 200	>200		0%	>0%		Menor 20	>20			Média \pm SD (CI95%)	Média (CI95%)		SG (%)	Média \pm SD (CI95%)		Média (CI95%)
Cirurgia radical																	
Não	7 (12.7%)	3 (11.5%)	0.879	9 (12.0%)	1 (16.7%)	0.738	5 (16.1%)	5 (9.6%)	0.378	9 (90.0%)	39.90 \pm 3.89 (32.28-47.52)	(-)	0.620	9 (90.0%)	39.90 \pm 3.89 (32.28-47.52)	(-)	0.946
Sim	48 (87.3%)	23 (88.5%)		66 (88.0%)	5 (83.3%)		26 (83.9%)	47 (90.4%)		55 (78.6%)	41.16 \pm 2.39 (36.47-45.85)	47 (38.41-55.59)		64 (90.1%)	48.01 \pm 2.15 (43.80-52.22)	(-)	
Quimioterapia adjuvante																	
Não	35 (63.6%)	20 (76.9%)	0.232	50 (66.7%)	5 (83.3%)	0.400	20 (64.5%)	36 (69.2%)	0.657	42 (79.2%)	41.36 \pm 2.88 (35.73-47.00)	47 (36.45-57.55)	0.813	48 (88.9%)	47.11 \pm 2.62 (41.98-52.24)	(-)	0.575
Sim	20 (36.4%)	6 (23.1%)		25 (33.3%)	1 (16.7%)		11 (35.5%)	16 (30.8%)		22 (81.5%)	40.88 \pm 3.07 (34.86-46.91)	43 (-)		25 (92.6%)	45.60 \pm 2.31 (41.07-50.13)	(-)	
Radioterapia																	
No			0.730			0.399		50	0.021								
	50 (90.9%)	23 (88.5%)		67 (89.3%)	6 (100.0%)		25 (80.6%)	(96.2%)*		57 (79.2%)	41.39 \pm 2.37 (36.75-46.03)	47 (38.73-55.27)	0.810	66 (90.4%)	48.23 \pm 2.06 (44.19-52.28)	(-)	0.730
Yes	5 (9.1%)	3 (11.5%)		8 (10.7%)	0 (0.0%)		6 (19.4%)*	2 (3.8%)		7 (87.5%)	30.71 \pm 3.97 (22.94-38.49)	(-)		7 (87.5%)	30.71 \pm 3.97 (22.94-38.49)	(-)	

*p<0,05, um Teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher (n, %); bTeste de Mann-Whitney (mediana \pm DP); Teste de Mantel-Cox do cLog-Rank (tempo mediano \pm DP e sobrevida livre de recorrência mediada e sobrevida global calculada usando curvas de Kaplan-Meier). IC95% = intervalo de confiança de 95%; SLR = Sobrevida livre de recidiva; GS = sobrevida global; H-score = Histoscore; RSL: Sobrevida livre de recorrência.

Tabela 4: Influencia da densidade de linfócitos CD8-positivos e a imunexpressão de PDL1 na imunexpressão de GSK-3 β , tempo livre de recorrência e sobrevida global de pacientes com carcinoma urotelial.

	GSK-3 β H-score		p-valor	PDL1 TPS		p-valor ^a	CD8 (cells/mm ²)		p-valor ^a	SLR (%)	Tempo livre de recorrência		p-Valor	Sobrevida Global			p-Valor
	Menor 200	>200		0%	>0%		Até 20	>20			Média \pm SD (CI95%)	Média (CI95%)		SG (%)	Média \pm SD (CI95%)	Média (CI95%)	
Grau Patológico																	
Baixo grau	25 (28.1%)	6 (15.4%)	0.123	16 (33.3%)*	16 (18.8%)	0.030	19 (26.0%)	13 (22.0%)	0.595	14 (70.0%)	38.73 \pm 3.66 (31.55-45.91)	47 (-)	0.500	19 (95.0%)	44.70 \pm 2.24 (40.31-49.09)	(-)	0.271
Alto grau	64 (71.9%)	33 (84.6%)		32 (66.7%)	69 (81.2%)*		54 (74.0%)	46 (78.0%)		51 (82.3%)	54.94 \pm 9.91 (35.52-74.37)	52 (36.28-67.72)		55 (87.3%)	71.80 \pm 6.58 (58.90-84.70)	(-)	
Invasão Muscular																	
Não	37 (39.4%)	17 (42.5%)	0.735	18 (34.6%)	39 (44.3%)	0.259	31 (41.3%)	26 (40.6%)	0.933	25 (75.8%)	41.19 \pm 3.26 (34.80-47.59)	47 (40.94-53.06)	0.692	30 (88.2%)	46.92 \pm 3.21 (40.63-53.22)	(-)	0.805
Sim	57 (60.6%)	23 (57.5%)		34 (65.4%)	49 (55.7%)		44 (58.7%)	38 (59.4%)		43 (82.7%)	66.86 \pm 7.63 (51.90-81.82)	(-)		47 (90.4%)	79.72 \pm 3.96 (71.95-87.48)	(-)	
Necrose																	
Não	77 (81.9%)	34 (85.0%)	0.665	41 (78.8%)	75 (85.2%)	0.333	62 (82.7%)	54 (84.4%)	0.787	54 (78.3%)	40.53 \pm 2.47 (35.68-45.38)	47 (39.61-54.39)	0.245	62 (88.6%)	46.95 \pm 2.35 (42.34-51.56)	(-)	0.472
Sim	17 (18.1%)	6 (15.0%)		11 (21.2%)	13 (14.8%)		13 (17.3%)	10 (15.6%)		14 (87.5%)	78.69 \pm 6.82 (65.32-92.06)	(-)		15 (93.8%)	83.75 \pm 5.08 (73.79-93.71)	(-)	
CD8 (cells/mm²)																	
Up to 20	65 (53.7%)	7 (58.3%)	0.760	37 (71.2%)*	38 (43.7%)	0.002	-	-	-	33 (78.6%)	51.08 \pm 9.09 (33.26-68.90)	52 (39.08-64.92)	0.889	37 (88.1%)	77.83 \pm 4.71 (68.61-87.05)	(-)	0.692
>20	56 (46.3%)	5 (41.7%)		15 (28.8%)	49 (56.3%)*		-	-		34 (81.0%)	41.03 \pm 2.72 (35.70-46.35)	47 (-)		39 (90.7%)	45.10 \pm 2.27 (40.64-49.56)	(-)	
PDL1																	
0	48 (39.3%)*	1 (8.3%)	0.033	-	-	-	-	-	-	24 (88.9%)	43.61 \pm 2.81 (38.11-49.11)	47 (-)	0.204	25 (92.6%)	43.61 \pm 2.29 (39.12-48.10)	(-)	0.497
>0	74 (60.7%)	11 (91.7%)*		-	-		-	-		44 (75.9%)	48.06 \pm 7.90 (32.56-63.55)	43 (34.18-51.82)		52 (88.1%)	73.21 \pm 6.58 (60.31-86.12)	(-)	
GSK-3β H-score																	
< 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61 (80.3%)	57.23 \pm 7.30 (42.92-71.54)	47 (38.74-55.26)	0.902	69 (89.6%)	75.89 \pm 5.05 (65.95-85.76)	(-)	0.633
>100	-	-		-	-		-	-		4 (66.7%)	43.67 \pm 10.76 (22.58-6.75)	52 (-)		5 (83.3%)	45.33 \pm 7.91 (29.83-60.84)	(-)	

* $p < 0,05$, teste Qui-quadrado de Fisher (n, %); bTeste de Mann-Whitney (mediana \pm DP); Teste de Mantel-Cox do cLog-Rank (tempo mediano \pm DP e sobrevida livre de recorrência mediada e sobrevida global calculada usando curvas de Kaplan-Meier). IC95% = intervalo de confiança de 95%; SLR = Sobrevida livre de recidiva; GS = sobrevida global; H-score = Histoscore.

Tabela 5: Análise multivariada dos fatores de risco de tempo livre de recidiva e sobrevida global em pacientes com carcinoma urotelial de bexiga.

Variáveis	Tempo livre de recorrência		Sobrevida global	
	p-valor	Ajuste HR (IC95%)	p-valor	Ajuste HR (IC95%)
Sexo	0.404	2.03 (0.39-10.62)	0.919	0.85 (0.04-17.36)
Idade	0.207	2.59 (0.59-11.36)	0.966	2.37 (0.55-1.03)
Tabagista	0.160	3.74 (0.60-23.50)	0.995	0.99 (0.09-10.97)
Hipertensão	0.094	4.00 (0.79-20.30)	0.641	1.88 (0.13-26.48)
DM	0.809	1.38 (0.10-18.37)	0.417	3.77 (0.15-92.75)
Quimioterapia	0.485	0.59 (0.13-2.63)	0.771	1.36 (0.17-11.02)
Radioterapia	0.456	2.65 (0.20-34.59)	0.737	1.58 (0.11-22.35)
Grau tumoral	*0.040	9.09 (1.11-100.00)	0.969	2.29 (0.70-7.50)
Invasão muscular	0.917	1.08 (0.24-4.85)	0.861	1.24 (0.11-14.25)
Necrose	0.971	1.04 (0.16-6.92)	0.908	1.19 (0.06-23.03)
PD-L1	*0.043	5.81 (1.06-31.80)	0.441	2.72 (0.21-34.55)
CD8	0.966	0.97 (0.28-3.34)	0.842	0.79 (0.07-8.34)
GSK	0.352	1.98 (0.47-8.38)	0.446	2.08 (0.32-13.60)

*p<0,05, regressão de Cox; HR = risco de risco para recorrência ou óbito; IC95% = Intervalo de confiança 95%.

6. CONCLUSÃO GERAL

Nossas análises de linfócitos infiltrantes CD8⁺ e PD-L1 em carcinoma urotelial de baixo e alto grau obtiveram excelente concordância de leitura e correlação de Pearson significativa entre o software Qupath e patologistas afirmando que o mesmo pode ser utilizado na rotina diagnóstica e pesquisas científicas.

Adicionalmente, GSK-3 β foi predominantemente expresso na maioria dos casos de alto grau, mostrando associação significativa com PD-L1, mas não com o CD8, porém, a avaliação da densidade de linfócitos de CD8⁺ foi intimamente associado ao tratamento prévio com radioterapia.

O tempo livre de sobrevida mostrou aumento do risco de recorrência tumoral quando apresenta positividade para PD-L1 e o tipo histológico for de alto grau.

São necessários mais estudos para compreensão desses marcadores avaliados, assim, nossos dados mostraram que ambos podem ser uma opção para futuras abordagens terapêuticas, mas torna-se necessário mais estudos para a compreensão da imunoexpressão desses biomarcadores e suas atividades no papel diagnóstico e prognóstico no carcinoma urotelial.

7.REFERÊNCIAS

A. STENZL, J.A. WITJES, E. COMPÉRAT, N.C. COWAN, M. DE SANTIS, M. KUCZYK, T. LEBRET, M.J. RIBAL, A. S. **Diretrizes para o câncer de bexiga músculo invasivo e metastático.** v. 01, 2012.

ALVES, M. et al. **Glycogen Synthase Kinase-3 Beta Expression Correlates With Worse Overall Survival in Non-Small Cell Lung Cancer—A Clinicopathological Series.** *Frontiers in Oncology*, v. 11, 9 mar. 2021.

ANTONI, S. et al. **Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends.** *European Urology*, v. 71, n. 1, p. 96–108, jan. 2017.

BANG, D. et al. **GSK-3 α promotes oncogenic KRAS function in pancreatic cancer via TAK1-TAB stabilization and regulation of noncanonical NF- κ B.** *Cancer Discovery*, v. 3, n. 6, p. 690–703, 2013.

BANKHEAD, P. et al. **QuPath: Open source software for digital pathology image analysis.** *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

BELLMUNT, J.; POWLES, T.; VOGELZANG, N. J. **A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now.** *Cancer Treatment Reviews* W.B. Saunders Ltd. 1 mar. 2017.

BEUREL, E.; GRIECO, S. F.; JOPE, R. S. **Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases.** *Pharmacology and Therapeutics*, v. 148, p. 114–131, 2015.

BILIM, V. et al. **Glycogen synthase kinase-3: A new therapeutic target in renal cell carcinoma.** *British Journal of Cancer*, v. 101, n. 12, p. 2005–2014, dez. 2009.

BORDEN, B. A. et al. **The landscape of glycogen synthase kinase-3 beta genomic alterations in cancer.** *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 20, n. 1, p. 183–190, 1 jan. 2021.

BRASIL. **Abordagens básicas para o controle do câncer.** v. 81. 2011.

BRASIL. Brasil. Ministerio da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Acidentes por Animais Peçonhentos.** In: Guia de vigilância em saúde. Ministério. Brasília: Ministério da Saúde. Ms, v. 1, p. 719– 38., 2014.

BRASIL. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil.** v. 1. 2020.

BRENNAN, P. et al. **Cigarette smoking and bladder cancer in men: A pooled analysis of 11 case-control studies.** International Journal of Cancer, v. 86, n. 2, p. 289–294, 15 abr. 2000.

BÜCHLER, T. **Imunoterapie karcinomu močového měchýře. Klinicka Onkologie.** Czech Medical Association J.E. Purkyne, , 2017.

CHALA, B. et al. **Development of urinary bladder pre-neoplasia by schistosoma haematobium eggs and chemical carcinogen in mice.** Korean Journal of Parasitology, v. 55, n. 1, p. 21–29, 1 fev. 2017.

COHEN, PHILIP.; FRAME, SHEELAGH. **The renaissance of GSK3.** Macmillan Magazines Ltd, p. 2–8, out. 2001.

CUMBERBATCH, M. G. K. et al. **Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018.** European Urology, v. 74, n. 6, p. 784–795, dez. 2018.

DE CHAUMONT, F. et al. **Icy: An open bioimage informatics platform for extended reproducible research.** Nature Methods, jul. 2012.

DENG, B. et al. **CD8 lymphocytes in tumors and nonsynonymous mutational load correlate with prognosis of bladder cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors.** Cancer Reports, v. 1, n. 1, 1 jun. 2018.

DOBLE, B.; WOODGETT, J. R. **GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase.** J Cell Sci, p. 1175–1186, 1 abr. 2003.

DOMOTO, T. et al. **Glycogen synthase kinase-3 β is a pivotal mediator of cancer invasion and resistance to therapy.** *Cancer Science*, v. 107, n. 10, p. 1363–1372, 24 out. 2016.

DONG, P. et al. **Control of PD-L1 expression by miR-140/142/340/383 and oncogenic activation of the OCT4–miR-18a pathway in cervical cancer.** *Oncogene*, v. 37, n. 39, p. 5257–5268, 27 set. 2018.

DUDA, P. et al. **Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer.** *CellsNLM (Medline)*. 30 abr. 2020.

DUDNIK, E. et al. **Pembrolizumab as a monotherapy or in combination with platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score (TPS) \geq 50%: real-world data.** *OncoImmunology*, v. 10, n. 1, 2021.

DURGEAU, A. et al. **Recent advances in targeting CD8 T-cell immunity for more effective cancer immunotherapy.** *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 22 jan. 2018.

EDGE, S. B.; AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **AJCC cancer staging manual.** Springer, 2010.

FARHOOD, B.; NAJAFI, M.; MORTEZAEI, K. **CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review.** *Journal of Cellular Physiology*Wiley-Liss Inc., 1 jun. 2019.

FARLING, K. B. **Bladder cancer: Risk factors, diagnosis, and management.** v. 42. 2017.

GLINA, S.; BERNARDO, W. M. **Atualização no prognóstico do câncer de bexiga.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 54, n. 5, out. 2008.

GULINAC, M. et al. **Increased PD-L1 expression in high-grade bladder cancer with squamous cell differentiation in Bulgarian and French patients' samples.** *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 49, 1 dez. 2020.

HUMPHRIES, M. P.; MAXWELL, P.; SALTO-TELLEZ, M. **QuPath: The global impact of an open source digital pathology system.** Computational and Structural Biotechnology JournalElsevier B.V., 1 jan. 2021a.

HUMPHRIES, M. P.; MAXWELL, P.; SALTO-TELLEZ, M. **QuPath: The global impact of an open source digital pathology system.** Computational and Structural Biotechnology JournalElsevier B.V., 1 jan. 2021b.

IYER, G.; MILOWSKY, M. I. **Fibroblast growth factor receptor-3 in urothelial tumorigenesis.** Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, v. 31, n. 3, p. 303–311, abr. 2013.

JHUN, I. et al. **Digital Image Analysis for Estimating Stromal CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Adenocarcinoma.** J Pathol Inform, 5 jul. 2021.

JIANG, W. et al. **An immune relevant signature for predicting prognoses and immunotherapeutic responses in patients with muscle-invasive bladder cancer (MIBC).** Cancer Medicine, v. 9, n. 8, p. 2774–2790, 1 abr. 2020.

JOHN, L. B. et al. **Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells.** Clinical Cancer Research, v. 19, n. 20, p. 5636–5646, 15 out. 2013.

JUNG, I.; MESSING, E. **Molecular Mechanisms and Pathways in Bladder Cancer Development and Progression.** Cancer Control, v. 7, n. 4, p. 325–334, 30 jul. 2000.

KAIDANOVICH-BEILIN, O.; WOODGETT, J. R. **GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models.** Frontiers in Molecular Neuroscience, v. 4, 2011.

KAZI, A. et al. **GSK3 suppression upregulates β -catenin and c-Myc to abrogate KRas-dependent tumors.** Nature Communications, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018b.

LAMPRECHT, M. R.; SABATINI, D. M.; CARPENTER, A. E. **CellProfilerTM: Free, versatile software for automated biological image analysis.** BioTechniques, v. 42, n. 1, p. 71–75, jan. 2007.

LENIS, A. T.; LEC, P. M.; CHAMIE, K. **Bladder cancer - A review.** **JAMA - Journal of the American Medical Association**American Medical Association, 17 nov. 2020.

LETAŠIOVÁ, S. et al. **Bladder cancer, a review of the environmental risk factors.** *Environmental Health*, v. 11, n. Suppl 1, p. S11, 2012.

LI, C. W. et al. **Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity.** *Nature Communications*, v. 7, 30 ago. 2016.

LIANG, M. H.; CHUANG, D. M. **Differential roles of glycogen synthase kinase-3 isoforms in the regulation of transcriptional activation.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 41, p. 30479–30484, 13 out. 2006.

LIN, J. et al. **GSK-3 β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research Elsevier B.V.*, 1 maio 2020.

LIU, Z. et al. **Intratumoral TIGIT+CD8+T-cell infiltration determines poor prognosis and immune evasion in patients with muscle-invasive bladder cancer.** *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, v. 8, n. 2, 16 ago. 2020.

LOBO, N. et al. **Landmarks in the treatment of muscle-invasive bladder cancer.** *Nature Reviews Urology Nature Publishing Group*, 1 set. 2017.

LOUGHREY, M. B. et al. **Validation of the systematic scoring of immunohistochemically stained tumour tissue microarrays using QuPath digital image analysis.** *Histopathology*, v. 73, n. 2, p. 327–338, 1 ago. 2018.

MALATS, N.; REAL, REAL, F. X. **Epidemiology of Bladder Cancer.** *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 29, n. 2, p. 177–189, 2015.

MARK, R. J. **Bladder cancer.** *Manuais MSD*, jan. 2019.

MARSHALL, G. et al. **Fifty-Year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water.** *Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, n. 12, p. 920–928, 2007.

MARTINEZ RODRIGUEZ, R. H.; BUISAN RUEDA, O.; IBARZ, L. **Bladder cancer: Present and future**. Medicina Clinica Ediciones Doyma, S.L., , 22 nov. 2017.

MCCARTHY, J. et al. **A Proposal for the Dartmouth Summer Research Project on Artificial Intelligence**. 2006.

MCLANE, L. M.; ABDEL-HAKEEM, M. S.; WHERRY, E. J. **IY37CH19-Wherry ARjats.cls CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer**. 2019.

MELIKER, J.; NRIAGU, J. Arsenic in drinking water and bladder cancer: review of epidemiological evidence. In: P. BHATTACHARYA, A. B. MUKHERJEE, J. BUNDSCHUH, R. ZEVENHOVEN, R. H. L. (EDITORS) (Ed.). **Arsenic in Soil and Groundwater Environment - Biogeochemical Interactions, Health Effects and Remediation**. 9. ed. v. 9p. 551–584.

MI, H. et al. **Digital Pathology Analysis Quantifies Spatial Heterogeneity of CD3, CD4, CD8, CD20, and FoxP3 Immune Markers in Triple-Negative Breast Cancer**. Frontiers in Physiology, v. 11, 19 out. 2020.

MISHRA, R. **Glycogen synthase kinase 3 beta: Can it be a target for oral cancer**. **Molecular Cancer**, 11 jun. 2010.

MISHRA, R.; NAGINI, S.; RANA, A. **Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression**. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, 3 fev. 2015.

NAKANISHI, J. et al. **Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers**. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 56, n. 8, p. 1173–1182, ago. 2007.

NAKANO, O. et al. **Proliferative Activity of Intratumoral CD8 T-Lymphocytes As a Prognostic Factor in Human Renal Cell Carcinoma: Clinicopathologic Demonstration of Antitumor Immunity**. **CANCER RESEARCH**. 2001.

NIAZI, M. K. K.; PARWANI, A. V.; GURCAN, M. N. **Digital pathology and artificial intelligence**. The Lancet Oncology Lancet Publishing Group. 1 maio 2019.

OH, JIN-KYOUNG; WEIDERPASS, E. **Infection and Cancer: Global Distribution and Burden of Diseases**. Annals of Global Health, v. 80, n. 5, p. 384–392, 2014.

OHAEGBULAM, K. C. et al. **Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway**. Trends in Molecular Medicine Elsevier Ltd, , 2015.

PARKIN, D. M. et al. **Cancer in Africa 2018: The role of infections**. International Journal of Cancer, v. 146, n. 8, p. 2089–2103, 15 abr. 2020.

PHAM, A.; BALLAS, L. K. **Trimodality therapy for bladder cancer: Modern management and future directions**. Current Opinion in Urology Lippincott Williams and Wilkins. 1 maio 2019.

POMPEO ACL, CARRERETTE FB, GLINA S, ORTIZ V, FERREIRA U, FONSECA CEC, WROCLAWSKI ER, BRETAS FFH, SNITCOVSKY I, COELHO JMC, FONSECA F^o LL, BERGER M, MONTI PR, MATHEUS WE, CLARK O, F. L.; O. **Bladder cancer: diagnosis and management of bladder cancer**. BJU International, v. 120, n. 6, p. 755–765, dez. 2017.

POMPEO ACL, CARRERETTE FB, GLINA S, O. V et al. **Câncer de Bexiga - Parte I**. 2006.

POSTOW, M. A.; CALLAHAN, M. K.; WOLCHOK, J. D. **Immune checkpoint blockade in cancer therapy**. Journal of Clinical Oncology American Society of Clinical Oncology. 10 jun. 2015.

PREWITT, J. M. S.; MENDELSON, M. L. **THE ANALYSIS OF CELL IMAGES***. 1966.

RACAUD-SULTAN, C.; VERGNOLLE, N. **GSK3 β , a Master Kinase in the Regulation of Adult Stem Cell Behavior**. CellsNLM (Medline), 24 jan. 2021.

RASKOV, H. et al. **Cytotoxic CD8⁺ T cells in cancer and cancer immunotherapy**. British Journal of Cancer Springer Nature, 19 jan. 2021a.

RASKOV, H. et al. **Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy.** British Journal of Cancer Springer Nature, 19 jan. 2021b.

RILEY, R. S. et al. **Delivery technologies for cancer immunotherapy.** Nature Reviews Drug Discovery Nature Publishing Group, 1 mar. 2019.

RODRIGUES, A. et al. **Computer-assisted tumor grading, validation of PD-L1 scoring, and quantification of CD8-positive immune cell density in urothelial carcinoma, a visual guide for pathologists using QuPath.** Surgical and Experimental Pathology, v. 5, n. 1, dez. 2022.

SAYAS, C. L.; ÁVILA, J. **GSK-3 and tau: A key duet in alzheimer's disease.** CellsMDPI, 1 abr. 2021.

SCHINDELIN, J. et al. **Fiji: An open-source platform for biological-image analysis.** Nature Methods, jul. 2012.

SCOSYREV, E. et al. **Sex and racial differences in bladder cancer presentation and mortality in the US.** Cancer, v. 115, n. 1, 2008.

SHARPE, A. H. et al. **The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection.** Nature Immunology, mar. 2007.

STENEHJEM, D. D. et al. **PD1/PDL1 inhibitors for the treatment of advanced urothelial bladder cancer.** OncoTargets and Therapy Dove Medical Press Ltd., 2018.

SUTHERLAND, C. **What are the bona fide GSK3 substrates?** International Journal of Alzheimer's Disease, 2011.

SWEIS, R. F. et al. **Molecular drivers of the non- T-cell-inflamed tumor microenvironment in urothelial bladder cancer.** Cancer Immunology Research, v. 4, n. 7, p. 563–568, 1 jul. 2016a.

SWEIS, R. F. et al. **Molecular drivers of the non- T-cell-inflamed tumor microenvironment in urothelial bladder cancer.** Cancer Immunology Research, v. 4, n. 7, p. 563–568, 1 jul. 2016b.

THOMPSON, E. D. et al. **Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma.** *Gut*, v. 66, n. 5, p. 794–801, 22 jan. 2016.

TRAPP, G. A.; MATTIELLO, I. C.; NETO, E. J. D. **UROTHELIAL BLADDER CANCER: STAGING AND TREATMENT.** *ACTA MEDIC*, v. 39, 2018.

VAN DER LEUN, A. M.; THOMMEN, D. S.; SCHUMACHER, T. N. **CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis.** *Nature Reviews Cancer* Nature Research, , 1 abr. 2020.

VESELY, M. D. et al. **Natural innate and adaptive immunity to cancer.** *Annual Review of Immunology*, v. 29, p. 235–271, 23 abr. 2011.

VIRATHAM PULSAWATDI, A. et al. **A robust multiplex immunofluorescence and digital pathology workflow for the characterisation of the tumour immune microenvironment.** *Molecular Oncology*, v. 14, n. 10, p. 2384–2402, 1 out. 2020.

WEINSTEIN, J. N. et al. **Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma.** *Nature*, v. 507, n. 7492, p. 315–322, 2014.

XAVIER, C. E. N. et al. **A Critical Insight into the Clinical Translation of PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Clear Cell Renal Cell Carcinoma.** *Current Urology Reports* Current Medicine Group LLC 1, 1 jan. 2019.

YANG, Y. **Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer.** *Journal of Clinical Investigation* American Society for Clinical Investigation, 1 set. 2015.

ZAHND, S. et al. **A digital pathology-based shotgun-proteomics approach to biomarker discovery in colorectal cancer.** *Journal of Pathology Informatics*, v. 10, n. 1, 1 jan. 2019.

ZANG, X.; ALLISON, J. P. **The B7 family and cancer therapy: Costimulation and coinhibition.** *Clinical Cancer Research*, 15 set. 2007.

ZEEGERS, M. P. A. et al. **The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review.** World Journal of Urology, v. 21, n. 6, p. 392–401, 17 fev. 2004.

ZHU, J. et al. **A feedback loop formed by atg7/autophagy foxo3a/mir-145 and pd-11 regulates stem-like properties and invasion in human bladder cancer.** Cancers, v. 11, n. 3, 1 mar. 2019.

8.ANEXO A

CENTRO UNIVERSITÁRIO
CHRISTUS - UNICHRISTUS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-L1 E DE INTERFERON GAMA COM TRATAMENTO POR BCG EM CARCINOMAS UROTELIAIS DA BEXIGA

Pesquisador: ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30207020.6.1001.5049

Instituição Proponente: Unichristus

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.997.304

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional e analítico que avaliará a imunexpressão dos marcadores PDL-1 e Interferon-gama em material de biópsia com diagnóstico de carcinoma urotelial não invasivo, buscando correlacionar esta expressão à imunoterapia com BCG.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar a possível correlação da expressão de PD-L1 e IFN- em câncer de bexiga não invasivo, concomitante a associação de imunoterapia por Bacillus Calmette-Guerin (BCG) considerando as relações sócio-epidemiológicas e grau de tumor.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios do estudo (melhor compreensão da expressão destes marcadores em tumores uroteliais) são relevantes e superiores aos riscos envolvidos, tais como quebra de sigilo e desgaste de blocos de parafina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa mostra-se relevante, com metodologia bem descrita e objetivos claros. Permitirá melhor entendimento da influência da imunoterapia na expressão de marcadores da resposta imune antitumoral em neoplasias vesicais

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados de forma correta, sem pendências.

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133
Bairro: Cocó **Município:** FORTALEZA **CEP:** 60.190-060
UF: CE **Telefone:** (85)3265-6668 **Fax:** (85)3265-6668 **E-mail:** fc@fchristus.com.br

Continuação do Parecer: 3.997.304

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1512474.pdf	24/03/2020 00:26:41		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_do_TCLE.pdf	24/03/2020 00:24:39	ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ASSOCIACAO_DA_EXPRESSAO_DE_PD_L1_E_DE_INTERFERON_GAMA_C_OM_TRATAMENTO_POR_BCG_EM_CARCINOMAS_URETERIAIS_DA_BEXIGA	23/03/2020 23:40:35	ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_da_pesquisa_plataforma_Brasil.pdf	23/03/2020 23:32:03	ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Fiel_depositario_plataforma_Brasil.pdf	23/03/2020 23:30:13	ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Pesquisadores_envolvidos_na_pesquisa_Plataforma_Brasil.pdf	23/03/2020 23:12:14	ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES	Aceito
Orçamento	Orcamento_plataforma_brasil.pdf	23/03/2020 23:10:49	ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES	Aceito
Cronograma	Cronograma_plataforma_brasil.pdf	23/03/2020 23:09:52	ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_plataforma_brasil.pdf	23/03/2020 23:09:18	ALINE KIMBERLY ALMEIDA RODRIGUES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133
 Bairro: Cocó CEP: 60.190-060
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3265-6668 Fax: (85)3265-6668 E-mail: fc@fchristus.com.br

Fonte: Próprio Autor.

CENTRO UNIVERSITÁRIO
CHRISTUS - UNICHRISTUS



Continuação do Parecer: 3.997.304

FORTALEZA, 29 de Abril de 2020

Assinado por:
OLGA VALE OLIVEIRA MACHADO
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Joao Adolfo Gurgel, 133
Bairro: Cocó **CEP:** 60.190-060
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3265-6668 **Fax:** (85)3265-6668 **E-mail:** fc@fchristus.com.br

Página 03 de 03

Fonte: Próprio Autor.

9.ANEXO B

Rodrigues et al.
Surgical and Experimental Pathology_#####
<https://doi.org/10.1186/s42047-022-00112-y>

Surgical and Experimental
Pathology

1 RESEARCH Open Access

2 Computer-assisted tumor grading,
3 validation of PD-L1 scoring, and quantification
4 of CD8-positive immune cell density
5 in urothelial carcinoma, a visual guide
6 for pathologists using QuPath



7 Aline Rodrigues^{1,2}, Cleto Nogueira^{1,2}, Laura Cardoso Marinho², Guilherme Velozo², Juliana Cordeiro²,
8 Paulo Goberlanio Silva¹ and Fabio Tavora^{2,3*}

9 Abstract

10 **Background:** Advances in digital imaging in pathology and the new capacity to scan high-quality images have
11 change the way to practice and research in surgical pathology. QuPath is an open-source pathology software that
12 offers a reproducible way to analyze quantified variables. We aimed to present the functionality of biomarker scor-
13 ing using QuPath and provide a guide for the validation of pathologic grading using a series of cases of urothelial
14 carcinomas.

15 **Methods:** Tissue microarrays of urothelial carcinomas were constructed and scanned. The images stained with HE,
16 CD8 and PD-L1 immunohistochemistry were imported into QuPath and dearrayed. Training images were used to
17 build a grade classifier and applied to all cases. Quantification of CD8 and PD-L1 was undertaken for each core using
18 cytoplasmic and membrane color segmentation and output measurement and compared with pathologists semi-
19 quantitative assessments.

20 **Results:** There was a good correlation between tumor grade by the pathologist and by QuPath software (Kappa
21 agreement 0.73). For low-grade carcinomas (by the report and pathologist), the concordance was not as high. Of the
22 32 low-grade tumors, 22 were correctly classified as low-grade, but 11 (34%) were diagnosed as high-grade, with the
23 high-grade to the low-grade ratio in these misclassified cases ranging from 0.41 to 0.58. The median ratio for bona
24 fide high-grade carcinomas was 0.59. Some of the reasons the authors list as potential mimickers for high-grade cases
25 are fulguration artifact, nuclear hyperchromasia, folded tissues, and inconsistency in staining. The correlation analysis
26 between the software and the pathologist showed that the CD8 marker showed a moderate ($r=0.595$) and statisti-
27 cally significant ($p<0.001$) correlation. The internal consistency of this parameter showed an index of 0.470. The cor-
28 relation analysis between the software and the pathologist showed that the PDL1 marker showed a robust ($r=0.834$)
29 and significant ($p<0.001$) correlation. The internal consistency of this parameter showed a CCI of 0.851.

A1 *Correspondence: ftavora@gmail.com
A2 ² Argos Laboratory, Av Santos Dumont 5753, #1607, Fortaleza CE,
A3 60175047, Brazil
A4 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

	Journal : BMCTwo 42047	Dispatch : 26-4-2022	Pages : 11
	Article No : 112	<input type="checkbox"/> LE	<input type="checkbox"/> TYPESET
	MS Code :	<input checked="" type="checkbox"/> CP	<input checked="" type="checkbox"/> DISK

Conclusions: We were able to demonstrate the utility of QuPath in identifying and scoring tumor cells and IHC quantification of two biomarkers. The protocol we present uses a free open-source platform to help researchers deal with imaging and data processing in the surgical pathology field.

Keywords: Digital pathology, QuPath, CD8, Tumor infiltrating lymphocytes, Programmed death-ligand 1 immunotherapy, Biomarker, Bladder cancer

Introduction

Since the 1970s and, more importantly, in the past 20 years, immunohistochemistry (IHC) has been proven to be an effective, well-established, and widely accepted method in the Surgical Pathology laboratory to aid in the conventional histochemical stains of tissue sections. Diagnosis of disease, particularly cancer, is based on the examination of cells by light microscopy and on detecting specific molecules, such as proteins and nucleic acids, which are routinely identified in biopsy tissues by antibody-binding or nucleic hybridization technologies. The techniques have improved, and now, hundreds of antibodies, probes, and reaction protocols are performed worldwide to identify specific cell types, subclassify tumors, provide information on cancer-specific drivers, estimate aggressiveness of neoplasms, predict response to therapy, identify infectious agents, and many other applications (Cimino-Mathews 2021; McGinnis et al. 2021; Oh and Mahalingam 2019; Ross et al. 2020; Shah et al. 2013; Shelton et al. 2017). Guidelines for the standardization and analytic validation of IHC have been established by the College of American Pathologists, with regular updates (Hardy et al. 2013; Satturwar et al. 2019).

According to specific tumor types and antibodies used, pathologists usually score findings in a semiquantitative fashion, based on marker distribution, percent of positive cells, and/or stain intensity. IHC slides are predominantly stained with DAB and are counterstained with hematoxylin. Examples of successful surgical pathology histories include assessing HER2 positivity in breast cancer, ki67 quantification in various neoplasms, and, more recently, the use of PD-L1 scoring (in tumor and immune cells) to predict response to immunotherapy in a plethora of cancer types (Cimino-Mathews 2021; Guo et al. 2020; McGinnis et al. 2021). In both research and the clinical scenario, the H-score and Allred scoring systems are decades-old and still used to assess the percentage and intensity of cell staining (Harvey et al. 1999; McCarty Jr. et al. 1986).

Several research studies have relied on tissue microarrays (TMA) combined with IHC, to allow high throughput analysis of multiple tumor samples (Ilyas et al. 2013; Loughrey et al. 2018; Gray et al. 2017; Gurgel et al. 2020; Ozbudak et al. 2009; Morais et al. 2019). With digital pathology and the capacity to scan

whole slides with high-quality of images, new software and platforms have been created to help researchers and pathologists quantify and classify tissues and tumors. QuPath is an open-source pathology analysis software that offers a reproducible way to analyze and provide quantified variables and permits training and subsequent classification of cells using automated digital algorithms (Bankhead et al. 2017; Humphries et al. 2021).

In this study, we aimed to assess the (1) feasibility of scanning and analyzing tissue microarrays for bladder cancer, (2) show the functionality of biomarker scoring using QuPath, and (3) provide a step-by-step guide for the validation of pathologic grading using a series of cases of urothelial carcinoma stained with HE, CD8 and PD-L1.

Methods

Patients and tumor samples

The cohort consisted of 1 hundred and 40 bladder cancer patients with samples originating from transurethral resections and radical cystectomies from a reference laboratory in genitourinary pathology. Demographic data available and collected included sex, age, smoking status and overall survival. Individuals with neoadjuvant, prior BCG therapy or radiation therapy were excluded. Tumors obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens were retrospectively collected from the files of a reference laboratory in Northeastern Brazil after receiving Institutional Review Board approval. Tissue sections were retrieved from dominant tumor foci. Tumor samples were classified as low or high-grade according to the grading system accepted by the WHO in 2016.

Tissue microarray (TMA) construction

Two tissue microarrays (TMAs) were constructed using a manual tissue arrayer as previously described (Gurgel et al. 2020). For each case, a 2 mm core of a representative area was selected from the hematoxylin-eosin (HE)-stained sections from bladder specimens by an experienced genitourinary pathologist. Tissue cores that contained <100 tumor cells were removed from the analysis.



Journal : BMCTwo 42047

Article No : 112

MS Code :

Dispatch : 26-4-2022

 LE CP

Pages : 11

 TYPESET DISK

121 Immunohistochemical analyses

122 IHC was performed in a private laboratory that holds
123 the Brazilian Society of Pathology quality accreditation
124 program seal. PD-L1 and CD8 were chosen to prove the
125 versatility and potential use of QuPath in a specific T cell
126 marker (CD8) and PD-L1, which is the most vital marker
127 to assess response to immunotherapy. These biomarkers
128 were chosen as both are well characterized, and antibod-
129 ies are in routine clinical use in most pathology labora-
130 tories. In addition, these markers show very different
131 patterns. CD8 marks specifically a subclass of T-cells in a
132 uniform manner, while PD-L1 stains tumors and immune
133 cells in membranous and/or cytoplasmic ways with vari-
134 able intensity.

135 Sequential sections were cut from each TMA block and
136 mounted on charged microscopy glass slides for immu-
137 nohistochemical staining. The PD-L1 IHC analysis (22C3
138 pharmDx, Agilent, clone 22c3) was performed using
139 PT-Link (Dako PT100), followed by target recovery with
140 EnVision™ FLEX pH6.0 buffer, using the Agilent Tech-
141 nologies®, USA visualization system in Autostainer Link
142 48® equipment. PD-L1 positivity was assessed according
143 to the current protocol.

144 Tumor T-cell immune infiltrate characterization was
145 performed by evaluating CD8 (DAKO, clone C8/144b)
146 by immunohistochemistry in all TMAs. The density of
147 CD8+ T cells was evaluated as the overall percentage
148 of the area within the borders of the tumors covered by
149 positive immune cells. This method is based on the propos-
150 al for a standardized method from the International
151 Immuno-Oncology Biomarkers Working group (Hendry
152 et al. 2017).

153 Morphometric and computer-assisted image analyses

154 TMA stained slides (HE, CD8, and PD-L1) were scanned
155 at 40x magnification (Motic EasyScan Infinity 100 scan-
156 ner, Vancouver, CA) and analyzed by two pathologists
157 independently using a semiquantitative score. Both
158 pathologists also scored the tumors as low and high-
159 grade according to the current World Health Organiza-
160 tion Classification.

161 The files were loaded onto a project in QuPath software
162 (QuPath source code, documentation, links to the soft-
163 ware download are available at <https://qupath.github.io>).
164 QuPath's segmentation feature is able to detect thousands
165 of cells, identify them as objects in a hierarchical manner
166 below the annotation, TMA cores, or cases, and measure
167 cell morphology and biomarker expression at the same
168 time (Bankhead et al. 2017). The images were disarrayed,
169 and all cores separated in a continuous fashion from 1 to
170 140. The *Cell Detection* command was used to identify all
171 cells in all cores based on the optical density of nuclear

172 hematoxylin staining. Next, using selected measurements
173 of intensity and morphology of all cells, applying a two-
174 way *Random Trees Classifier* to train QuPath interactively
175 to distinguish tumor cells from the stroma and low-grade
176 predominant from high-grade predominant tumor cores.
177 This required drawing tumor cells by an experienced
178 pathologist, and QuPath was able to provide immediate
179 feedback across all tumors. Once the classification was
180 adequate for training images,, the authors expanded the
181 *Classifier* to identify all cells in all cores and estimate %
182 of high-grade and low-grade carcinomas to compare o
183 the original and confirmed pathologist classification. If
184 the output from QuPath showed that high-grade cells
185 were present in more than 10% of the tumor cells in each
186 core, on a Excel spreadsheet, the tumor was considered
187 high-grade by software analyses. We randomly selected 7
188 high-grade and 3 low-grade carcinoma cases as a training
189 set for the algorithm, annotated by one of the authors, to
190 identify low-grade, high-grade tumor cells and stroma.
191 The hypothesis is to evaluate if using only 7% of the cores
192 (10/140), QUPath would be able to classify the remainder
193 of the tumors in the TMA cores accurately.

194 For CD8 density measurements, a *Simple Tissue Detec-*
195 *tion* was performed to assess tissue area from each TMA
196 core, followed by CD8 cell counts with the *Positive Cell*
197 *Detection* command within the software (parameters for
198 each command were fine-tuned by one of the authors).
199 These measurements allowed the output of CD8 posi-
200 tive cells / mm2 of tissue. The corresponding script was
201 then applied to all TMA cores, and data were exported
202 to statistical analyses software (JMP, 2021 SAS Institute
203 Inc). This evaluation of a CD marker in the TMA core
204 has been previously described (Loughrey et al. 2018).
205 The output for this variable was the number of CD8+
206 cells per mm2, and it was compared with the analyses by
207 a pathologist who blindly assessed each one of the cores
208 and assessed a percentage semiquantitative score from 0
209 to 100% (overall area involved by infiltrating or peritu-
210 moral CD8+ lymphocytes).

211 For PD-L1 scoring, analyses were run based on the
212 trained algorithm described above, and quantification of
213 cytoplasmic positive (mean DAB staining) only in cells
214 detected as tumors cells, and not stroma and other cells.
215 QuPath output was able to identify numero of PDL1
216 positive cells/mm2 and, in addition, the H-score method
217 was applied by the software, based on extent and inten-
218 sity of cytoplasmic staining (1-3), multiplied by the per-
219 centage of cells positive, with a potential score ranging
220 from 0 to 300 (Bankhead et al. 2017). A pathologist score
221 PD-L1 on each core using the established Tumor Propor-
222 tion Score (TPS) method. It was defined as the percent-
223 age of viable tumour cells showing partial or complete
224 membrane PD-L1 staining at any intensity. Comparison

225 between pathologists' analyses and the computer-assisted
226 measurements were assessed by agreement scores.

227 Statistical analysis

228 CD8 and PDL1 data were evaluated using Spearman's
229 correlation and internal consistency analysis by calcula-
230 ting the interclass correlation coefficient. Addition-
231 ally, the kappa coefficient was calculated for the cut-off
232 points (High vs Low). Cohen's kappa ranged from -1.0
233 (total discordance) to +1.0 (total concordance). Values
234 between 0.6 to 0.8 are related to adequate concordance
235 and 0.8 to 1.0 are related to strongly concordance. Values
236 lower than 0.6 are considered inadequate concordance.
237 In all instances, a confidence level of 95% was adopted
238 (SPSS® v20.0 for Windows).

239 Results

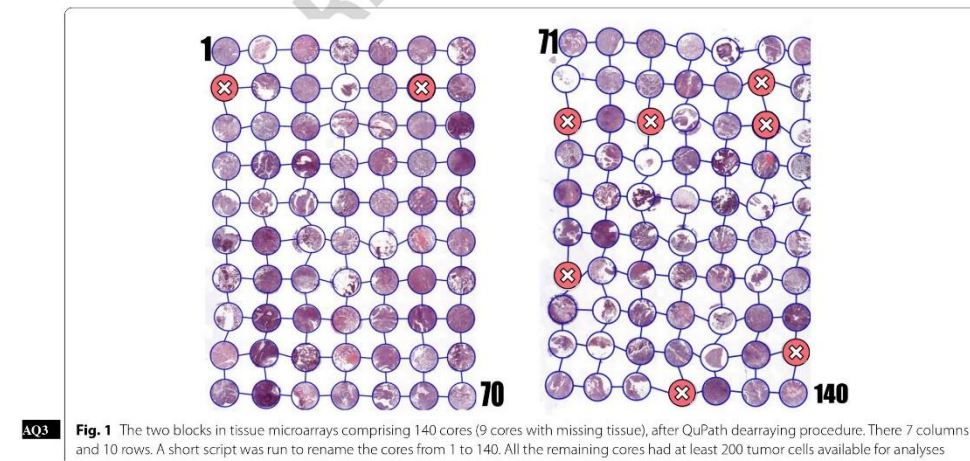
240 Clinicopathological data

241 The cohort consisted of 140 patients, but 9 were imme-
242 diately excluded in the grade analyses due to a lack of
243 tissue cores in the TMA histologic sections stained with
244 hematoxylin and eosin (Fig. 1, 131 total, 105/76% male)
245 with the mean age 74.2 years (57% over 75 years of age).
246 Sections for immunohistochemistry did not have drop-
247 out cores, and all 140 cores were used for analyses (140
248 cores total, mean age 71.4 years, 77% male). Per the origi-
249 nal pathology reports, there were 99 high-grade urothelial
250 carcinomas (75,5%) and 32 low-grade, which were
251 confirmed by blind evaluation of each core by an experi-
252 enced genitourinary pathologist. Per pathology reports,
253 83 cases (59%) were invasive at least into lamina propria

(all high-grade lesions), while 56 were non-invasive –
254 this data was not confirmed on tissue cores due to the
255 impossibility of assessing invasion in TMAs. Patients
256 with low-grade tumors were younger (mean 68,6 years)
257 compared to ones with high-grade tumors (mean 76,
258 $p=0,0062$). Patients with invasive tumors also were older
259 (mean 76,1 years) than the ones with non-invasive (mean
260 71 years, $p=0,036$).
261

262 Cell detection

263 After dearraying the TMA and running a script to enu-
264 merate the tissue cores from 1 to 140, QuPath was able to
265 treat each core as a separate unit in a hierarchical manner
266 for output of data and measurements. One of the main
267 basic functions of QUPATH (and any surgical pathology
268 analyses software for that matter) is to identify cells and
269 calculate individual features. We run the *Cell Detection*
270 command using hematoxylin optical density as the tar-
271 get for the nuclei, with 0,5uM pixel size and 3uM of cell
272 expansion. Figure 2 shows one of the cores (#61) as an
273 example. For this core, there were 30,204 cellular detec-
274 tions. More importantly, for each cell, the program can
275 provide all measurements and export them to a spread-
276 sheet. If cell delineation is acceptable, *Cell Detection*
277 can be run for all tissue cores. The median number of
278 detected cells for all cores was 25,921 cells (range 3197-
279 64,144). A total of 3,283,282 cells were identified in
280 all 131 cores. The authors used a Core i7 PC computer
281 running Windows 10, with 16GB of RAM memory and
282 a SSD hard disk of 512GB. For each TMA comprising 7
283 cores, *Cell Detection* run for about 3 min.



AQ3 **Fig. 1** The two blocks in tissue microarrays comprising 140 cores (9 cores with missing tissue), after QuPath dearraying procedure. There 7 columns and 10 rows. A short script was run to rename the cores from 1 to 140. All the remaining cores had at least 200 tumor cells available for analyses

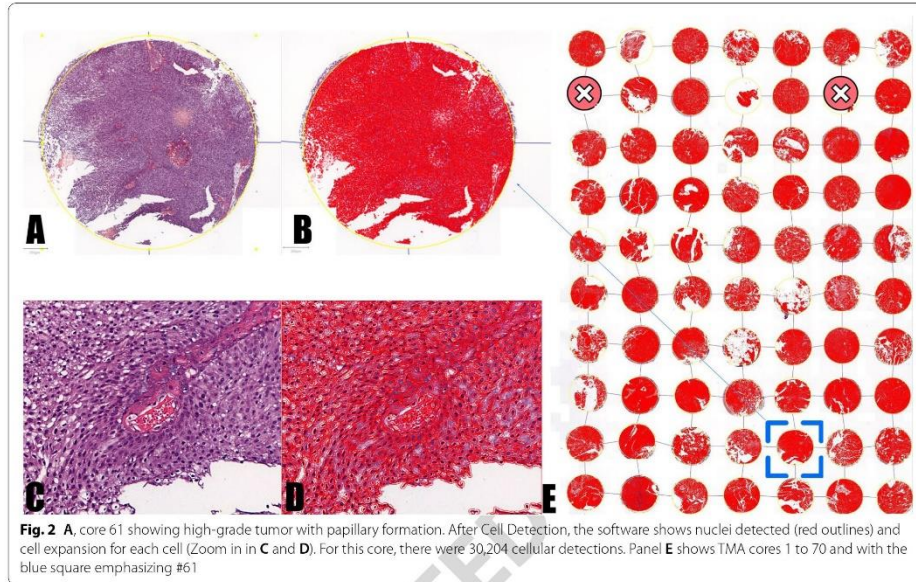


Fig. 2 A, core 61 showing high-grade tumor with papillary formation. After Cell Detection, the software shows nuclei detected (red outlines) and cell expansion for each cell (Zoom in in C and D). For this core, there were 30,204 cellular detections. Panel E shows TMA cores 1 to 70 and with the blue square emphasizing #61

284 A helpful feature for researchers is the ability to distin- 308
 285 guish between different cell types depending upon which 309
 286 measurements have been made and present them as a 310
 287 visual heatmap. Figure 3 shows an example (core #34) of 311
 288 a high-grade tumor with the map of the nucleus/cell area 312
 289 ratio output for each cell, and the heatmap for the entire 313
 290 block (cores 1-70) with the same measurement map. For 314
 291 the nucleus/cell area ratio, 1,791,467 cells were measured, 315
 292 with a mean of 0.289 (Std. Dev 0.077). In the figure, yellow 316
 293 represents high N:C ratio, while purple a lower one. 317

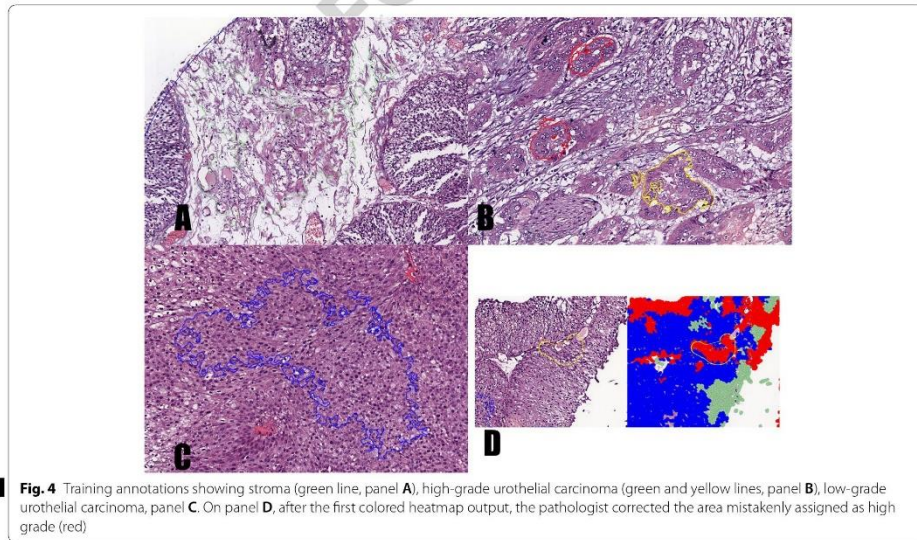
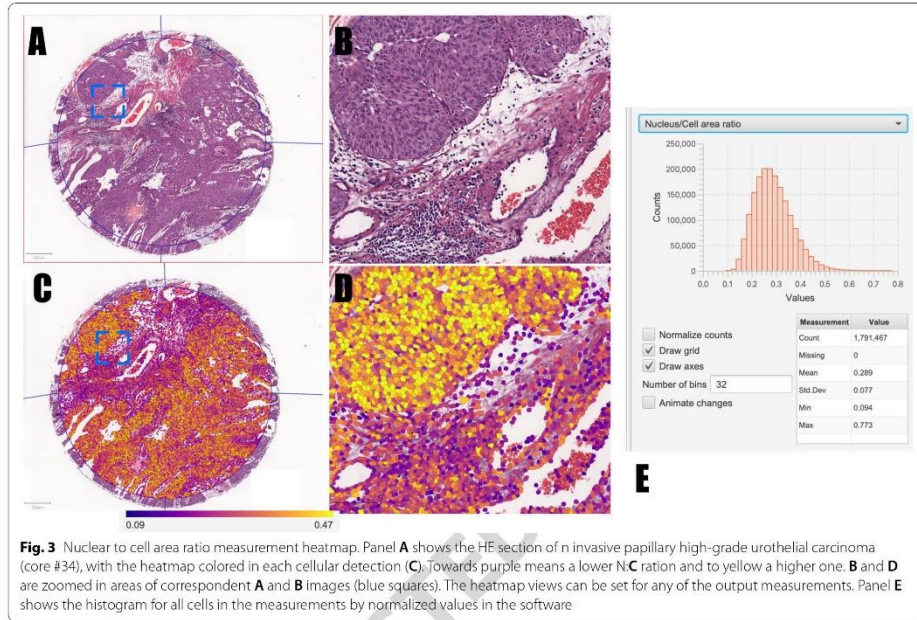
294 Automated tumor grade recognition

295 To train the software algorithm in recognizing tumor 320
 296 cells and differentiating cellular classes, 7 cases of high- 321
 297 grade urothelial carcinomas (HG) and 3 cases of low- 322
 298 grade urothelial carcinoma (LG) were annotated, as well 323
 299 as 4 distinct cases of non-tumor tissue (labeled "stroma" 324
 300 and representing non-tumor components such as 325
 301 fibroadipose tissue, desmoplastic stroma, or muscle bun- 326
 302 dles (Fig. 4, annotations from teaching cores). Within 327
 303 the training set, 4231 tumor cells in 7 high-grade cases, 4906 328
 304 tumor cells in 4 low-grade cases, and 8023 stroma cells 329
 305 were annotated. A script containing all procedures and 330
 306 steps in detecting and grading was saved, and run on all 331
 307 imported TMA images, thereby automating the detection 332

and across slides, as previously described (Loughrey et al. 308
 2018). This is a particularly helpful feature of the pro- 309
 gram to increase reproducibility throughout different 310
 cases (Kilvaer et al. 2020; Humphries et al. 2018). 311

Using *Random Trees* classifier based on nuclear and 312
 cytoplasmic features (area, perimeter, circularity, caliper, 313
 nuclear eccentricity, hematoxylin optical density, eosin 314
 optical density (with means and variance) and nuclear to 315
 cell area ratio, we tested the algorithm in the first tissue 316
 block with 70 cases and made additional training correc- 317
 tions. When the senior pathologist was satisfied, the clas- 318
 sification was deployed to all tissue cores, creating a map 319
 of each of the thousands of cells. The data was exported 320
 to a spreadsheet. For each core, the output showed the 321
 number of high-grade, low-grade, and stroma-designated 322
 cells (red, blue, and green respectively, see Fig. 5). If high- 323
 grade cells were assigned in more than 10% of the tumor 324
 cells for each core, the core was designated high-grade by 325
 the software. These results were compared to the grade 326
 assigned by the pathologist. 327

There was a good correlation between tumor grade by 328
 the pathologist and by QuPath software (Kappa agree- 329
 ment 0.73). Interestingly, the algorithm was almost 330
 perfect in diagnosing high-grade tumors (98 out of 331
 99 tumors). The only high-grade tumor classified as 332



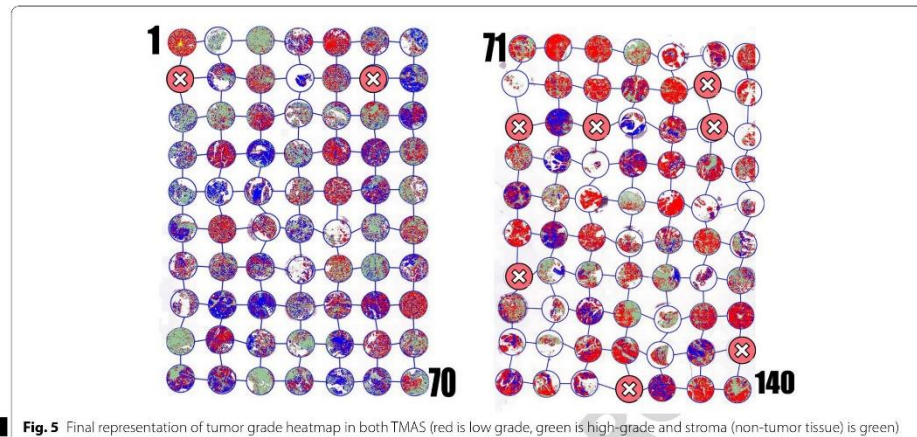


Fig. 5 Final representation of tumor grade heatmap in both TMAS (red is low grade, green is high-grade and stroma (non-tumor tissue) is green)

low-grade by QuPath was core #14. This core showed 19,552 cells with low-grade prediction and only 2280 with high-grade prediction, thus making it a difficult case to classify. For low-grade carcinomas (by the report and pathologist), the concordance was not as high. Of the 32 low-grade tumors, 22 were correctly classified as low-grade, but 11 (34%) were diagnosed as high-grade, with the high-grade to the low-grade ratio in these misclassified cases ranging from 0.41 to 0.58. The median ratio for bona fide high-grade carcinomas was 0.59. Some of the reasons the authors list as potential mimickers for high-grade cases are fulguration artifact, nuclear hyperchromasia, folded tissues, and inconsistency in staining.

The software was also able to inform which were the cellular characteristics that were most important to predict between low and high-grade, in this order of importance (in parenthesis, the software provides a number of importance for each variable: (1) nucleus area(0.0805); (2) nuclear hematoxylin optical density mean (0.0705); (3) nucleus circularity (0.0679); (4) nucleus/cell area ratio (0.0645); (5) nucleus perimeter (0.0531); (6) cell area (0.460) and (7) cell minimum caliper (0.0460).

CD-8 and PD-L1 quantification

To validate the ability to count positive cells by immunohistochemistry, the authors visually scored the presence of CD8+ cells within each core and assessed PD-L1 tumor proportion score. These data were compared with the output by QuPath automated *Positive Cell Detection* and *Tissue Detection*. The chosen QuPath output for the CD8 quantification was density (cells/mm²), while we

compared both density of PD-L1 positive cells and PD-L1 H-score with the pathologists Tumor Proportion Score (TPS).

The correlation analysis between the software and the pathologist showed that the CD8 marker showed a moderate ($r=0.595$) and statistically significant ($p<0.001$) correlation. The internal consistency of this parameter showed an index of 0.470. The correlation analysis between the software and the pathologist showed that the PD-L1 marker showed a robust ($r=0.834$) and significant ($p < 0.001$) correlation. The internal consistency of this parameter showed a CCI of 0.851. When the H-score was considered for correlation and internal consistency analysis, the correlation was also very strong ($r=0.997$) and significant ($p < 0.001$) and the ICC was 0.919. The agreement showed a statistically significant kappa coefficient ($p < 0.001$) of 0.724. These data are illustrated in Figs. 6 and 7.

Discussion

There is a strong need for accurate quantification of biomarker expression in tissue sections, both in the diagnostic scenario and in the translational research workflows. While molecular techniques have revolutionized tissue-based prediction and prognosis analyses, especially in lung, breast, and colon cancer, the basic surgical pathology sections are cheap, and immunohistochemistry is widely available all over the world.

Digital analyses have overcome some problems of conventional quantitative scoring by pathologists: capacity to evaluate thousands or millions of cells, higher



Journal : **BMCtwo 42047**
Article No : **112**
MS Code :

Dispatch : **26-4-2022**

Pages : **11**

LE

TYPESET

CP

DISK

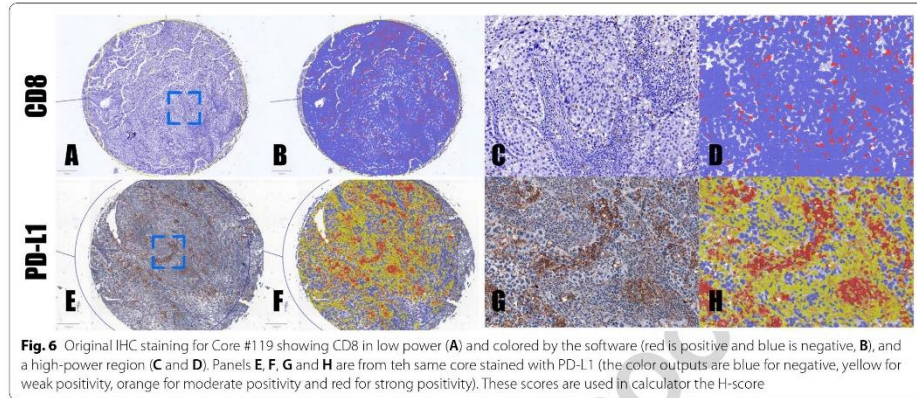


Fig. 6 Original IHC staining for Core #119 showing CD8 in low power (A) and colored by the software (red is positive and blue is negative, B), and a high-power region (C and D). Panels E, F, G and H are from the same core stained with PD-L1 (the color outputs are blue for negative, yellow for weak positivity, orange for moderate positivity and red for strong positivity). These scores are used in calculator the H-score

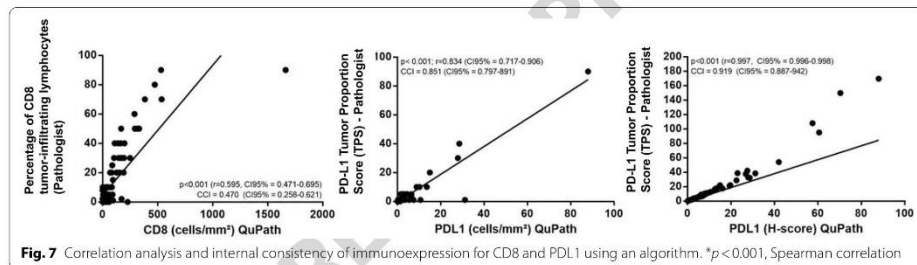


Fig. 7 Correlation analysis and internal consistency of immunorexpression for CD8 and PDL1 using an algorithm. * $p < 0.001$, Spearman correlation

393 reproducibility in the whole slide scanned images,
 394 and speed in evaluating multiple slides or cases in the
 395 research setting (Humphries et al. 2018; Ram et al. 2021;
 396 Morriss et al. 2020; Oh and Mahalingam 2019). Another
 397 issue with visual semi-quantitative is the short dynamic
 398 range of many systems. The Allred method used in breast
 399 cancer assigns scores for intensity (0-3) and percentage of
 400 cells (0-5), for example, has a range of 0-8, compared to
 401 the output of digital analyses that can yield output of dec-
 402 imals or the more commonly used H-score (0-300) (Mey-
 403 erholz and Beck 2018; Favresse et al. 2018; Vougiouklakis
 404 et al. 2020; Yang et al. 2019). In the past few years, sev-
 405 eral studies have compared tissue expression evaluated
 406 by pathologists and digital algorithms, and more impor-
 407 tantly, compared digital with mRNA transcripts and pro-
 408 teomics, underscoring the power of tissue-based protein
 409 quantification in research and patient's outcomes (Lu
 410 et al. 2022; Junger et al. 2020; Levy-Jurgenson et al. 2020;
 411 Officer et al. 2020). Ram et al. quantified protein expres-
 412 sion (P-cadherin, PD-L1, and 5T4) and showed a high

concordance with both mRNA transcripts and patholo-
 gists assigned H-score (Ram et al. 2021). Levy-Jurgenson
 et al. used a similar approach in an elegant study and
 used deep-learning algorithms to quantify tumor het-
 erogeneity with excellent correlation with survival by the
 way of mRNA and miRNA expression from whole-slide
 images (Levy-Jurgenson et al. 2020).

While other studies have attempted to validate the
 use of software and compare with real-life pathologist
 diagnoses, especially using tumor infiltrating lympho-
 cytes and PD-L1 expression (Hendry et al. 2017; Amgad
 et al. 2020; Corredor et al. 2018; Klauschen et al. 2018;
 Lu et al. 2019; Udall et al. 2018) the current manuscript
 is intended to prove something more subtle, but practi-
 cal, that is, the ability of pathologists with no previ-
 ous training to use a platform to quantify and compare
 morphometric data. None of the authors had experience
 in scripting, coding, or had a background in computer
 sciences. Bankhead tested the performance of QuPath
 in colon cancer samples using tissue microarrays and

413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432

433 quantified p53, PD-L1, and CD8, elegantly showing the
434 power of the software in predicting patients' survival
435 (Bankhead et al. 2017).

436 The utility of assessing PD-L1 in urothelial carcinoma
437 in predicting immune checkpoint inhibitor therapy has
438 been established recently with strong supporting data
439 (van der Heijden et al. 2021; Sotelo et al. 2021; Balar
440 et al. 2017). However, intratumoral heterogeneity in
441 PD-L1 expression may explain some of the controver-
442 sies and lack of consensus (Weyerer et al. 2021). Five
443 different anti- PD-1 (durvalumab, nivolumab and pem-
444 brolizumab) or anti-PD- L1 antibodies (atezolizumab
445 and avelumab) are approved by the FDA for patients
446 with locally advanced urothelial carcinoma. In addition,
447 the complexity of the tumor immune environment
448 can not be established for a positive/negative threshold
449 for PD-L1 expression alone (pembrolizumab: combined
450 positive score, CPS, cut-off=10%; atezolizumab: immune
451 cell score, cut-off=5%; durvalumab: tumor cell area/
452 immune cell area algorithm, cut-off=25%). Therefore,
453 and other predictors such as evaluation, subtyping and
454 quantification of infiltrating lymphocytes have been pro-
455 posed (Gevaert et al. 2021).

456 In the current manuscript, we were able to assess
457 CD8+ infiltrating lymphocytes in a moderate-sized
458 cohort of both low-grade and high-grade urothelial car-
459 cinoma with good agreement between the pathologist
460 assessment using % of the area (in the cores) and QuPath
461 quantification of the number of cells/mm². According to
462 Weyerer et al., little is known about the meaning of dif-
463 ferential PD-L1 expression on tumor and immune cells,
464 regarding response to therapy, especially in therapy-naïve
465 patients (Weyerer et al. 2021). Follow-up and treatment
466 information is not available for our cohort, and this may
467 be the great weakness of the paper. However, the main
468 objective was to validate a way of measuring and not
469 establish scientific correlations per se.

470 Currently, several drug-specific algorithms in immu-
471 notherapy are in use worldwide and, while there are
472 attempts at standardization, there is differential sensitiv-
473 ity of the assays, distinct protocols for tumor types, and
474 multiple choices of drugs from the oncologists' point of
475 view. Thus, surgical pathologists face daily challenges in
476 choosing which clone to use and how to score (tumor
477 cells, immune cells, combined scores, etc.) (Udall et al.
478 2018; Tsao et al. 2017; Doroshow et al. 2021).

479 Evaluating tumor immune microenvironment is puz-
480 zling, since tissue samples are usually limited, and just a
481 static representation of a dynamic and ongoing process.
482 To better understand the interplay between different
483 cells, one approach has been to use multiplex immu-
484 nohistochemistry with the benefits of utilizing several
485 epitopes to study cellular compositions and relations,

486 concurrently quantifying, and locating tumor microen-
487 vironment (Tan et al. 2020; Viratham Pulsawatdi et al.
488 2020). Xie et al. used a tri-chromogen multiplex IHC and
489 immunofluorescence protocols to characterize immune
490 markers in high-grade urothelial carcinoma and utilized
491 QuPath for immune infiltrate quantification and found
492 good correlation between multiplex and singleplex IHC
493 and between multiplex and manual scoring (Xie et al.
494 2021).

495 The methodology in this study included use of TMA's,
496 training the algorithm to recognize cores with pre-
497 dominantly low and high-grade morphologies, iden-
498 tify and quantify PD-L1 expression withing tumor cells
499 and calculate CD8 positive cell density within the cores.
500 The use of the random trees classifier protocol to train
501 and test the algorithm have been attempted with results
502 prior (Loughrey et al. 2018; Bankhead et al. 2017). In our
503 cohort of bladder cancer, the morphologic features that
504 allowed best distinction between tumor grade are simi-
505 lar to the ones used routinely by pathologists in assigning
506 malignancy in a subjective way: nuclear size and hyper-
507 chromasia (nucleus area and optical density), nuclear
508 circularity, nuclear perimeter, nuclear to cytoplasmic or
509 cell rasion and cell area. This feature was complemented
510 with the validation of the calculation of cell density calcu-
511 lated by the identification of DAB positive cells (CD8 and
512 PD-L1), and since PD-L1 is a marker that can mark both
513 tumor as well as immune cells, after tumor cell identifica-
514 tion training, the calculation was based only in tumor cell
515 morphology positive for PD-L1. Both had very good cor-
516 relation with the current state of the art, which is analy-
517 ses by experienced pathologists either using immune cell
518 density expressed by percentage of area, or percentage of
519 tumor cells positive for PD-L1 such as the Tumor Pro-
520 portion Score.

521 In conclusion, we were able to demonstrate the utili-
522 ty of QuPath in identifying and scoring tumor cells and
523 IHC quantification and showed in a step by step manner
524 the directions of using the program in a very basic way.
525 The goal was to illustrate with images an easy way to use
526 this free platform with little experience in programming
527 or even in digital pathology. With the increasing avail-
528 ability and decreasing costs for whole slide scanning
529 hardware, the chance of using a software in both research
530 and diagnostics are hopefully reproducible and will yield
531 large amounts of data and biomarker finding (Deroul-
532 ers et al. 2013; Huang et al. 2021; Ryu et al. 2019). In the
533 post-pandemic world, we hope and expect that the use of
534 digital images and quantification will be used widely in
535 both clinical diagnoses and research, as these have been
536 validated in many centers (Huang et al. 2021; Hanna et al.
537 2020).



539 **Abbreviations**

540 CD8: Cluster of differentiation 8; PD-L1: Program death ligand 1; PD-1: Program
541 death 1; IHC: Immunohistochemistry; TPS: Tumor proportion score; CPS: Com-
542 bined proportion score; HE: Hematoxylin-eosin; TMA: Tissue microarray.

543 **Acknowledgements**

544 Not applicable.

545 **Authors' contributions**

546 AR and FT reviewed all the slides and performed morphological evaluation
547 of histology. FT, AR, JC and PGS participated in the design of the study and
548 performed the statistical analysis. AR, CN, LCM and GV collected the data,
549 reviewed patient information and participated in the laboratory protocols. FT
550 an PGS conceived of the study, and participated in its design and coordination
551 and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final
552 manuscript.

553 **Funding**

554 No external funding was used.

555 **Availability of data and materials**

556 Please contact author for data requests.

557 **Declarations**558 **Ethics approval and consent to participate**

559 This study was approved by the Institutional Review Board of UNICHRISTUS,
560 Fortaleza-CE, Brazil.

561 **Consent for publication**

562 Not applicable.

563 **Competing interests**

564 The authors declare that they have no competing interests.

565 **Author details**

566 ¹ICC, Laboratory of Molecular Biology and Genetics, Fortaleza, Brazil. ²Argos
567 Laboratory, Av Santos Dumont 5753, #1607, Fortaleza CE, 60175047, Brazil.
568 ³Department of Pathology, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil.

569 Received: 12 February 2022 Accepted: 11 April 2022

570

571 **References**

- 572 A08 A09 Amgad M, Stovgaard ES, Balslev E, Thagaard J, Chen W, Dudgeon S, Sharma
573 A, Kermer JK, Denkert C, Yuan Y, et al. Report on computational
574 A10 assessment of tumor infiltrating lymphocytes from the international
575 Immuno-oncology biomarker working group. *NPJ Breast Cancer*.
576 2020;6:16.
577 Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, Powles T, Petrylak DP, Bellmunt J, Loriot Y,
578 Necchi A, Hoffman-Censits J, Perez-Gracia JL, et al. Atezolizumab as first-
579 line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and
580 metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial.
581 *Lancet*. 2017;389:67–76.
582 Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD,
583 McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, et al. QuPath: open source
584 software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7:16878.
585 Cimino-Mathews A. Novel uses of immunohistochemistry in breast pathology:
586 interpretation and pitfalls. *Mod Pathol*. 2021;34:62–77.
587 Corredor G, Wang X, Zhou Y, Lu C, Fu P, Syrigos K, Rimm DL, Yang M, Romero
588 E, Schalper KA, et al. Spatial architecture and arrangement of tumor-infil-
589 trating lymphocytes for predicting likelihood of recurrence in early-stage
590 non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2018;25:1526–34.
591 Deroulers C, Ameisen D, Badoual M, Gerin C, Granier A, Lartaud M. Analyz-
592 ing huge pathology images with open source software. *Diagn Pathol*.
593 2013;8:92.

- Doroshov DB, Bhalla S, Beasley MB, Sholl LM, Kerr KM, Gnjatic S, Wistuba
594 Il, Rimm DL, Tsao MS, Hirsch FR. PD-L1 as a biomarker of response to
595 immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18:345–62.
596 Favresse J, Lardinois B, Chatelain B, Mullier F, Jacqmin H. A reminder of the
597 place of morphology and the H-score in the diagnosis of hemophago-
598 cytic lymphohistiocytosis (HLH). *Clin Case Rep*. 2018;6:527–8.
599 Gevaert T, Cimadamore A, Montroni R, Eckstein M. PD-L1 testing for Urothelial
600 carcinoma: interchangeability, reliability and future perspectives. *Curr
601 Drug Targets*. 2021;22:162–70.
602 Gray RT, Cantwell MM, Coleman HG, Loughrey MB, Bankhead P, McQuaid S,
603 O'Neill RF, Arthur K, Bingham V, McGready C, et al. Evaluation of PTGS2
604 expression, PIK3CA mutation, aspirin use and Colon Cancer survival in a
605 population-based cohort study. *Clin Transl Gastroenterol*. 2017;8:e91.
606 Guo H, Ding Q, Gong Y, Gilcrease MZ, Zhao M, Zhao J, Sui D, Wu Y, Chen H, Liu
607 H, et al. Comparison of three scoring methods using the FDA-approved
608 22C3 immunohistochemistry assay to evaluate PD-L1 expression in
609 breast cancer and their association with clinicopathologic factors. *Breast
610 Cancer Res*. 2020;22:69.
611 Gurgel DC, Wong DVT, Bandeira AM, Pereira JFB, Gomes-Filho JV, Pereira AC,
612 Barros Silva PG, Tavora FRF, Pereira AF, Lima-Junior RCP, Almeida PRC.
613 Cytoplasmic CCR7 (CCR7c) immunorepression is associated with local
614 tumor recurrence in triple-negative breast cancer. *Pathol Res Pract*.
615 2020;216:153265.
616 Hanna MG, Reuter VE, Ardon O, Kim D, Sirintrapun SJ, Schüffler PJ, Busam KJ,
617 Sauter JL, Brögi E, Tan LK, et al. Validation of a digital pathology system
618 including remote review during the COVID-19 pandemic. *Mod Pathol*.
619 2020;33:2115–27.
620 Hardy LB, Fitzgibbons PL, Goldsmith JD, Eisen RN, Beasley MB, Souers RJ,
621 Nakhleh RE. Immunohistochemistry validation procedures and practices:
622 a College of American Pathologists survey of 727 laboratories. *Arch
623 Pathol Lab Med*. 2013;137:19–25.
624 Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by
625 immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for pre-
626 dicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin
627 Oncol*. 1999;17:1474–81.
628 Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de
629 Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PJ, et al. Assessing tumor-infiltrat-
630 ing lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and
631 proposal for a standardized method from the international immunoon-
632 cology biomarkers working group: part 1: assessing the host immune
633 response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ,
634 metastatic tumor deposits and areas for further research. *Adv Anat
635 Pathol*. 2017;24:235–51.
636 Huang W, Randhawa R, Jain P, Iczkowski KA, Hu R, Hubbard S, Eickhoff J, Basu
637 H, Roy R. Development and validation of an artificial intelligence-pow-
638 ered platform for prostate Cancer grading and quantification. *JAMA Netw
639 Open*. 2021;4:e2132554.
640 Humphries MP, Hynes S, Bingham V, Cougot D, James J, Patel-Socha F,
641 Parkes EE, Blayney JK, O'Rourke MA, Irwin GW, et al. Automated tumour
642 recognition and digital pathology scoring unravels new role for PD-L1
643 in predicting good outcome in ER+/HER2+ breast Cancer. *J Oncol*.
644 2018;2018:2937012.
645 Humphries MP, Maxwell P, Salto-Tellez M. QuPath: The global impact of an
646 open source digital pathology system. *Comput Struct Biotechnol J*.
647 2021;19:852–9.
648 Ilyas M, Grabsch H, Ellis IO, Womack C, Brown R, Berney D, Fennell D, Salto-
649 Tellez M, Jenkins M, Landberg G, et al. Guidelines and considerations
650 for conducting experiments using tissue microarrays. *Histopathology*.
651 2013;62:827–39.
652 Junger H, Dobi D, Chen A, Lee L, Vasquez JJ, Tang Q, Laszik ZG. Novel in situ
653 hybridization and multiplex immunofluorescence technology combined
654 with whole-slide digital image analysis in kidney transplantation. *J Histo-
655 chem Cytochem*. 2020;68:445–59.
656 Kılvaer TK, Paulsen EE, Andersen S, Rakaee M, Bremnes RM, Busund LR, Don-
657 nem T. Digitally quantified CD8+ cells: the best candidate marker for
658 an immune cell score in non-small cell lung cancer? *Carcinogenesis*.
659 2020;41:1671–81.
660 Klauschen F, Müller KR, Binder A, Bockmayr M, Hägele M, Seegerer P, Wienert
661 S, Pruneri G, de Maria S, Badve S, et al. Scoring of tumor-infiltrating
662 lymphocytes: from visual estimation to machine learning. *Semin Cancer
663 Biol*. 2018;52:151–7.



Journal : **BMCTwo 42047**

Article No : **112**

MS Code :

Dispatch : **26-4-2022**

LE

CP

Pages : **11**

TYPESET

DISK

- 665 Levy-Jurgenson A, Tekpli X, Kristensen VN, Yakhini Z. Spatial transcriptomics
666 inferred from pathology whole-slide images links tumor heterogeneity to
667 survival in breast and lung cancer. *Sci Rep*. 2020;10:18802.
- 668 Loughrey MB, Bankhead P, Coleman HG, Hagan RS, Craig S, McCorry AMB, Gray
669 RT, McQuaid S, Dunne PD, Hamilton PW, et al. Validation of the systematic
670 scoring of immunohistochemically stained tumour tissue microarrays
671 using QuPath digital image analysis. *Histopathology*. 2018;73:327–38.
- 672 Lu S, Stein JE, Rimm DL, Wang DW, Bell JM, Johnson DB, Sosman JA, Schalper
673 KA, Anders RA, Wang H, et al. Comparison of biomarker modalities for
674 predicting response to PD-1/PD-L1 checkpoint blockade. *JAMA Oncol*.
675 2019;5:1195.
- 676 Lu X, Yu P, Tao H, Chen Y, Lu J. Correlation between TOPA2A gene expression
677 and the number of CD4(+) T cells in hepatocellular carcinoma and its
678 clinical prognostic significance. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*.
679 2022;38:24–31.
- 680 McCarty KS Jr, Szabo E, Flowers JL, Cox EB, Leight GS, Miller L, Konrath J, Soper
681 JT, Budwit DA, Creasman WT, et al. Use of a monoclonal anti-estrogen
682 receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human
683 tumors. *Cancer Res*. 1986;46:4244–8.
- 684 McGinnis LM, Ibarra-Lopez V, Rost S, Ziai J. Clinical and research applications
685 of multiplexed immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Pathol*.
686 2021;254:405–17.
- 687 Meyerholz DK, Beck AP. Principles and approaches for reproducible scoring of
688 tissue stains in research. *Lab Invest*. 2018;98:844–55.
- 689 Moraes CE, Gurgel DC, Teixeira AC, Mattos TVA, Silva A, Tavora F. Prevalence of
690 ERG expression and PTEN loss in a Brazilian prostate cancer cohort. *Braz J
691 Med Biol Res*. 2019;52:e8483.
- 692 Morriss NJ, Conley GM, Ospina SM, Meehan WP, Qiu J, Mannix R. Automated
693 Quantification of Immunohistochemical Staining of Large Animal Brain
694 Tissue Using QuPath Software. *Neuroscience*. 2020;429:235–44 Elsevier
695 Ltd.
- 696 Officer LK, Andreou KF, Teodósio AV, He Z, Le Quesne JP. Automated co-in
697 situ hybridization and immunofluorescence using archival tumor tissue.
698 *Methods Mol Biol*. 2020;2148:245–56.
- 699 Oh KS, Mahalingam M. Immunohistochemistry as a genetic surrogate in Der
700 matopathology: pearls and pitfalls. *Adv Anat Pathol*. 2019;26:390–420.
- 701 Ozbudak IH, Shilo K, Tavora F, Rassael N, Chu WS, Fukuoka J, Jen J, Travis WD,
702 Franks TJ. Glucose transporter-1 in pulmonary neuroendocrine carcino
703 mas: expression and survival analysis. *Mod Pathol*. 2009;22:633–8.
- 704 Ram S, Vizcarra P, Whalen P, Deng S, Painter CL, Jackson-Fisher A, Pirie
705 Shepherd S, Xia X, Powell EL. Pixelwise H-score: a novel digital image
706 analysis-based metric to quantify membrane biomarker expression from
707 immunohistochemistry images. *PLoS One*. 2021;16:e0245638.
- 708 Ross J, Li G, Yang XJ. Application and pitfalls of immunohistochemistry in
709 diagnosis of challenging genitourinary cases. *Arch Pathol Lab Med*.
710 2020;144:290–304.
- 711 Ryu HS, Jin MS, Park JH, Lee S, Cho J, Oh S, Kwak TY, Woo JI, Mun Y, Kim SW,
712 et al. Automated Gleason scoring and tumor quantification in prostate
713 Core needle biopsy images using deep neural networks and its compari
714 son with pathologist-based assessment. *Cancers (Basel)*. 2019;11:1860.
- 715 Sattunwar S, Malenie R, Stilton A, Dai D, Aly FZ. Validation of immunohisto
716 chemical tests performed on cytology cell block material: practical appli
717 cation of the College of American Pathologists' guidelines. *Cytojournal*.
718 2019;16:6.
- 719 Shah AA, Bourne TD, Murali R. BAP1 protein loss by immunohistochemistry:
720 a potentially useful tool for prognostic prediction in patients with uveal
721 melanoma. *Pathology*. 2013;45:651–6.
- 722 Shelton J, Purgina BM, Cipriani NA, Dupont WD, Plummer D, Lewis JS Jr. p16
723 immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a
724 comparison of antibody clones using patient outcomes and high-risk
725 human papillomavirus RNA status. *Mod Pathol*. 2017;30:1194–203.
- 726 Sotelo M, Alonso-Gordoa T, Gajate P, Gallardo E, Morales-Barrera R, Perez-Gracia
727 JL, Puente J, Sanchez P, Castellano D, Duran I. Atezolizumab in locally
728 advanced or metastatic urothelial cancer: a pooled analysis from the
729 Spanish patients of the IMvigor 210 cohort 2 and 211 studies. *Clin Transl
730 Oncol*. 2021;23:882–91.
- 731 Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, Ng HHM, Wu D, Wee YTF, Lim JCT, Yeong J, Lim
732 TKH. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluores
733 cence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Commun
734 (Lond)*. 2020;40:135–53.
- Tsao M, Kerr K, Yatabe Y, Hirsch FR. PL 03.03 blueprint 2: PD-L1 immunohisto-
735 chemistry comparability study in real-life, clinical samples. *J Thorac Oncol*.
736 2017;12:S1606.
- 737 Udall M, Rizzo M, Kenny J, Doherty J, Dahm S, Robbins P, Faulkner E. PD-L1
738 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and
739 test-validation metrics. *Diagn Pathol*. 2018;13:12.
- 740 van der Heijden MS, Loriot Y, Duran I, Ravaud A, Retz M, Vogelzang NJ, Nelson
741 B, Wang J, Shen X, Powles T. Atezolizumab versus chemotherapy in
742 patients with platinum-treated locally advanced or metastatic Urothelial
743 carcinoma: a long-term overall survival and safety update from the phase
744 3 IMvigor211 clinical trial. *Eur Urol*. 2021;80:7–11.
- 745 Viratham Pulsawatdi A, Craig SG, Bingham V, McCombe K, Humphries MP,
746 Senevirathne S, Richman SD, Quirke P, Campo L, Domingo E, et al. A
747 robust multiplex immunofluorescence and digital pathology workflow
748 for the characterisation of the tumour immune microenvironment. *Mol
749 Oncol*. 2020;14:2384–402.
- 750 Vougiouklakis T, Belovarac BJ, Lytle A, Chiriboga L, Ozerdem U. The diagnostic
751 utility of EZH2 H-score and Ki-67 index in non-invasive breast apocrine
752 lesions. *Pathol Res Pract*. 2020;216:153041.
- 753 Weyerer V, Strissel PL, Strick R, Sikić D, Geppert CI, Bertz S, Lange F, Taubert H,
754 Wach S, Breyer J, et al. Integration of spatial PD-L1 expression with the
755 tumor immune microenvironment outperforms standard PD-L1 scoring
756 in outcome prediction of Urothelial Cancer patients. *Cancers (Basel)*.
757 2021;13:2327.
- 758 Xie Y, Olkhov-Mitsel E, Alminawi S, Slodkowska E, Downes MR. Develop-
759 ment of a multiplex immuno-oncology biomarker and digital pathol-
760 ogy workflow for assessment of urothelial carcinoma. *Pathol Res Pract*.
761 2021;226:153607.
- 762 Yang Y, Xiao M, Song Y, Tang Y, Luo T, Yang S, He W, Cheng Q, Ma L, Zhang
763 Y, et al. H-score of 11 beta-hydroxylase and aldosterone synthase in
764 the histopathological diagnosis of adrenocortical tumors. *Endocrine*.
765 2019;65:683–91.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Journal : **BMCTwo 42047**

Article No : **112**

MS Code :

Dispatch : **26-4-2022**

LE

CP

Pages : **11**

TYPESET

DISK

Journal:	42047
Article:	112

Author Query Form

Please ensure you fill out your response to the queries raised below and return this form along with your corrections

Dear Author

During the process of typesetting your article, the following queries have arisen. Please check your typeset proof carefully against the queries listed below and mark the necessary changes either directly on the proof/online grid or in the 'Author's response' area provided below

Query	Details Required	Author's Response
AQ1	Please check if the affiliations are presented correctly.	
AQ2	Please check if the section headings are assigned to appropriate levels.	
AQ3	Please check figures 1-7 caption are captured correctly.	
AQ4	Figures 2,3 contains text below the minimum required font size of 6pts inside the artwork, and there is no sufficient space available for the text to be enlarged. Please provide replacement figure file.	
AQ5	Figures 6,7 contains poor quality and small text inside the artwork. Please do not re-use the file that we have rejected or attempt to increase its resolution and re-save. It is originally poor, therefore, increasing the resolution will not solve the quality problem. We suggest that you provide us the original format. We prefer replacement figures containing vector/editable objects rather than embedded images. Preferred file formats are eps, ai, tiff and pdf.	
AQ6	Please check backmatter section if captured correctly.	
AQ7	Reference [McGinnis LM et al. 2021] has the same content with the originally provided thus we deleted the duplicate reference and renumber the affected citations accordingly. Please check action taken is appropriate.	
AQ8	Reference [Gurgel DC et al. 2020] has the same content with the originally provided thus we deleted the duplicate reference and renumber the affected citations accordingly. Please check action taken is appropriate.	
AQ9	Reference [Bankhead P et al. 2017] has the same content with the originally provided thus we deleted the duplicate reference and renumber the affected citations accordingly. Please check action taken is appropriate.	
AQ10	Reference [Oh KS and Mahalingam M 2019] has the same content with the originally provided thus we deleted the duplicate reference and renumber the affected citations accordingly. Please check action taken is appropriate.	

10.ANEXO C

Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations
Expression of tumoral GSK3- β , PD-L1, and CD8 cell density in urothelial carcinomas,
association with tumor grade and recurrence
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Article
Keywords:	Bladder cancer; urothelial carcinoma; immunotherapy; PD-L1; GSK-3 β ; CD8; immunohistochemistry
Corresponding Author:	Fabio Tavora Federal University of Ceara Fortaleza, CE BRAZIL
First Author:	Aline Rodrigues
Order of Authors:	Aline Rodrigues Paulo Goberlano Silva, PhD Cleto D Nogueira Samuel S Ferreira Juliana Cordeiro, PhD Benedito Carneiro, MD Fabio Tavora
Abstract:	Bladder cancer is the most common malignancy in the urinary. The programmed cell death 1 (PD-1) and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) axis play a putative role in immune checkpoints and as a means through which cancer evades the immune system. Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) has been identified as a potential therapeutic target in human bladder cancer. Inhibition of the enzyme GSK-3 β leads to the downregulation of PD-1 via upregulation of the transcription factor Tbet. We aimed to investigate the protein expression of PD-L1 and GSK-3 β and the CD8-positive immune infiltrates in bladder carcinomas and validate a digital pathology scoring system. Basic procedures: This study consisted of 140 samples of urothelial carcinomas from 2015 to 2018. Automated digitally assisted scoring and conventional analyses of the markers of GSK-3 β (27C10), CD8 (7103 β), and PDL-1 (22c3) were reviewed by two pathologists independently, and a histologic score was calculated. The density of intertumoral CD8+ lymphocytes was also measured. Main findings: The immunoexpression of GSK-3 β (91%) was presented in most samples, with any PD-L1 positivity in 62.9%. Levels of GSK-3 β and PD-L1 (p=0.033) and CD8 and PD-L1 (p<0.002) showed significant correlations. The positivity of GSK-3 β and PD-L1 was predominant in high-grade tumors. In multivariate analyses, PD-L1 expression was associated with recurrence-free survival. Conclusions: Despite the tumor microenvironment heterogeneity, the expression of CD8, GSK-3 β , and PDL1 could be of value, and GSK-3 β could be a potential target in advanced bladder cancer, especially in the context of immunotherapy.
Suggested Reviewers:	Luciana Schultz, MD Syrian-Lebanese Hospital lu_schultz@yahoo.com.br Isabela Werneck, MD Sao Luiz Hospital Jabaquara Unit iwerneck0210@gmail.com
Opposed Reviewers:	

Cover Letter

October 12, 2022

Editor-in-Chief:
Urologic Oncology
Michael J. Droller

Dear Editor,

Please find the manuscript entitled “**Expression of tumoral GSK3- β , PD-L1, and CD8 cell density in urothelial carcinomas, association with tumor grade and recurrence**”.

The study has not been submitted to any publication, we have no external funding sources, and there are no conflicts of interest. All authors have approved the current version of the manuscript and contributed to the paper's design and making.

We hope the manuscript meets approval for publication in your esteemed Journal.

Sincerely,

Fabio Tavora, MD, PhD
Argos Laboratory
Federal University of Ceara
Fortaleza, Brazil

**Expression of tumoral GSK3- β , PD-L1, and CD8 cell density in urothelial
carcinomas, association with tumor grade and recurrence**

Short title: GSK3, PD-L1, and CD8 biomarkers in urothelial carcinomas

Aline Rodrigues¹ - alinekimberlyxx@gmail.com

Paulo Goberlanio Silva¹- paulo.goberlanio@gmail.com

Cleto Nogueira^{2,3} - cletonogueira@gmail.com

Samuel S Ferreira^{2,3} - samuelsilvasv@gmail.com

Juliana Cordeiro^{1,2} - cordeiro.juliana@gmail.com

Benedito Carneiro⁴ – benedito.carneiro@brown.edu

Fabio Tavora^{2,3} – ftavora@gmail.com

1. ICC (Ceara Cancer Institute), Laboratory of Molecular Biology and Genetics,
Fortaleza, Brazil

2. Argos Laboratory, Fortaleza, Brazil

3. Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceara, Brazil

4. Department of Oncology, Brown University

Address for correspondence:

Fabio Tavora, MD, PhD

Argos Laboratory

Av Santos Dumont 573, #1607

Fortaleza, CE 60175-047

Abstract

Background: Bladder cancer is the most common malignancy in the urinary. The programmed cell death 1 (PD-1) and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) axis play a putative role in immune checkpoints and as a means through which cancer evades the immune system. Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) has been identified as a potential therapeutic target in human bladder cancer. Inhibition of the enzyme GSK-3 β leads to the downregulation of PD-1 via upregulation of the transcription factor Tbet. We aimed to investigate the protein expression of PD-L1 and GSK-3 β and the CD8-positive immune infiltrates in bladder carcinomas and validate a digital pathology scoring system.

Basic procedures: This study consisted of 140 samples of urothelial carcinomas from 2015 to 2018. Automated digitally assisted scoring and conventional analyses of the markers of GSK-3 β (27C10), CD8 (7103 β), and PDL-1 (22c3) were reviewed by two pathologists independently, and a histologic score was calculated. The density of intertumoral CD8+ lymphocytes was also measured. **Main findings:** The immunoexpression of GSK-3 β (91%) was presented in most samples, with any PD-L1 positivity in 62.9%. Levels of GSK-3 β and PD-L1 ($p=0.033$) and CD8 and PD-L1 ($p<0.002$) showed significant correlations. The positivity of GSK-3 β and PD-L1 was predominant in high-grade tumors. In multivariate analyses, PD-L1 expression was associated with recurrence-free survival. **Conclusions:** Despite the tumor microenvironment heterogeneity, the expression of CD8, GSK-3 β , and PDL1 could be of value, and GSK-3 β could be a potential target in advanced bladder cancer, especially in the context of immunotherapy.

Keywords: Bladder cancer, urothelial carcinoma, immunotherapy, PD-L1, GSK-3 β , CD8, immunohistochemistry.

1. Introduction

Bladder cancer is the most common urinary tract neoplasia and is the first cause of death among human urologic cancers. More than 575 thousand new cases of bladder cancer are estimated worldwide, varying according to specific regions. [1] Numbers from the Brazilian National Cancer Institute (INCA) show that the rate of new cases of bladder cancer in Brazil from 2020 to 2022 could be 7,590 cases for men and 3,050 for women. [2]

Glycogen synthase kinase (GSK) 3 is a serine/threonine kinase that was initially identified as a regulator of glycogen metabolism, composed of the two isoforms GSK- α and GSK- β (GSK-3 β), and both encoded by different genes located on chromosome/7, chromosome/19, chromosome/16, chromosome/3. [3] Recently, several studies have observed that GSK-3 β is directly linked to the processes of neoplastic transformation, tumor growth, and metastasis. [4] GSK-3 β has been identified as a promising new therapeutic target in bladder cancer.[5] More recently, a new molecule that acts as a GSK-3 β inhibitor, 9-ING-41, has shown antitumor activity in bladder cancer cell lines. [9] Clinically, this drug has demonstrated antitumor effects in neuroblastoma, B-cell lymphoma, glioblastoma, ovarian, pancreatic, renal, and breast cancer. [6]

GSK-3 β has been proven to act in cell cycle regulation, apoptosis, and immune response in several cancers, with its nuclear labeling linked to high tumor grade. [7] [8] Inhibition of this interaction (PD1/PD-L1) increases the activity of T cells, causing an antitumor reaction and the inactivation of GSK- β blocks the expression of PD1 in CD8 positive lymphocytes. [10] Expression of active GSK-3 β may also inhibit the proliferation of T cells. [11] PD1 and PD-L1 blockade have shown clinical treatment efficacy in patients with advanced or metastatic UC. [29] [30] Atezolizumab and

Durvalumab have been approved for inoperable and metastatic diseases. In this study, we aimed to evaluate the immunostaining of GSK-3 β in bladder cancer and its association with PD-L1 tumor proportion score and CD8 positive infiltrating cells in the tumor microenvironment e series of urothelial carcinomas.

2. Methods

2.1 Patient Samples

This was an observational, cross-sectional, retrospective, and analytical study on a population diagnosed with bladder cancer by transurethral resection from a single institution between 2015 and 2018.

One hundred and forty (140) sequential patients were analyzed and included according to inclusion criteria. Clinical and laboratory data were collected from electronic medical records in the respective hospital units where each patient was being followed up. All samples from patients diagnosed with invasive and non-invasive bladder cancer confirmed by histological analysis, with sufficient material for constructing Tissue Microarray (TMA), were included. Samples that did not have materials available for the construction of the TMA were excluded. The blocks and slides were stained with hematoxylin and eosin (HE). The Research Ethics Committee approved the study.

2.2 Tissue microarray and immunohistochemistry

The preparation of the TMA was described according to Filho et al. (2021). Briefly, the histologic slides were reviewed by an experienced genitourinary pathologist, and areas from the invasive front of the tumor, and areas with inflammation, were selected. Paraffin blocks were submitted to 3 μ histological sections, subsequently fixed on FLEX IHC Microscope Slides (Agilent®). GSK-3 β (27C10, 1:100, CellSignaling®), CD8 (m7103, Dako®), and PDL-1 (22c3, Dako®) immunostaining were performed according to individual protocols for each antibody in Ventana BenchMark GX machines, Agilent Autostainer, and manual reaction.

GSK-3 β followed the antigen recovery process on the PT Link equipment with a pH 6.0 buffer solution, use of the Envision Flex kit (Agilent) for blocking endogenous peroxidase, overnight incubation with primary antibody (corresponding to 12 hours of reaction), immunological amplification and counterstaining with EnVision FLEX (Dako® K4065) + DAB (Dako® K3469).

Slides were scanned in the 3DHistech equipment (Pannoramic Desk®). The files were then imported to Qupath ® software, which allowed ample analysis. The files were loaded onto a project in QuPath software (QuPath source code, documentation, and links to the software download are available at <https://qupath.github.io>). QuPath's segmentation feature can detect thousands of cells, identify them as objects in a hierarchical manner below the annotation, TMA cores, or cases, and measure cell morphology and biomarker expression at the same time.

CD8 density was calculated by running a script on QuPath with an output of CD8 positive cells / mm² of tissue (for each core). For PD-L1 and GSK-3 β scoring, analyses were run based on Positive Cell Detection and membrane and cytoplasm staining. Cytoplasmic positive (mean DAB staining) Quantification was measured only in cells detected as tumor cells, not stroma and other cells. QuPath output was able to identify numbers of GSK-3B positive cells/mm² and, in addition, the H-score method was applied by the software, based on the extent and intensity of cytoplasmic staining (1-3), multiplied by the percentage of cells positive (proportion score), with a possible score ranging from 0-300.

2.3 Pathologist analysis

All cases evaluated by software analyses on QuPath were confirmed by two experienced (>10 years of experience) pathologists. The evaluation slides were digitized at 400x magnification and scanned in the 3DHistech equipment (Pannoramic Desk®). These analyses were calibrated with an excellent agreement between them (correlation coefficient interclass = 0.810, = 0.991, and 0.920 for CD8, PDL1, and GSK-3 β , respectively). Each pathologist performed the number of CD8+ cells / mm² counting, and the percent and intensity of GSK-3 β immunostaining were equally performed to calculate H-score. A pathologist scores PD-L1 on each core using the established Tumor Proportion Score (TPS) method (0-100) [37]. It was defined as the percentage of viable tumor cells showing partial or complete membrane PD-L1 staining at any intensity, as recommended in the current guidelines.

2.4 Statistical Approach

The mean \pm SD of immunostaining was calculated by each method and analyzed by Spearman correlation and Mann-Whitney test (nonparametric data). Clinical data was shown as absolute, and percentual frequencies and immunostaining of each immunomarker were categorized by (GSK-3 β H-score cutoff point = 100; CD8 = cutoff point = 20; PDL1 cutoff point = 0) and associated with clinic data by chi-square test. Kaplan-Meier curves were used for calculating recurrence-free time and overall survival, and Log-Rank Mantel-Cox and Cox regression models were used to determine risk factors for recurrence and death. All analyses were performed in SPSS v20.0 for Windows (IMB®).

Additionally, ROC curves were used for markers having death as an outcome to estimate immunostaining points suggestive of a worse prognosis.

3. Results

3.1 Clinical and epidemiological characterization of patients with urothelial carcinoma

140 patients were included, with samples obtained from the diagnostic transurethral resections. The final cohort comprised 140 urothelial carcinoma tissue samples, most of which were from men (n=109, 77.9%). The mean age of patients was 74.9±13.1, ranging from 24-108 years of age. Most patients were over 70 years old (n=93, 66.4%). Smoking and systemic arterial hypertension were described in 21 patients, and diabetes mellitus in only four (Table 1).

Table 1: Clinical and histopathological profile of patients with bladder cancer

	n (%)
Sex	
Female	31 (22.1%)
Male	109 (77.9%)
Age (74.9±13.1; 24-108)	
Below 70	47 (33.6%)
>70	93 (66.4%)
Risk factors	
Smoking	21 (15.1%)
Hypertension	21 (15.0%)
Diabetes	4 (2.9%)
Histological Features	
Muscle Invasion	83 (59.3%)
Necrosis	24 (17.1%)

Invasion into lamia propria alone	14 (43.8%)
Final pathological grade	
Low-grade	32 (24.1%)

The majority underwent subsequent surgery, either additional transurethral resection of the bladder or cystectomy (n=73, 88.0%), 27 (32.5%) patients underwent adjuvant chemotherapy, and 8 (9.6%) underwent adjuvant radiotherapy. Histologically, invasion into the detrusor muscle was present in 83 (59.3%) patients and necrosis in 24 (17.1%). Most tumors were classified as high-grade (n=101, 75.9%). All invasive tumors were high-grade (n=66, 65.3%) (Table 1).

ROC curves were determined as prognostically suggestive cutoffs (>0%, positive or negative) for PDL1, (>200 H-score) for GSK, and (>20 cells/mm²) for CD8.

3.2 Immunoexpression profile for GSK-3 β in patients with bladder cancer and its relationship with CD8 and PD-L1 immunoexpression

High GSK-3 β immunoexpression (H-score above 200) was observed in 12 patients (9.0%) (Figure 1A and 1B), and six samples could not be evaluated due to loss of tissue in the sections. The mean GSK-3 β H-score was 71.98 \pm 73.98, ranging from 0 to 300. Nuclear GSK-3 β was seen in 25 cases (18.8%), of which 20 (80.0%) cases were high-grade (p=0.598). Tumors with nuclear GSK-3 β had PD-L1 TPS of 60.7%, compared to TPS of 63.4% in tumors without nuclear GSK-3 β (p=0.793) (Table 2).

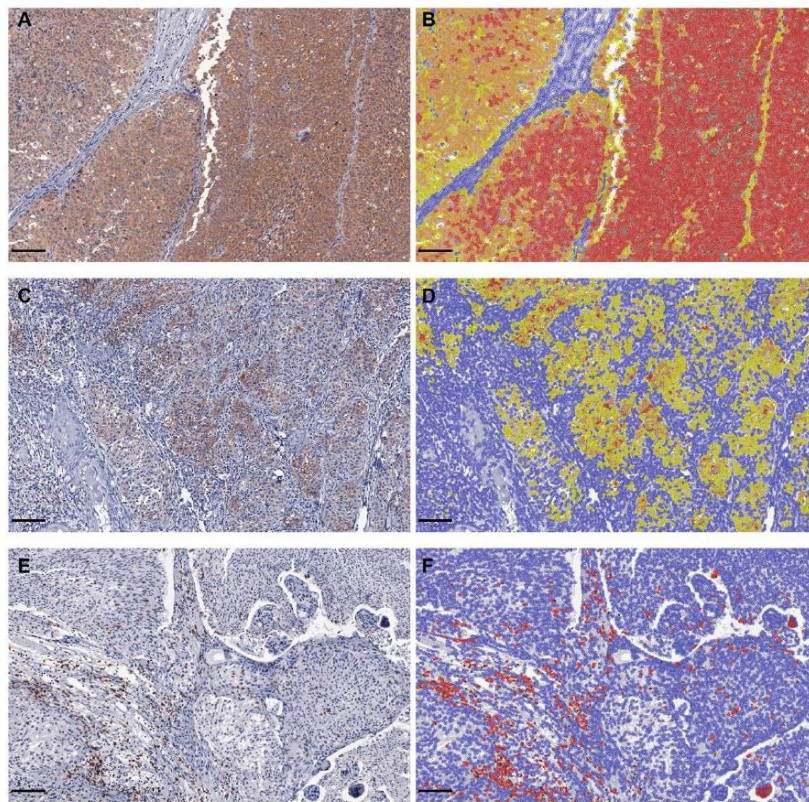


Figure 1. Schematic panel showing immunohistochemical reaction results for GSK-3 β (A and B), PD-L1 (C and D), and CD8 (E and F). Panels B, D, and F are graphical representations of Qupath's color outputs. The color outputs for PD-L1 and GSK are blue for negative, yellow for weak positivity, orange for moderate positivity, and red for strong positivity. These scores are used in the H-score calculator. The color output for CD8 positive detection used a single threshold (red) for positive cells. Bar = 100 μ m.

Table 2: Influence of sociodemographic variables on CD8 positive cell density, PD-L1 and GSK-3 β immunoeexpression, recurrence-free time and overall survival of patients with urothelial bladder carcinoma.

	GSK-3 β H-score		p	PD-L1 TPS		p	CD8 (cells/mm ²)		p	Relapse-free time			p	Overall survival			p	
	Below 200	>200		Value ^a	0%		>0%	Value ^a		Below 20	>20	Value ^a		RFT (%)	Average \pm SD (CI95%)	Median (CI95%)		Value ^a
All	122 (91.0%)	12 (9.0%)	-	88 (62.9%)		-	75 (54.0%)	64 (46.0%)	0	68 (80.0%)	50.63 \pm 7.66 (35.63-65.64)	47 (40.26-53.74)	-	77 (80.5%)	-	76.06 \pm 4.69 (66.86-85.26)	(-)	(-)
Sex																		
Female	20 (21.3%)	10 (25.0%)	0.636	10 (19.2%)	21 (23.9%)	0.524	16 (21.3%)	15 (23.4%)	0.766	12 (75.0%)	41.05 \pm 3.61 (33.98-48.12)	47 (40.51-53.49)	0.947	15 (93.8%)	46.00 \pm 2.85 (40.42-51.58)	(-)	0.441	
Male	74 (78.7%)	30 (75.0%)		42 (80.8%)	67 (76.1%)		59 (78.7%)	49 (76.6%)		56 (81.2%)	53.75 \pm 9.37 (35.39-72.11)	52 (36.26-67.74)		62 (88.6%)	74.11 \pm 5.91 (62.54-85.69)	(-)		
Age																		
Below 70	34 (36.2%)	10 (25.0%)	0.208	22 (42.3%)	25 (28.4%)	0.092	28 (37.3%)	18 (28.1%)	0.250	26 (81.3%)	44.34 \pm 3.17 (38.13-50.55)	47 (38.89-55.11)	0.470	32 (100.0%)	(-)	(-)	0.014	
>70	60 (63.8%)	30 (75.0%)		30 (57.7%)	65 (71.6%)		47 (62.7%)	46 (71.9%)		42 (79.2%)	59.08 \pm 7.97 (43.46-74.69)	(-)		45 (83.3%)	68.58 \pm 6.81 (55.22-81.93)	(-)		
Smoking																		
No	77 (82.8%)	35 (87.5%)	0.495	41 (80.4%)	77 (87.5%)	0.259	64 (86.5%)	53 (82.8%)	0.549	51 (78.5%)	51.16 \pm 8.36 (34.77-67.55)	52 (43.08-60.92)	0.699	59 (90.8%)	79.76 \pm 3.61 (72.69-86.84)	(-)	0.529	
Yes	16 (17.2%)	5 (12.5%)		10 (19.6%)	11 (12.5%)		10 (13.5%)	11 (17.2%)		17 (85.0%)	39.14 \pm 2.19 (34.85-43.42)	41 (36.63-45.37)		18 (85.7%)	38.04 \pm 2.72 (32.71-43.38)	41 (0.00-88.42)		
Hypertension																		
No	80 (85.1%)	34 (85.0%)	0.987	47 (90.4%)	72 (81.8%)	0.170	64 (85.3%)	54 (84.4%)	0.875	53 (81.5%)	53.03 \pm 8.31 (36.75-69.32)	52 (43.06-60.94)	0.170	60 (92.3%)	79.09 \pm 4.71 (69.86-88.32)	(-)	0.084	
Yes	14 (14.9%)	6 (15.0%)		5 (9.6%)	16 (18.2%)		11 (14.7%)	10 (15.6%)		15 (75.0%)	32.23 \pm 3.19 (25.96-38.49)	(-)		17 (81.0%)	32.90 \pm 3.18 (26.65-39.14)	(-)		
DM																		
No	92 (97.9%)	38 (95.0%)	0.371	51 (98.1%)	85 (96.6%)	0.610	73 (97.3%)	62 (96.9%)	0.872	65 (80.2%)	50.89 \pm 7.68 (35.83-65.96)	47 (40.25-53.75)	0.477	74 (90.2%)	76.68 \pm 4.71 (67.46-85.91)	(-)	0.198	
Yes	2 (2.1%)	2 (5.0%)		1 (1.9%)	3 (3.4%)		2 (2.7%)	2 (3.1%)		3 (75.0%)	26.50 \pm 7.36 (12.07-40.93)	(-)		3 (75.0%)	26.50 \pm 7.36 (12.07-40.93)	(-)		

*p<0.05, ^aTeste qui-quadrado or Fisher's exact test (n, %); ^bMann-Whitney Test (Average \pm SD); ^cLog-Rank Mantel-Cox Test (median time \pm SD and median time of recurrence-free survival and overall survival calculated using Kaplan-Meier curves). CI95% = 95% confidence interval; SLR = Relapse-free survival; GS = global survival; H-score = Histo-score. *p<0.05, a - Chi-square or Fisher's exact test (n, %);

Regarding PD-L1, 52 (37.1%) patients did not show tumor immunoeexpression for PDL1, and 88 (62.9%) showed at least focal staining. The mean PDL1 tumor proportion score (TPS) was $9.00 \pm 23.60\%$, ranging from 0 to 100 (Tables 3 and 4, Figures 1C and 1D).

CD8+ positive lymphocytes were absent in only four samples (2.9%). The average CD8 density was 61.10 ± 101.94 cells/mm², ranging from 0 to 538 cells/mm². Seventy-five (54.0%) samples had less than 20 cells/mm² and 64 (46.0 %) exhibited more than 20 cells/mm² (Figure 1E and 1F). Only one sample was not evaluated due to tissue loss in the CD8 immunohistochemistry stain.

There was a significant association between GSK-3 β and PDL1 ($p=0.033$) but not GSK-3 β with CD8 ($p=0.760$). However, CD8 immunoeexpression was significantly associated with PDL1 tumor positivity ($p<0.002$) (Table 3).

GSK-3 β immunoeexpression was not significantly influenced by clinical, therapeutic, or histopathological characteristics. PDL1 positivity was associated with high-grade tumors ($p=0.030$), and CD8+ lymphocyte density was inversely related to prior RT treatment ($p=0.021$) (Table 3).

Table 3: Influence CD8-positive lymphocyte density and PDL1 immunoeexpression on GSK immunoeexpression, recurrence-free time and overall survival of patients with urothelial carcinoma.

	GSK-3β H-score		p-value	PDL1 IFS		p-value ^a	CD8 (cd8/mm ²)		p-value ^a	Recurrence free time			Overall survival			p-value	
	below 200	>200		0%	>0%		At 20	>20		SLR (%)	Average±SD (CI95%)	Median (CI95%)	Value	SG (%)	Average±SD (CI95%)		Median (CI95%)
Pathologic																	
grade																	
Low-grade	25 (28.1%)	6 (15.4%)	0.123	16 (33.3%)*	16 (18.8%)	0.030	19 (26.0%)	13 (22.0%)	0.595	14 (70.0%)	38.73±3.66 (31.55-45.91)	47 (-)	0.500	19 (95.0%)	44.70±2.24 (40.31-49.09)	(-)	0.271
High-grade	64 (71.9%)	33 (84.6%)		32 (66.7%)	69 (81.2%)*		54 (74.0%)	46 (78.0%)		51 (82.3%)	54.94±9.91 (35.52-74.37)	52 (36.28-67.72)		55 (87.3%)	71.80±6.58 (58.90-84.70)	(-)	
Muscle invasion																	
No	37 (39.4%)	17 (42.5%)	0.735	18 (34.6%)	39 (44.3%)	0.259	31 (41.3%)	26 (40.6%)	0.933	25 (75.8%)	41.19±3.26 (34.00-47.59)	47 (40.94-53.06)	0.692	30 (88.2%)	46.92±3.21 (40.63-53.22)	(-)	0.805
Yes	57 (60.6%)	23 (57.5%)		34 (65.4%)	49 (55.7%)		44 (58.7%)	38 (59.4%)		43 (82.7%)	66.86±7.61 (51.90-81.82)	(-)		47 (90.4%)	79.72±3.96 (71.95-87.48)	(-)	
Necrosis																	
No	77 (81.9%)	34 (85.0%)	0.665	41 (78.8%)	75 (85.2%)	0.333	62 (82.7%)	54 (84.4%)	0.787	54 (78.3%)	40.53±2.47 (35.66-45.38)	47 (39.61-54.39)	0.245	62 (88.6%)	46.95±2.35 (42.34-51.56)	(-)	0.472
Yes	17 (18.1%)	6 (15.0%)		11 (21.2%)	13 (14.8%)		13 (17.3%)	10 (15.6%)		14 (87.5%)	78.69±6.82 (65.32-92.06)	(-)		15 (93.8%)	83.75±5.08 (73.79-93.71)	(-)	
CD8 (cd8/mm²)																	
Up to 20	65 (53.7%)	7 (58.3%)	0.760	37 (71.2%)*	38 (43.7%)	0.002	-	-	-	33 (78.6%)	51.08±9.09 (33.26-68.90)	52 (39.08-64.92)	0.889	37 (88.1%)	77.83±4.71 (66.61-87.05)	(-)	0.692
>20	-	-		-	49		-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
56 (46.3%)	5 (41.7%)		15 (28.8%)	(26.3%)*		-	-	-		34 (81.0%)	41.03±2.72 (35.70-46.35)	47 (-)		39 (90.7%)	45.10±2.27 (40.64-49.56)	(-)	
PDL1																	
0	48		0.033	-	-		-	-		-	-	-		25 (92.6%)	43.61±2.29 (39.12-48.10)	(-)	0.407
(39.3%)*	1 (8.3%)		-	-	-		-	-		24 (88.9%)	43.61±2.31 (38.11-49.11)	47 (-)	0.204	-	-	-	-
-	11		-	-	-		-	-		-	-	-		-	-	-	-
74 (60.7%)	(91.7%)*		-	-	-		-	-		44 (75.9%)	48.06±7.90 (32.56-63.55)	43 (34.18-51.82)		52 (88.1%)	73.21±6.58 (60.31-86.12)	(-)	
GSK-3β H-score																	
<100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61 (80.3%)	57.23±7.30 (42.92-71.54)	47 (38.74-55.26)	0.902	69 (89.6%)	75.89±5.05 (65.95-85.76)	(-)	0.633
>100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4 (66.7%)	43.67±10.76 (22.38-67.57)	52 (-)		5 (83.3%)	45.33±7.91 (29.83-60.84)	(-)	

*p<0.05, ^a Chi-squared Fisher Test (n, %); ^b Mann-Whitney Test (median±SD); ^c Log-Rank Mantel-Cox Test (median time±SD and mediated recurrence-free survival and overall survival calculated using Kaplan-Meier curves). CI95% = confidence interval 95%; SLR = Relapse-free survival; GS = global survival; H-score = Histoscore.

3.3 Analysis of global and recurrence-free survival

Overall, the mean recurrence-free survival was 50.63 ± 7.66 months, with 80.0% of the patients showing no recurrence in 2021. The mean overall survival was 76.06 ± 4.69 , with 89.5% of patients alive during the evaluated period. In univariate analysis, not a single variable affected relapse-free time. PDL1 positivity, however, had 5.81 times higher risk in patients with recurrence (95% CI 1.06-31.80). High-grade tumors, as expected, increase the risk of recurrent 9.09 (95% CI 1.11-100.00) times, independent of the other variables (Table 4).

Table 4: Multivariate analysis of relapse-free survival risk variables

Variable	Univariate		Multivariate	
	p-Value	Unadjusted HR (IC95%)	p-Value	Adjusted HR (IC95%)
Sex	0.947	0.96 (0.31-3.01)	0.404	2.03 (0.39-10.62)
Age	0.473	1.44 (0.53-3.92)	0.207	2.59 (0.59-11.36)
Smoking history	0.700	0.78 (0.22-2.78)	0.160	3.74 (0.60-23.50)
Systemic hypertension	0.181	2.15 (0.70-6.57)	0.094	4.00 (0.79-20.30)
Diabetes	0.487	2.07 (0.27-16.09)	0.809	1.38 (0.10-18.37)
Final grade (high)	0.502	0.70 (0.25-1.96)	*0.040	9.09 (1.06-31.80)
Invasion	0.693	0.82 (0.31-2.16)	0.917	1.08 (0.24-4.85)
Necrose	0.259	0.42 (0.09-1.89)	0.971	1.04 (0.16-6.92)
PD-L1	0.773	1.11 (0.56-2.19)	*0.043	5.81 (1.06-31.80)
CD8 infiltrates	0.889	0.93 (0.35-2.49)	0.966	0.97 (0.28-3.34)
GSK-3	0.488	1.71 (0.37-7.83)	0.352	1.98 (0.47-8.38)

*p<0.05, Cox regression; HR = hazard risk for recurrence or death; CI95% = Confidence interval 95%.

4. DISCUSSION

The study investigated 140 cases of bladder cancer, a cohort predominant in males with a ratio of 3:1, and more than half of the patients were over 75 years old, similar to other studies from recent literature. [1] [12] The incidence of bladder cancer in the world has differences according to geographic patterns, with the highest prevalence in smokers. In the past few decades, in some countries, such as Spain, the Netherlands, Germany, and Russia, more women have been diagnosed with bladder cancer due to the rise in tobacco consumption. [13] Our cohort had a higher sample of high-grade and invasive lesions. This is a recognized bias from the service since one of the authors is a regional reference in genitourinary pathology and diagnosis of proportionally more cases of high-grade invasive lesions. Unfortunately, we did not have a smoking history in all patients, as one of the weaknesses of the study.

Immune checkpoint blockade with anti-PD1 or anti-PDL1 is a highly promising treatment for urothelial carcinomas. A recent phase III trial for muscle-invasive bladder carcinoma compared adjuvant nivolumab with placebo showed a more prolonged disease-free survival, especially in patients with more than 1% PD-L1 expression. [14] In our study, more than 60% of patients showed at least 1% positivity for PD-L1, with a strong association with CD8-positive immune infiltrates and a less strong association with GSK-3 β expression. Other studies have evaluated pembrolizumab and atezolizumab in combination or monotherapy, with a better overall response in patients with positive PD-L1 tumors. [15] Currently, these drugs are approved in some countries as monotherapy for PD-L1 positive patients (score above 5%) considered cisplatin-ineligible. [16] Independently of the use of immunotherapy, some studies have also correlated PD-L1

expression with a poor prognosis, while others showed no such correlation. [28] Our study showed that PD-L1 positivity was associated with poor recurrence-free survival in multivariate analyses. Wang et al. showed similar results for PD-L1, poorer survival, and a correspondent relation between PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes. [27]

PD-L1 expression on clinical prognosis is poorly defined in UC. Some studies have suggested that PD-L1 overexpression was correlated with poor prognosis in bladder cancer. [16] On the other hand, some studies reported that PD-L1 expression does not correlate with clinical outcomes in UC. [18] [19]

The expression of GSK-3 β has already been described in breast, lung, pancreas, colorectal cancer, and leukemia patients. [17] However, the specific role of this protein in bladder cancer is still unknown. [18] [5] Association of PD-L1 and GSK-3 β has been studied in other neoplasms, and our findings that patients with PD-L1 had a higher frequency of strong expression of GSK-3 β have been reported before. [19] Despite not finding a significant correlation of GSK-3 β with CD8 infiltrating lymphocytes, it has been postulated that inactivation by GSK-3 β blocks the expression of PD1 in CD8+ cytotoxic T lymphocytes, increasing cellular immunity through this negative regulation of PD-1. [20]

Our data showed a significant correlation between CD8 lymphocyte density and tumoral PD-L1 expression. In addition, patients with higher GSK-3 β showed positivity to PDL1, suggesting deregulation of cellular behavior, causing greater expression of PD-L1, and possibly causing evasion in immunity mechanisms. [21] Based on this assumption when this association was evaluated in patients treated with radiotherapy, T cells, which can also overexpress PDL-1, contribute to the prevention of tumor cell recognition. Thus, our data showed that tumors treated with radiotherapy had lower expression of CD8, unlike non-radiated cases. In an in vitro study by Lhuillier et al., it

was possible to evaluate the immunogenicity of neoepitopes that were upregulated by radiation, noting that radiotherapy increases the presence of genes encoding immunogenic neoepitopes from the MHC-I and MHC-II, resulting in a TCD8, CD4 cellular response. [22]

While we found no significant association in the analysis of overall survival, PD-L1 expression alone was linked with recurrence, as seen by Gu et al. in gastric cancer. [23] These are preliminary results on a retrospective cohort of a heterogeneous treatment scenario. Regulation of PD-L1 expression may affect the therapeutic effect of immune checkpoint inhibitors. One study suggested that GSK-3 β interacts with and phosphorylates PD-L1, thus allowing PD-L1 stabilization and suppressing T-cell activity. [24] In a melanoma study, for example, eEF2K, which promotes cancer cell proliferation by regulating aerobic glycolysis, was positively correlated with PD-L1 and phospho-GSK-3 β expression, suggesting a molecular mechanism underlying tumor PD-L1 regulation and uncovered an inhibitory role of eEF2K and GSK-3 β in antitumor immunity. [25]

In this study, we used a powerful digital pathology tool to measure PD-L1 and GSK-3 β expression along with CD8-positive cell infiltrates, with confirmation by a standard pathologist's evaluation. GSK-3 β could be a potential target in advanced bladder cancer, and inhibitors may serve as adjuvant therapy, especially in immunotherapy, for patients who are not candidates for conventional treatment or surgery.

5. References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71[3]:209-49.
2. Silva INdCJAGd. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. INCA Rio de Janeiro; 2019.
3. Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR. GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2011;4.
4. Mishra R, Nagini S, Rana A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. *Molecular Cancer.* 2015;14(1):20.
5. Naito S, Bilim V, Yuuki K, Ugoikov A, Motoyama T, Nagaoka A, et al. Glycogen synthase kinase-3beta: a prognostic marker and a potential therapeutic target in human bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16[21]:5124-32.
6. Gaisina IN, Gallier F, Ougolkov AV, Kim KH, Kurome T, Guo S, et al. From a Natural Product Lead to the Identification of Potent and Selective Benzofuran-3-yl-(indol-3-yl)maleimides as Glycogen Synthase Kinase 3 β Inhibitors That Suppress Proliferation and Survival of Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2009;52[7]:1853-63.
7. Allen SD, Liu X, Jiang J, Liao Y-P, Chang CH, Nel AE, et al. Immune checkpoint inhibition in syngeneic mouse cancer models by a silicasome nanocarrier delivering a GSK3 inhibitor. *Biomaterials.* 2021;269:120635.
8. Jellusova J, Cato MH, Apgar JR, Ramezani-Rad P, Leung CR, Chen C, et al. Gsk3 is a metabolic checkpoint regulator in B cells. *Nature Immunology.* 2017;18[3]:303-12.
9. Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 1990;9[8]:2431-8.

10. Taylor A, Rothstein D, Rudd CE. Small-Molecule Inhibition of PD-1 Transcription Is an Effective Alternative to Antibody Blockade in Cancer Therapy. *Cancer Res.* 2018;78[3]:706-17.
11. Ohteki T, Parsons M, Zakarian A, Jones RG, Nguyen LT, Woodgett JR, et al. Negative regulation of T cell proliferation and interleukin 2 production by the serine threonine kinase GSK-3. *J Exp Med.* 2000;192(1):99-104.
12. Patel VG, Oh WK, Galsky MD. Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70[5]:404-23.
13. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, 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.* 2021;71[3]:209-49.
14. Bajorin DF, Witjes JA, Gschwend JE, Schenker M, Valderrama BP, Tomita Y, et al. Adjuvant Nivolumab versus Placebo in Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med.* 2021;384[22]:2102-14.
15. Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, Powles T, Petrylak DP, Bellmunt J, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet.* 2017;389(10064):67-76.
16. Valderrama BP, Gonzalez-Del-Alba A, Morales-Barrera R, Pelaez Fernandez I, Vazquez S, Caballero Diaz C, et al. SEOM-SOGUG clinical guideline for localized muscle invasive and advanced bladder cancer (2021). *Clin Transl Oncol.* 2022.
17. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther.* 2015;148:114-31.
18. Agostinelli C, Carloni S, Limarzi F, Righi S, Laginestra MA, Musuraca G, et al. The emerging role of GSK-3 β in the pathobiology of classical Hodgkin lymphoma. *Histopathology.* 2017;71(1):72-80.

19. Zou W, Ye D, Liu S, Hu J, Zhu T, He F, et al. GSK-3 β Inhibitors Attenuate the PM2.5-Induced Inflammatory Response in Bronchial Epithelial Cells. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2021;16:2845-56.
20. Chen X, Wang K, Jiang S, Sun H, Che X, Zhang M, et al. eEF2K promotes PD-L1 stabilization through inactivating GSK3 β in melanoma. *J Immunother Cancer*. 2022;10[3].
21. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;234[6]:8509-21.
22. Lhuillier C, Rudqvist N-P, Yamazaki T, Zhang T, Charpentier M, Galluzzi L, et al. Radiotherapy-exposed CD8⁺ and CD4⁺ neoantigens enhance tumor control. *Journal of Clinical Investigation*. 2021;131[5].
23. Gu L, Chen M, Guo D, Zhu H, Zhang W, Pan J, et al. PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*. 2017;12[8]:e0182692.
24. Li CW, Lim SO, Xia W, Lee HH, Chan LC, Kuo CW, et al. Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat Commun*. 2016;7:12632.
25. Chen X, Wang K, Jiang S, Sun H, Che X, Zhang M, et al. eEF2K promotes PD-L1 stabilization through inactivating GSK-3 β in melanoma. *J Immunother Cancer*. 2022;10[3].
26. Rodrigues, A.; Nogueira, C.; Marinho, L.C.; Velozo, G.; Sousa, J.; Silva, P. G.; Tavora, F. Computer-assisted tumor grading, validation of PD-L1 scoring, and quantification of CD8-positive immune cell density in urothelial carcinoma, a visual guide for pathologists using QuPath. *Surgical and Experimental Pathology*, v. 5, n. 1, dez. 2022.
27. Wang, B., Pan, W., Yang, M., Yang, W., He, W., Chen, X., Bi, J., Jiang, N., Huang, J., & Lin, T. Programmed death ligand-1 is associated with tumor infiltrating lymphocytes and poorer survival in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Science*, 110(2), 489–498. 2019.

28. Bellmunt, J., Mullane, S. A., Werner, L., Fay, A. P., Callea, M., Leow, J., Choueiri, T. K., Hodi, F. S., Freeman, G. J., Signoretti, S., & Bellmunt, J. Association of PD-L1 Expression on Tumor Infiltrating Mononuclear Cells and Overall Survival in Patients with Urothelial Carcinoma. 2015.
29. Apolo, A. B., Infante, J. R., Balmanoukian, A., Patel, M. R., Wang, D., Kelly, K., Mega, A. E., Britten, C. D., Ravaud, A., Mita, A. C., Safran, H., Stinchcombe, T. E., Srdanov, M., Gelb, A. B., Schlichting, M., Chin, K., & Gulley, J. L. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Avelumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody, In Patients With Refractory Metastatic Urothelial Carcinoma: Results From a Multicenter, Phase Ib Study. *J Clin Oncol*, 35, 2117–2124. 2017.
30. Hodgson, A., Liu, S. K., Vesprini, D., Xu, B., & Downes, M. R. Basal-subtype bladder tumours show a 'hot' immunophenotype. *Histopathology*, 73(5), 748–757. 2018.

Highlights (for review)

Highlights

- PD-L1 expression in urothelial carcinoma is associated with tumor recurrence, especially in high-grade tumors
- There is a strong association between PD-L1 expression and intratumoral CD8+ lymphocytes
- Computer-assisted cell count and immunohistochemical analyses of tumor biomarkers are feasible in urothelial carcinoma samples
- GSK-3 β associates with PD-L1 and could be a potential target in advanced bladder cancer, especially in the context of immunotherapy.

Conflict of Interest

*Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations***Conflict of Interest Statement**

Article Title:

Expression of tumoral GSK3- β , PD-L1, and CD8 cell density in urothelial carcinomas, association with tumor grade and recurrence

Authors: Aline Rodrigues, Paulo Goberlanio Silva, Cleto Nogueira, Samuel S Ferreira, Juliana Cordeiro, Benedito Carneiro, Fabio Tavora

All authors of this manuscript have directly participated in planning, execution, and/or analysis of this study (if not, specify).

The contents of this manuscript have not been copyrighted or published previously.

The contents of this manuscript are not now under consideration for publication elsewhere.


The contents of this manuscript will not be copyrighted, submitted, or published elsewhere while acceptance by *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* is under consideration

There are no directly related manuscripts or abstracts, published or unpublished, by any authors of this manuscript.

No financial support or incentive has been provided for this manuscript (if financial support was provided, please specify below).

I am sole author of this manuscript

I am one author signing on behalf of all co-authors of this manuscript, and attesting to the above.

Signature:  Date: 10/12/2022

Printed Name: FABIO TAVORA

Institution: FEDERAL UNIVERSITY OF CEARA