



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Cuantificación Automática de patrones de Gleason
en el Adenocarcinoma de Próstata

Automatic Quantification of Gleason Patterns in
Prostate Adenocarcinoma

Autor

Alejandro Garzón Arana

Directores

Dr. Ángel Borque Fernando y Dra. Isabel Marquina Ibáñez

Tutor

Dr. Ignacio Ochoa Garrido

Facultad de Medicina

2017-2018

Índice

Listado de figuras y tablas.....	3
Abreviaturas.....	4
1. Resumen.....	5
1. Abstract.....	6
2. Agradecimientos.....	7
3. Introducción.....	8
3.1 Anatomía e histología de la próstata.....	8
3.2 Histopatología. Sistema de Gleason.....	12
3.3 Contexto clínico.....	16
3.4 Patología digital.....	19
3.4.1 Análisis de imagen y sistema de Gleason.....	22
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivos.....	25
6. Material y Métodos.....	27
6.1 Adquisición de conocimientos.....	27
6.2 Revisión bibliográfica.....	27
6.3 Selección de pacientes.....	28
6.4 Obtención de imágenes.....	29
6.5 Comparativa imagen TIFF e imagen JPEG2000.....	30
6.6 Definición de características histológicas detectables.....	30
6.7 Análisis de imagen.....	30
6.8 Etiquetado de los Componentes Problema Finales (CPF).....	32
6.9 Clasificación de los CPF en los patrones Gleason.....	32
6.10 Análisis final de los resultados del software.....	32
6.11 Aspectos éticos.....	33
7. Resultados.....	34
7.1 Proceso de escaneo.....	34
7.2 Comparativa imagen TIFF e imagen JPEG2000.....	35
7.3 Secuencia de aplicación de técnicas de análisis.....	36
7.4 Segmentación núcleo y luz.....	37
7.5 Definición de características histológicas.....	39
8. Discusión.....	42
9. Conclusiones.....	45

10.	Futuro trabajo	46
10.1	Separación estroma y citoplasma	46
10.2	Deducción de componentes celulares	46
10.2.1	Tratamiento pre-análisis:	46
10.2.2	Análisis:	47
10.3	Clasificación de los patrones Gleason	48
11.	Referencias bibliográficas	50
12.	ANEXO I: Datos del informe e Imágenes	54
12.1	Datos informe	54
12.2	Imágenes del adenocarcinoma de próstata	55
13.	ANEXO II: Clasificación TNM	63
14.	ANEXO III: Horario de escaneo	64
15.	ANEXO IV: Aprobación del CEICA	65

Listado de figuras y tablas

Figura 1: Corte sagital de la región pélvica del varón.....	8
Figura 2: Anatomía zonal de la próstata.....	10
Figura 3: Descripción histológica de una unidad secretora glandular típica.....	11
Figura 4: Comparativa de los diferentes grados Gleason.....	11
Figura 5: Comparativa de Gleason original y última actualización del ISUP.....	13
Figura 6: Matriz de confusión entre la imagen en TIFF (Raw) y JPEG2000.....	35
Figura 7: Esquema deducción.....	36
Figura 8: Output (imagen de salida) de la aplicación del algoritmo K-means.....	38
Figura 9: Output (imagen de salida) de la aplicación del algoritmo K-means.....	38
Figura 10: Imagen final del proceso segmentación de núcleo y luz.....	39
Figura 11: Representación gráfica de la retracción periacinar.....	47
Figura 12: Representación gráfica de los artefactos del estroma y de los capilares.....	47
Figura 13: Datos del informe de prostatectomía radical de Anatomía Patológica.....	54
Figura 14: Fibroplasia mucinosa (2).....	55
Figura 15: Glándulas glomeruloides.....	55
Figura 16: Invasión perineural.....	56
Figura 17: Patrón de glándulas discretamente bien formadas (Gleason 3).....	56
Figura 18: Patrón criboso (Gleason 4).....	57
Figura 19: Patrón de glándulas fusionadas (Gleason 4).....	57
Figura 20: Patrón de glándulas pobremente formada (Gleason 4).....	58
Figura 21: Patrón de células en cordón (Gleason 5).....	58
Figura 22: Patrón de células en sabana (Gleason 5).....	59
Figura 23: Nidos sólidos (Gleason 5).....	59
Figura 24: Patrón en células sueltas (Gleason 5).....	60
Figura 25: Patrón necrosis central (Gleason 5).....	60
Figura 26: Características de atipia nuclear.....	61
Figura 27: Cuerpos amiláceos.....	61
Figura 28: Glándulas de la vesícula seminal.....	62
Figura 29: Clasificación TNM clínica y patológica.....	63
Figura 30: Dictamen favorable del CEICA.....	65
Tabla 1: Grados pronósticos.....	14
Tabla 2: Estadificación del riesgo en el adenocarcinoma de próstata.....	16
Tabla 3: Potenciales beneficios de la patología digital.....	20
Tabla 4: Potenciales limitaciones de la patología digital.....	21
Tabla 5: Matriz de confusión para la validación de los resultados finales.....	33
Tabla 6: Comparativa entre escaneado 20X y 40X.....	34
Tabla 7: Opciones K-means.....	37
Tabla 8: Características propias y con el exterior de componentes “Hacia el blanco”.....	40
Tabla 9: Características propias y con el exterior de componentes “resto”.....	40
Tabla 10: Características propias y con el exterior de componentes “Hacia el negro”.....	41
Tabla 11: Horario de escaneo.....	64

Abreviaturas

CPF: Componentes Problema Finales

HUMS: Hospital Universitario Miguel Servet

H&E: Hematoxilina Eosina

SEAP: Sociedad Española de Anatomía Patológica

CEICA: Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón

ISUP: International Society of Urological Pathology

PSA: Antígeno prostático específico

GS: Gleason Score (grado Gleason)

EAU: Asociación Europea de Urología

WSI: Whole Slide Imaging

FDA: Food and Drugs Administration

L: Luminosidad

SVM: Support Vector Machine

RF: Random Forest

CE-IVD: Diagnóstico In Vitro en la Union Europea

K: Número de Cústers

Gb: Gigabyte

Tb: Terabyte

FN: Falso negativo

FP: Falso Positivo

HOG: Histograms of Oriented Gradient

MP: Muestra Problema

AUC: Area Under Curve

1. Resumen.

El cáncer de próstata es el tumor más frecuente en varones en España y en los países occidentales. El manejo clínico de los pacientes con este tipo tumoral depende mucho de su estadio. El sistema de Gleason es la valoración histopatológica más importante para el manejo del paciente con adenocarcinoma de próstata. Se basa en un análisis de las estructuras glandulares, la identificación de patrones y su clasificación en el grado correspondiente.

En este trabajo se plantea la identificación y cuantificación de estas estructuras y patrones mediante técnicas de análisis de imagen y algoritmos de aprendizaje automático supervisado. Con la consecución de este proyecto, se espera mejorar la variabilidad descrita interobservador y obtener datos importantes para la estratificación del riesgo oncológico.

También se propone una nueva sistemática de etiquetado, no descrita en la bibliografía revisada, basada en la identificación de los Componentes Problema Finales (CPF) que se establecen a partir de un procesado previo de la imagen. Este tipo de sistemática reduce en gran medida el tiempo necesario para realizar esta tarea y mejora las características necesarias para un mejor análisis posterior.

Palabras clave: Patología digital, sistema Gleason, adenocarcinoma de próstata, algoritmos de aprendizaje automático, análisis de imagen.

1. Abstract

The prostate cancer is the most common tumor in male sex as much in Spain as the rest of the occidental countries. The clinical management of the patients with this type of tumor will depend at what stage they are. The Gleason score is the most important histopathological assessment to deal patients with prostate adenocarcinoma. It is an analysis of the glandular structures, the identification of patterns and their classification in the corresponding degree.

In this work, we use image analysis and supervised machine learning approach to identify and quantify each pattern. In this way, we will be able to improve the interobserver variability and obtaining significant data for the oncological risk stratification.

Moreover, we propose a new labelling system not described in the reviewed bibliography. Characterized by the identification of the Final Problem Components (FPC) that are established from a previous image processing. This fact limits the time necessary to perform this task and improving the characteristics of this for a better subsequent analysis.

Key words: Digital pathology, whole slide imaging, Gleason score, Prostatic neoplasm, Machine learning, Image analysis.

2. Agradecimientos.

En este trabajo, se pretenden determinar las bases para la detección y cuantificación de los patrones Gleason en patología digital, lo que atendiendo a las nuevas actualizaciones de este sistema de gradación, podría permitir grandes mejoras en el diagnóstico y manejo de estos pacientes¹.

El elevado grado de multidisciplinariedad del proyecto, ha hecho necesaria la colaboración de expertos en diferentes áreas:

- *Dr. Ignacio Ochoa Garrido*: Profesor ayudante del Dpto. de Anatomía Humana de la universidad de Zaragoza y tutor de este trabajo final de grado.

- *Dr. Ángel Borque Fernando*: Jefe de sección de la Unidad de Próstata del servicio de Urología en el Hospital Universitario “Miguel Servet” (HUMS), Profesor Asociado en Ciencias de la Salud del Dpto. de Cirugía, Ginecología y Obstetricia (área Urología), y codirector de este trabajo final de grado

- *Dra. Isabel Marquina Ibáñez*: Médico adjunto de la sección de Uropatología del servicio de Anatomía Patológica del HUMS y codirectora de este trabajo final de grado

- *Dr. Jorge Alfaro Torres*: Jefe de la sección de Uropatología del servicio de Anatomía Patológica del HUMS

- *Dr. Manuel Doblaré Castellano* Jefe del grupo de ingenieros en imagen médica del “*Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A)*” integrado por *Andrés Mena Tobar, Denis Navarro Tabernero, Jacobo Ayensa Jiménez y David Chaparro Victoria*:

A continuación, trataré algunos conceptos de interés para el adecuado entendimiento y contextualización de este proyecto.

3. Introducción

3.1 Anatomía e histología de la próstata.

La próstata es la glándula sexual accesoria más grande del sistema genital masculino². Clásicamente se la compara con una nuez, tanto en tamaño, como en forma. Su peso aproximado en el adulto joven es de 20g, incrementándose con la edad.

Tal y como se ve en la *figura 1*, la próstata se sitúa en el compartimento pélvico, limitando en su zona superior con la vejiga³. En la parte inferior se encuentra el diafragma urogenital, una lámina músculo-fibrosa que ocupa el espacio dejado por los músculos elevadores del ano en la parte medial. El recto es el límite posterior. Esto posibilita la valoración de esta glándula mediante el tacto rectal, siendo además la vía de acceso más frecuente para la toma de biopsias. En la parte anterior, la referencia anatómica es la sínfisis pubiana, por este espacio transcurre el plexo venoso prostático que drena en las venas ilíacas internas. La irrigación arterial es llevada a cabo por las arterias vesical inferior, pudenda interna y rectal media. Todas ellas son ramas de la arteria ilíaca interna.

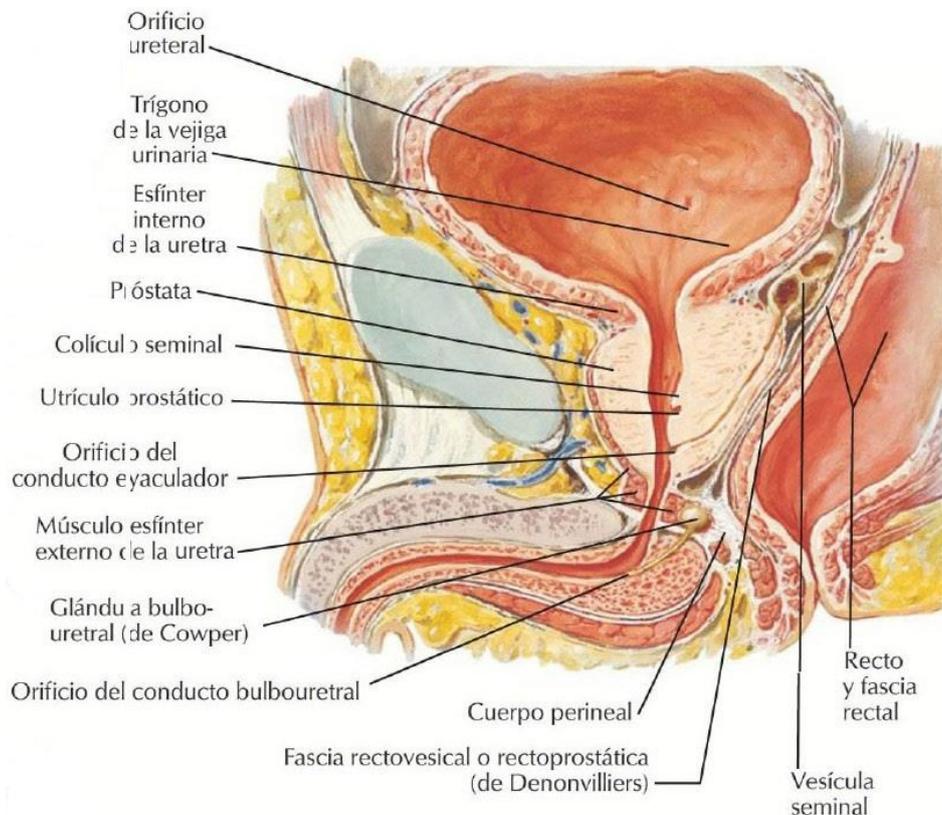


Figura 1: Corte sagital de la región pélvica del varón. Se exponen las relaciones de la próstata, objetivándose las regiones de la misma, que son accesibles mediante el tacto rectal. Imagen obtenida en (3).

Esta glándula está rodeada por una cápsula fibrosa. Circunscrita a ésta, se encuentra el tejido graso periprostático. Entre estos dos componentes discurre el plexo nervioso prostático, procedente del plexo hipogástrico inferior y que formará los nervios cavernosos. Pese a existir abordajes quirúrgicos de preservación de nervios, estos no siempre se pueden realizar, ni son eficaces en todos los casos⁴. La complicación principal asociada al daño de este plexo es la impotencia. En esta misma zona se encuentra la red linfática periprostática que drena mayoritariamente a los ganglios de la cadena iliaca externa y también a los ganglios sacros e hipogástricos.

La base, que es la parte más proximal, se relaciona íntimamente con el cuello vesical. A este nivel, las fibras de músculo liso del detrusor forman el esfínter interno. En la parte más posterior de la base es donde penetran los conductos eyaculadores y reposan las vesículas seminales.

La cara posterior comienza en una escotadura a nivel craneal, su superficie es plana, percibiéndose un surco que separa a los dos lóbulos de la próstata.

El vértice está atravesado por la uretra en su salida hacia el diafragma urogenital, dónde fibras de músculo esquelético pertenecientes a este diafragma forman el esfínter externo. El daño en estas fibras como consecuencia del tratamiento quirúrgico erradicador más utilizado, la prostatectomía radical, es el responsable de la incontinencia urinaria tras el procedimiento.

La próstata es una glándula exocrina compuesta por 40-50 glándulas tubuloalveolares que drenan en aproximadamente 15-30 conductos excretores⁵. Se disponen en un estroma formado por un tejido conectivo denso compuesto por fibroblastos, fibras de colágena, fibras elásticas y fibras de músculo liso. El parénquima prostático se puede dividir en cuatro zonas según se puede apreciar en la *figura 2*, presentando cada una de ellas, características propias que se detallan a continuación:

- Zona periférica (70%): Es el lugar donde asientan la mayoría de tumores. Presenta glándulas principales grandes.
- Zona central (25%): Rodea a los conductos eyaculadores. Comparada con el resto de zonas, presenta formaciones glandulares pequeñas, caracterizadas por un citoplasma más claro con matices basófilos y núcleos de mayor tamaño.

- Zona interna (5%): Esta zona incluye la zona transicional y la zona periuretral. Ambas zonas rodean a la uretra prostática. En esta zona apenas hay glándulas tubuloalverorales sino que son pequeñas glándulas mucosas y submucosas de tipo tubular que desembocan directamente en la uretra de forma independiente.

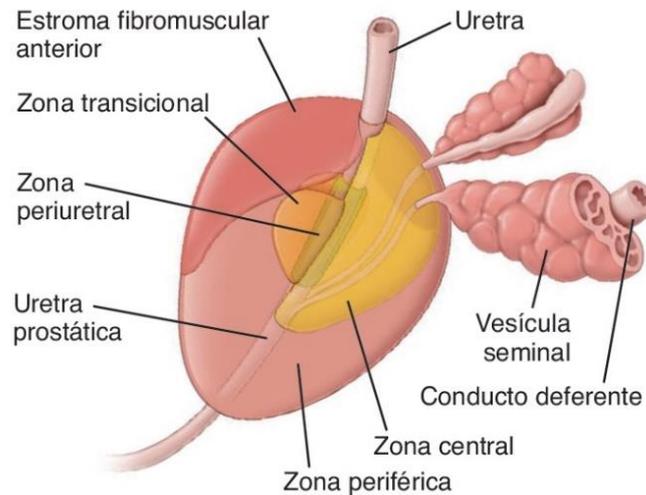


Figura 2: **Anatomía zonal de la próstata.** Imagen obtenida en (5).

La unidad secretora está compuesta por un epitelio secretor típicamente formado por una capa de células cilíndricas aunque también es normal encontrar zonas de apariencia de epitelio pseudoestratificado, zonas de células cúbicas o de células planas⁶. Los tipos celulares presentes en el parénquima de esta glándula se muestran a continuación y están representados en la *figura 3*:

- Células epiteliales: Son células de morfología variable (cilíndrica, cúbica o plana en las atroficas) y con función secretora.
- Células basales: Son las células con capacidad proliferativa (células madre), no siempre visible en todos los cortes.
- Células endocrinas: en bajo número, responsables de la secreción de hormonal propia de esta glándula.



Figura 3: **Descripción histológica de una unidad secretora glandular típica.** Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 20x en la que se pueden identificar: 1) Célula de la capa basal o células basales; 2) Célula epitelial; 3) Luz glandular; 4) Retracción periacinar (artefacto); 5) Estroma. Imagen obtenida del servicio de Anatomía Patológica (HUMS).

En el adenocarcinoma de próstata esta arquitectura normal se altera identificándose patrones que se incluyen en los grados de Gleason 3, 4 y 5, en dependencia del pronóstico. En la *figura 4* aparece una imagen perteneciente a cada grado.

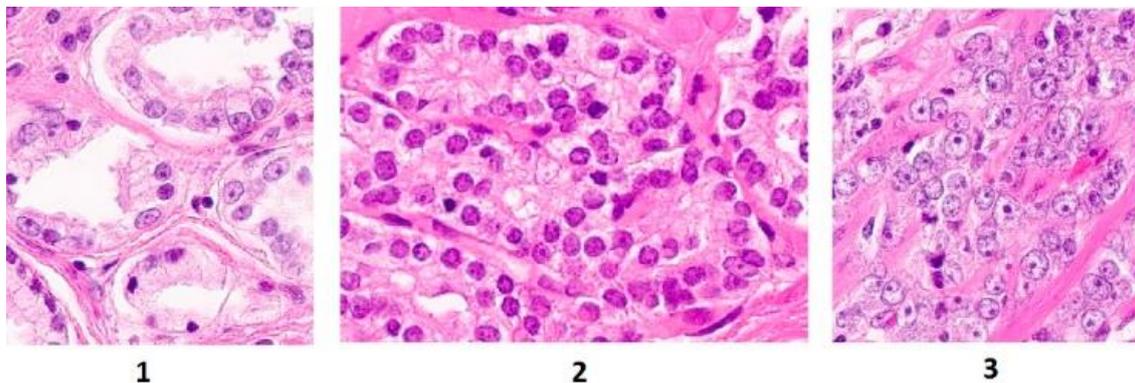


Figura 4: **Comparativa de los diferentes grados Gleason.** Fotografía de microscopía óptica, Tinción Hematoxilina Eosina (H&E). 1) Grado Gleason 3; 2) Grado Gleason 4; 3) Grado Gleason 5. Imágenes obtenidas del servicio de Anatomía Patológica (HUMS).

3.2 Histopatología. Sistema de Gleason

Para el estudio del adenocarcinoma de próstata, la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP)¹² recomienda la inclusión total de la pieza de prostatectomía radical, previamente teñida con tinta china. Si esta inclusión, debido al gran tamaño de la pieza quirúrgica, interfiere con el correcto funcionamiento del servicio se debería de realizar una inclusión parcial. Deberían incluirse siempre las localizaciones sospechosas, típicamente zonas induradas de color amarillo-pardo y la porción del ápex. En el “*Anexo I*” se incluyen los datos que deben estar presentes en el informe de prostatectomía radical.

Para el diagnóstico microscópico se valoran conjuntamente datos arquitectónicos, nucleares, citoplasmáticos e intraluminales^{13,14,15}. Por definición, las formaciones tumorales carecen de capa basal. Lamentablemente, los núcleos de esta capa aparecen de forma discontinua y no siempre se observan en todos los cortes. En caso de necesidad, se podría poner de manifiesto la capa basal utilizando técnicas inmunohistoquímicas.

A continuación, se describen las características microscópicas de esta neoplasia. Se recomienda la revisión conjunta del “*Anexo I*” dónde se recogen imágenes referentes a este tema, la mayoría de ellas obtenidas en el servicio de Anatomía Patológica del HUMS.

Las características patognomónicas, son:

- Fibroplasia mucinosa (micronódulos colagenosos).
- Glomerulaciones.
- Invasión circunferencial perineural.
- Crecimiento dentro del tejido adiposo.

Existen otros datos histopatológicos característicos de las glándulas tumorales pero que no son totalmente específicos de esta, son los siguientes:

- Características nucleares:
 - o Agrandamiento nuclear.
 - o Hiperchromasia.
 - o Nucléolos prominentes.
 - o Aclaramiento de la paracromatina.
- Características citoplasmáticas:
 - o Células típicamente cúbicas con citoplasma claro o pálido.

- Características intraluminales:
 - o Mucina azul.
 - o Cristaloides.
- Características arquitectónicas: Los tumores bien diferenciados suelen estar compuestos por pequeñas glándulas de una única capa de células. Si esta desdiferenciación es mayor se pierde la forma típica de glándula y podrán aparecer fusiones de glándulas, nidos de células o células sueltas. La arquitectura se valora mediante el sistema de Gleason.

Desde su publicación en el año 1962 ha sufrido muchas modificaciones a partir de la evidencia de la que se disponía en la época. Se puede comprobar en la *figura 5*:

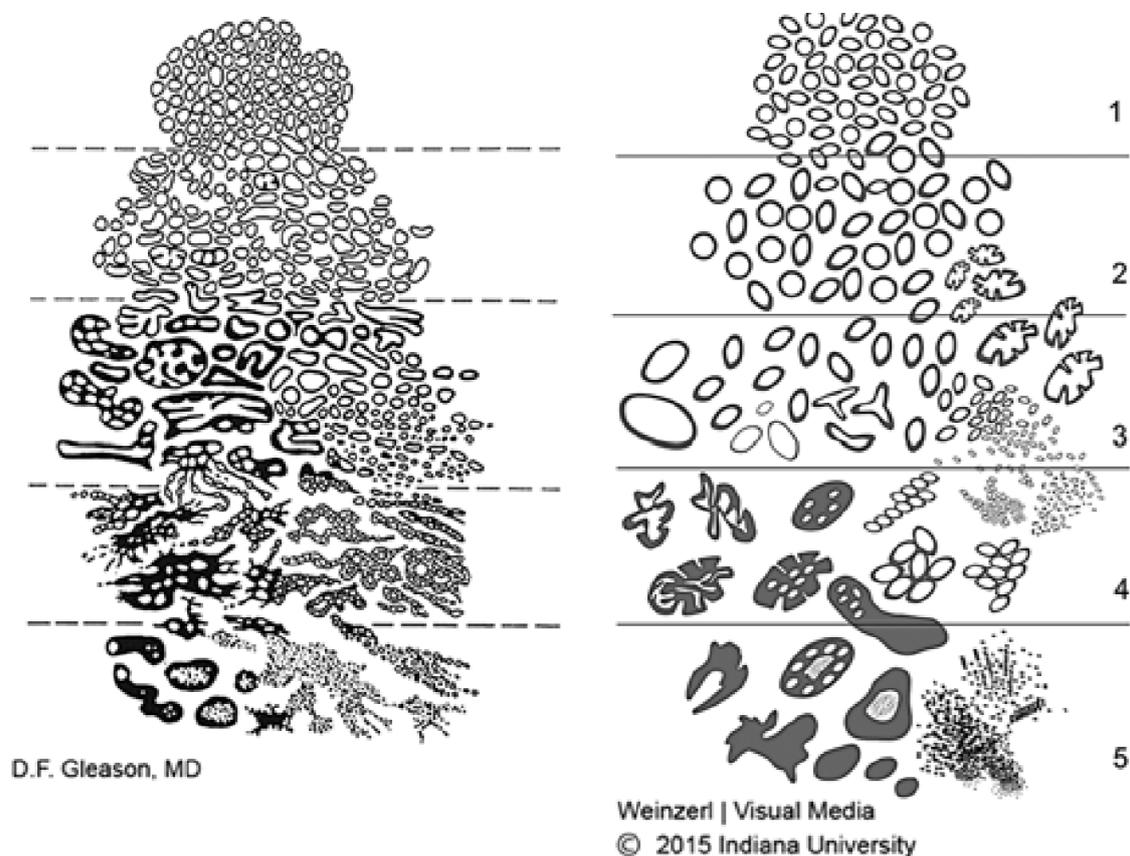


Figura 5: **Comparativa Gleason original y última actualización del ISUP.** ISUP: International Society of Urological Pathology. Imagen obtenida en (1).

Los grados de Gleason se deben de valorar a bajo aumento. Se componen por la suma del grado de Gleason predominante y el segundo más frecuente (en términos de volumen tumoral). Si solo existe un grado, este se duplicará. Según este análisis se

realice en muestras de biopsias o en la pieza de prostatectomía, se deben de tener en cuenta algunas consideraciones¹⁶:

- Biopsias de próstata (cilindros):
 - o Patrón predominante (1°) + Peor patrón (2°) (aunque no sea el más frecuente).
 - o No se notifica el patrón terciario
- Prostatectomía:
 - o Patrón predominante (1°) + segundo patrón predominante (2°)
 - o Si hay tres grados, y el 3° es el más alto y superior al 5% se toma este como patrón 2° y si es menos del 5% se consigna como patrón 3°.

Además, se estableció una diferenciación dentro de uno de los grupos más frecuentes, el Gleason 7¹. Los pacientes con un 4+3 tenían mayor recidiva bioquímica que los que tenían un 3+4. Teniendo en cuenta estos hallazgos, se estableció el sistema de grados pronósticos, la correlación entre grado Gleason y pronóstico aparece reflejada en la *tabla 1*. Se trata de un sistema de clasificación propuesto por el Dr. Jonathan Epstein con algunas peculiaridades en comparación al sistema de Gleason clásico:

- Hay una mejor estratificación de los grupos en el nuevo sistema.
- Es un cambio de nomenclatura.
- Es considerado como la “evolución” del sistema de Gleason.
- Son 5 grupos pronósticos en total.
- Se utilizan los criterios para definir los grados de Gleason.
- Es más intuitiva empezando por el 1 y no por el 6.
- Deben de ponerse las dos nomenclaturas en el informe.

Grado Gleason	Grado pronóstico (ISUP)
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4 o 3+5 o 5+3)	4
9-10	5

Tabla 1: **Grados pronósticos.** La información de la tabla ha sido obtenida en (8).

A continuación se describen los diferentes patrones pertenecientes a cada grado de Gleason.

Gleason 3:

- Glándulas discretamente bien formadas: Glándulas individualizadas de tamaños y forma variables. Infiltración entre glándulas no neoplásicas.

Gleason 4:

- Cribiforme: Acúmulos tumorales con diversas luces sin tractos conectivos internos.
- Glándulas fusionadas: Glándulas no separadas entre sí. Sin estroma entre ellas.
- Glándulas pobremente formadas: Grupos de glándulas con luz ausente o deforme
- Glomeruloide: Glándulas dilatadas con crecimiento criboso adherido focalmente a la pared imitando un glomérulo

Gleason 5:

- En sabana: los núcleos de las células tumorales se disponen aleatoriamente
- En cordones: los núcleos están ordenados en línea
- Nidos sólidos: Agrupaciones tumorales de bordes variables
- Necrosis central: nido tumoral con necrosis por el alto nivel metabólico de estas células y la imposibilidad de recibir aporte
- Células sueltas: las células tumorales están dispuestas entre el estroma

Dada la gran complejidad de este análisis se han realizado algunos estudios que tenían el objetivo de valorar la reproducibilidad interobservador de la última actualización de este análisis^{17,18}. En el estudio donde se evaluaron mayor número de cristales (n=407), obtuvieron una correlación para tumor/no tumor del 74%, la correlación de patrones primario y secundario fue del 63% y del porcentaje de afectación fue de 50% entre los distintos profesionales encuestados. Otros grupos de investigación concluyeron que estas diferencias entre los patólogos podían acabar incluso afectando al tratamiento y al manejo posterior de los pacientes¹⁹.

3.3 Contexto clínico

Tal y como hemos comentado, el adenocarcinoma de próstata es el tumor más prevalente, apareciendo normalmente a partir de la 5ª década de la vida. Pero, según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)⁷, únicamente el 15% de estos se diagnostica en estadios localmente avanzados o diseminados. Los tumores avanzados son los denominados, según la clasificación TNM, los tumores T3 o aquellos en los que se evidencia invasión ganglionar o metástasis. Puede verse la clasificación completa en el “Anexo II”.

Este bajo porcentaje de estadios avanzados se debe, en gran parte, a que el diagnóstico precoz y la detección del antígeno prostático específico (PSA) han producido un incremento llamativo en la identificación de tumores de bajo o muy bajo riesgo oncológico (tabla 2). Este llamativo aumento del diagnóstico en fases incipientes ha generado un intenso debate acerca ya no del sobrediagnóstico, sino del sobretatamiento del cáncer de próstata y todo ello ha conducido a la implementación de una nueva estrategia terapéutica en estos tumores de bajo perfil oncológico; la vigilancia activa. Un aspecto que ha permanecido estable en este debate es el grado Gleason, como la caracterización histológica de primer nivel a la hora de establecer el pronóstico de la enfermedad⁸.

Bajo riesgo	Riesgo Intermedio	Alto riesgo	
PSA<10ng/mL Y GS<7 (grado 1 ISUP) y cT1-2a	PSA 10-20 ng/mL o GS 7 (grado 2/3 ISUP) o cT2b	PSA>20ng/mL o GS>7 (grado 4/5) o cT2c	Cualquier PSA Cualquier GS (cualquier grado ISUP)
Localizado			Localmente avanzado

Tabla 2: **Estadificación del riesgo en el adenocarcinoma de próstata.** GS=Grado de Gleason (Gleason score); ISUP=International Society for Urological Pathology; PSA=Antígeno prostático específico. La información de la tabla ha sido obtenida en (8).

Teniendo como referencia al paciente tipo con enfermedad localizada existen, principalmente, tres situaciones en las que se realiza este análisis histopatológico:

- Biopsia diagnóstica: Para la confirmación de la enfermedad y establecer el riesgo oncológico del paciente.

En base a los datos de la biopsia y criterios clínico-analíticos se ofrece al paciente la oportunidad de un tratamiento de intención curativa como la prostatectomía

radical o la radioterapia, o incluso la oportunidad de monitorización en un esquema de vigilancia activa ante tumores de bajo/muy bajo riesgo y que pretende posponer el tratamiento activo hasta el momento en el que éste sea realmente necesario, para con ello posponer los efectos colaterales del mismo, incontinencia e impotencia fundamentalmente. En casos fuera de opción curativa, igualmente la biopsia de próstata y su caracterización son importantes para la elección de tratamientos multimodales combinados de cirugía-radioterapia-hormonoterapia, del tratamiento sistémico, o incluso ante la oportunidad de monitorizar la evolución del tumor avanzado en pacientes con corta esperanza de vida en los que tratar tan sólo las complicaciones del tumor si es que éstas surgen, es lo que se conoce con *Watchful Waiting*.

- Biopsia de seguimiento: Dentro del programa de vigilancia activa, la toma de biopsia es una herramienta más para valorar la progresión de la enfermedad y en su caso el paso a tratamiento activo
- Pieza de prostatectomía: Es de utilidad para establecer el pronóstico de la enfermedad y nuevas actitudes terapéuticas adyuvantes a la cirugía.

La identificación de neoplasia en la biopsia es la condición imprescindible para diagnosticar esta patología. Para la indicación de ésta se deberán de valorar conjuntamente factores como la edad, la historia familiar, el estado general del paciente, el PSA y el tacto rectal, entre otros.

Esta técnica invasiva debe realizarse bajo control ecográfico siendo la biopsia extensiva (obtención de 10-12 cilindros en total) la más recomendada actualmente. Estos cilindros deben de representar, lo más fielmente posible, la totalidad de la próstata accesible e incluir siempre las zonas sospechosas.

El programa de vigilancia activa, intenta limitar las comorbilidades propias de tratamientos más agresivos en neoplasias de bajo riesgo^{8,9}. Es idóneo para tumores localizados y bien diferenciados que tienen muy baja capacidad de progresión o de diseminación. Los criterios de inclusión según la Asociación Europea de Urología (EAU), son:

- Suma de Gleason 6.
- PSA inferior a 10ng/ml.

- Estadio inferior o igual a cT2a.
- Afectación máxima de 2 cilindros con extensión inferior al 50%.
- Densidad de PSA menor de 0.15ng/mL/cc (criterio con menor evidencia).
- Entendimiento y aceptación del paciente.

Algunas otras organizaciones como la canadiense, afirman que un Gleason 3+4, siendo el porcentaje de 4 inferior al 10%, también podría verse beneficiado de este programa.

A los pacientes incluidos en este programa se les realiza un seguimiento para determinar la posible progresión de la enfermedad. Esta monitorización, puede incluir la evolución de los niveles de PSA y biopsias de seguimiento donde será de franca utilidad el aumento del grado de Gleason y la extensión afectada. Otras pruebas que también se pueden utilizar son diferentes biomarcadores en estudio como el PCA3, PHI, 4Kscore Test, paneles genéticos y la resonancia magnética.

Los datos obtenidos a partir de la pieza de prostatectomía radical constituyen algunos de los factores predictivos más importantes para predecir la recidiva bioquímica. Es esencial para valorar la terapia adyuvante y planificar el seguimiento del paciente.

Desde la nueva actualización del sistema Gleason y el consenso en el establecimiento de los nuevos grados pronósticos que diferencian el 3+4 del 4+3 son varios los trabajos que aseguran que una cuantificación de los grados de Gleason predice mejor la recidiva bioquímica^{10,11}.

En el trabajo de *Deng et al* se incluyeron 2630 casos de Gleason 7 y evaluaron únicamente cuantitativamente el grado 4 relacionándolo con el peso y la extensión tumoral de la próstata, realizando ponderaciones en favor de este¹⁰. Los resultados de este planteamiento demostraron una mejor correlación con la recidiva bioquímica que utilizando el sistema de Gleason clásico. En este trabajo se hipotetizaba que los elementos con un alto grado en el tumor son los que impulsan la progresión y que una mejor caracterización de ellos define mejor la enfermedad. Como mayor limitación exponían la variabilidad interobservador a la hora de caracterizar el grado Gleason y las mediciones que ellos planteaban.

El grupo de investigación de *Iczkowski et al.* identificó manualmente varios patrones en preparaciones digitalizadas de 153 pacientes sometidos a prostatectomía radical¹¹. Entre

los que se incluía el patrón criboso (Gleason 4) y patrones de alto grado (Gleason 5), entre otros. Se extrajeron los porcentajes y otras mediciones de estas áreas, concluyéndose que la presencia de patrón criboso estaba asociado a un riesgo de recidiva bioquímica semejante al de células sueltas (Gleason 5).

Todos estos datos preliminares indican la importancia de una cuantificación precisa y de una clasificación homogénea. Es por ello que la patología digital se plantea como una herramienta muy prometedora a la hora de mejorar el diagnóstico de esta enfermedad y el manejo clínico de los pacientes.

3.4 Patología digital

La patología digital es un término amplio que incluye los aspectos relacionados con la utilización de las tecnologías de la información y las comunicaciones en anatomía patológica. En la práctica, principalmente, hace referencia al uso de imágenes de escaneado completo de preparaciones o Whole Slide Imaging (WSI) ²⁰.

Estas imágenes son una representación digital de los cristales de anatomía patológica que incluyen múltiples resoluciones desde una visión panorámica, hasta un aumento de 40X (0.25µM/pixel) o 20X (0.5µM/pixel), siendo este último el más utilizado.

La utilización de esta tecnología ha ido en aumento en estos últimos años. Habitualmente, su uso era con fines docentes o para la valoración de segundas opiniones, ya fuesen casos de complejo diagnóstico o errores en técnicas.

Actualmente, ya hay varios laboratorios donde se utiliza el diagnóstico digital en el trabajo asistencial, siendo necesaria la visualización conjunta en cristal mientras se realiza la curva de aprendizaje ¹⁵.

A mediados de 2017 se produjo un gran avance en la legislación referente a esta tecnología²¹. La *FDA (food and drugs administration)* permitió por primera vez comercializar un dispositivo de escaneo para el diagnóstico primario, y además, cambió la clase en la que estos aparatos eran calificados; pasando de ser una clase III a ser incluidos en la clase II de la FDA.

Este organismo otorga la clase III, en términos generales, a los dispositivos que puedan representar un riesgo para la salud, no disponiendo de suficiente nivel de evidencia que asegure la seguridad del paciente. Los dispositivos de esta clase tienen que someterse a una vigilancia y a unos controles muy estrictos.

Sin embargo, con la extensión del uso de esta tecnología se han publicado cada vez más artículos en los que se comparaba esta técnica con la microscopía óptica convencional, arrojando estos trabajos unos buenos niveles de correlación ^{22,23}. Por estos motivos, los dispositivos WSI han pasado a ser calificados como clase II (clase de riesgo moderado).

Actualmente, existen varios estudios en los que se exponen las limitaciones y beneficios de esta tecnología ^{24,25}. Se destacan los datos más importantes en las *tablas 3 y 4*.

Potenciales Beneficios	
Seguridad del paciente	<ul style="list-style-type: none"> ○ Reducción del riesgo de etiquetado erróneo del paciente al estar incluido en el sistema de trazabilidad. ○ Reducción del riesgo de la pérdida o rotura de cristales.
Flujo de trabajo	<ul style="list-style-type: none"> ○ Asignación rápida de trabajo, seguimiento de casos, archivo y recuperación. ○ Eficiencia en el diagnóstico. ○ Mejora en los tiempos de transferencia de los casos. ○ Diagnóstico rápido de casos urgentes y de segundas opiniones
Forma de trabajar	<ul style="list-style-type: none"> ○ Trabajo flexible y posibilidad de desempeño remoto. ○ Ventajas en ergometría. ○ Enseñanza.
Calidad del servicio	<ul style="list-style-type: none"> ○ Intercambio de información y colaboración. ○ Acceso a las preparaciones archivadas. ○ Disminución de la variabilidad interobservador. ○ Mejora de la validez de las auditorías diagnósticas. ○ Investigación.

Tabla 3: **Potenciales beneficios de la patología digital.** Información obtenida de (24, 25).

Potenciales Limitaciones	
Técnica de escaneo	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tiempo de adquisición de imágenes. ○ Problemas desenfoco.
Imagen digitalizada:	<ul style="list-style-type: none"> ○ Gran tamaño de los archivos. ○ En la mayoría de casos, no es posible moverse entre varios planos de enfoque. Es decir, no existe el “micrómetro” del microscopio óptico convencional. Este problema se resuelve con la función Z-stack de algunos scanners, pero es costosa en tiempo y tamaño de archivo.
Otras	<ul style="list-style-type: none"> ○ Inversión económica inicial importante, ordenadores, monitores, establecer red de servidores y software. ○ Curva de aprendizaje. ○ Baja aceptabilidad de la patología digital por parte de los patólogos

Tabla 4: **Potenciales limitaciones de la patología digital.** Información obtenida de (24,25).

Tal y como hemos mencionado anteriormente, existen varios estudios en los que se compara el diagnóstico entre WSI y la microscopía óptica convencional. Los datos que se mencionan a continuación han sido extraídos de una revisión sistemática²³.

- Se incluyeron 8069 comparaciones en la que hubo 335 discordancias (4%). De las mismas, 28 (0.34%) hubieran repercutido en un daño moderado o grave al paciente.
- La mayor discordancia se observó en la valoración de la displasia. Como justificación hallaron que la mayoría de los errores se debían a la utilización de muestras con una magnificación de 20X (0.5µM/pixel). Estos problemas en la identificación se reducían en gran medida gracias a la utilización del objetivo de 40X (0.25µM/pixel).

Finalmente, uno de los puntos fuertes de esta nueva tecnología en anatomía patológica es que permite mejorar la exactitud y la variabilidad interobservador de muchas de las mediciones como, por ejemplo, el porcentaje y área tumoral, el grado de invasión, el porcentaje de células positivas de una tinción de inmunohistoquímica, distancia al límite quirúrgico etc... Ahorrando tiempo y esfuerzos al patólogo.

3.4.1 Análisis de imagen y sistema de Gleason

Las imágenes digitales están compuestas por una matriz de números que representan cada pixel que la compone. Cuando se utiliza el espacio de color RGB (del inglés red green blue), el más comúnmente utilizado, la representación sería mediante la superposición de 3 matrices, cada una perteneciente a un color de los mencionados. A cada uno de estos, se le asigna un valor de intensidad que varía desde el 0 (negro) al 255 (blanco). Por ejemplo, el color de un pixel perteneciente al núcleo de un linfocito que con la tinción de Hematoxilina-Eosina tiene un color predominantemente azul oscuro, tendría estos valores R: 50, G: 40, B: 155.

Sin embargo, existen otras formas de definir el espacio de color a parte del RGB. Otra ampliamente usada en patología digital es la CIELAB. Estrictamente su nomenclatura es *CIE 1976 L*a*b**. Esta clasificación del espacio de color aporta algunas ventajas sobre el RGB. Por ejemplo, este espacio separa la componente de luminosidad (*L*) del resto de los componentes del color (*a*, *b*), permitiendo que estos últimos sean mucho menos sensibles a errores.

- Luminosidad: $L=0$, es negro y 100 indica blanco
- “*a*” compuesta por gama de colores entre rojo y verde
- “*b*” compuesta por gama de colores de entre amarillo y azul

El tratamiento de estos datos mediante técnicas informáticas es la base del análisis de imágenes digitales. Son muchos los grupos de investigación que se han beneficiado del auge de la tecnología WSI e intentado mejorar la objetividad del diagnóstico actual en anatomía patológica, incluida la valoración de la próstata.

Algunos de estos grupos de trabajo están compuestos por investigadores de primer nivel en el campo de la patología como el Dr. J. Epstein, impulsor del nuevo sistema de grados pronósticos. Sus trabajos se centran en reducir la variabilidad interobservador que existen en la valoración del Gleason 3 y 4 y en hallar nuevos marcadores histológicos para el pronóstico de la enfermedad ^{26, 27}.

Según la bibliografía revisada, se podrían dividir las técnicas utilizadas para la valoración del grado de Gleason en patología digital en dos grandes grupos:

- Deep learning²⁸
- Técnicas de extracción de características o segmentación asociadas a clasificadores

La primera, tiene la peculiaridad de aprender automáticamente características relevantes a múltiples niveles, que son constantes a las variaciones de la muestra problema^{28, 29}. Están compuestas por una red neuronal artificial (de tipo convolucional) imitando algunas características de las células nerviosas de nuestro organismo como el establecimiento de conexiones entre sí. Cuando se introduce una imagen a la red estas conexiones van variando de intensidad, potenciándose unas e inhibiéndose otras en dependencia de las características de ésta, creando un patrón característico para cada tipo de imagen. Tienen la ventaja de que no exigen un tratamiento previo de la imagen. Pero es necesario un gran número de imágenes para realizar el entrenamiento previo. Además de no obtener datos intrínsecos de la glándula de una forma directa que pudieran ser de interés como por ejemplo, área de luz glandular o atipia de los núcleos.

El segundo enfoque se caracteriza por la extracción de características de la muestra mediante algoritmos de análisis de texturas, como la extracción de bordes o la variación de los píxeles en regiones definidas o de algoritmos de agrupación de píxeles en grupos, entre otros²⁹. Este primer paso, es necesario para poder obtener datos relevantes de los componentes que se quieren detectar. La clasificación de estos se suele realizar mediante algoritmos de aprendizaje automático (machine learning). Los más frecuentemente utilizados son²⁹:

- Support Vector Machine (SVM): se basa en la obtención de la recta o hiperplano que mejor es capaz de separar los componentes a clasificar.
- Random Forest (RF): están formados por varios árboles de decisión acoplados entre sí. Seleccionando en cada uno de ellos la mejor variable que define el componente a clasificar.
- Adaboost (Adaptative Boosting): se trata de un meta-algoritmo que funcionan a partir de la interacción de varios algoritmos clasificadores débiles. Estos últimos realizan una clasificación parcial de los componentes. Pero englobados en el funcionamiento del adaboost cada uno se enfoca en el error del anterior, consiguiendo partir de clasificadores débiles un clasificador fuerte.

Algunos trabajos revisados utilizan un abordaje muy “directo” del problema intentando identificar el grado Gleason utilizando regiones de la imagen marcadas por los patólogos^{30, 31}. Extraen un set de características y aplican clasificadores automáticos tipo *Random Forest* o *Adaboost*. Otros grupos de investigación realizaban una caracterización de la glándula segmentando mediante un algoritmo de agrupamiento en grupos (K-means) sus componentes principales núcleos, estroma, citoplasma y luz. A partir de estos componentes intentan diferenciar entre Gleason 3 y 4 utilizando datos extraídos mediante teoría de grafos y la aplicación de un clasificador de los mencionados anteriormente.

4. Hipótesis

Mediante herramientas de análisis de imagen digital es posible identificar de un modo automático los diferentes patrones Gleason del adenocarcinoma de próstata, con una exactitud comparable al patólogo.

5. Objetivos

Objetivo principal del proyecto:

Identificar y cuantificar de forma robusta y automática mediante análisis de imagen las glándulas normales y los patrones de Gleason del adenocarcinoma de próstata, que presentamos a continuación:

- **Gleason 3:** Glándulas discretamente bien formadas
- **Gleason 4:** Cribiforme, Glándulas fusionadas, Glándulas pobremente formadas, Glándulas glomeruloides.
- **Gleason 5:** En sábana, En cordones, Nidos sólidos, Necrosis central, Células sueltas.

Objetivos secundarios:

- Establecer una sistemática de escaneo adecuada y valoración del resultado.
- Determinar la variación de los valores de los píxeles entre la imagen en formato TIFF y el formato utilizado.
- Evaluar las herramientas (programas informáticos, algoritmos, etc ...) que mejor se adecúan a nuestro interés.
- Establecer las características definitorias y discriminativas de los diferentes patrones. Y de los tipos celulares que pueden interferir. Éstas tienen que ser óptimas para ser identificadas mediante el ordenador y no suponer un costo computacional inasumible.
- Establecer un orden jerarquizado de aplicación de estas herramientas para poder concluir inequívocamente en el patrón en cuestión.

- validación de los resultados obtenidos después de la aplicación de algoritmos destinados a definir los componentes
- Medición del grado de correlación entre el sistema automático/patólogo.

6. Material y Métodos

6.1 Adquisición de conocimientos

Para la adecuada diferenciación entre los patrones de Gleason, el correcto entendimiento de los artículos relacionados con nuestro trabajo y los algoritmos utilizados. Fue necesario realizar un período de formación compuesto por:

- Período de aprendizaje en el servicio de *Anatomía Patológica del HUMS* junto a los doctores encargados de la sección de uropatología, el *Dr. Jorge Alfaro Torres* y la *Dra. Isabel Marquina Ibáñez*. La formación se dividió de la siguiente manera:
 - o Visualización conjunta de casos de prostatectomía radical. Se revisaron 10 casos aproximadamente, 370 cristales durante un período de 2 semanas.
 - o Establecimiento del nivel de concordancia. Se seleccionaron 30 casos de los que realicé la valoración del grado de Gleason. Estos datos se compararon en términos de grado detectado (indistintamente del porcentaje) con los informes de estas muestras objetivándose una concordancia del 70%.
- Período de aprendizaje en *el Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A)* junto al equipo de análisis de imagen médica. Compuesto por reuniones semanales desde finales de 2017 hasta la actualidad. Donde realice una tarea de conexión entre estos y los profesionales de anatomía patológica adquiriendo conocimientos básicos en análisis de imágenes y técnicas de “big data”.

6.2 Revisión bibliográfica

Las características propias de este trabajo han hecho necesaria la puesta al día de las últimas actualizaciones relacionadas con el manejo del paciente con adenocarcinoma de próstata, las actualizaciones en el sistema Gleason y el nuevo sistema de grados pronósticos. También se han evaluado artículos de patología digital de carácter general haciendo hincapié en los artículos de análisis de imagen aplicados a la próstata. Además, de material de características más técnicas sobre el procesamiento de imagen.

Para ello se realizó una búsqueda actualizada en Pubmed utilizando los siguientes términos: (“Gleason score” OR “Prostate neoplasm”) AND (“Whole slide imaging” OR

“digital pathology”) AND (“image analysis” OR “Image processing” OR “computer-assisted” OR “machine learning”) NOT “magnetic resonance imaging”

De los artículos encontrados se seleccionaron los que más se adecuaban a nuestro interés.

6.3 Selección de pacientes

Para la consecución de este proyecto, se tomarán todos los casos de prostatectomía radical realizados durante el año 2017. Con ello, se quiere garantizar el ajuste a los criterios de interpretación del grado Gleason a las últimas recomendaciones de la Sociedad Internacional de Uro-patólogos publicadas en 2015¹. El número total de casos incluidos en el estudio es 127 compuestos por cristales teñidos con H&E.

Las limitaciones a la inclusión de las muestras, son:

- No formarán parte del estudio los cristales de ganglios linfáticos, ya que la valoración de los mismos no está incluida en los objetivos de este trabajo.
- Muestras que no sean óptimas para el proceso de escaneo, ya sea, por rotura parcial del cristal, o por alguna otra circunstancia que pueda suponer un riesgo al funcionamiento del scanner. Estas incidencias serán registradas y se valorará la obtención de cortes adicionales.

Este tamaño muestral es muy superior al del resto de los estudios comparables al nuestro, ya que estos no solían superar los 50 casos (2000 cristales). Además, en el marco del proyecto pretendemos detectar patrones de Gleason 5 más infrecuentes, objetivo no abordado en estudios previos y cuya prevalencia real está por cuantificar.

La separación del total de casos en diferentes grupos para la clasificación final del patrón se explicará en el apartado de *Futuro trabajo (10.3)* en el que se explica la aplicación del clasificador de aprendizaje automático supervisado.

6.4 Obtención de imágenes

Cada una de las preparaciones ha sido digitalizada utilizando el scanner Aperio AT2 (Leica Biosystems) ubicado en el Servicio de Anatomía Patológica del HUMS, a la magnificación de X40 (0.25 μ M/pixel) y utilizando el formato JPEG2000. El dispositivo está autorizado para el uso diagnóstico mediante el certificado CE-IVD. Estas imágenes serán almacenadas en dispositivos específicos para este fin, pertenecientes al *instituto de investigación en ingeniería (I3A)*.

El funcionamiento básico del scanner Aperio AT2 se detalla a continuación:

- Introducción de los cristales previamente limpiados en los racks disponibles. Se pueden introducir un total de 400 cristales.
- El aparato detecta la parte del cristal que tiene la muestra y establece unos puntos de enfoque predeterminados.
- La muestra comienza a desplazarse debajo del objetivo de manera que se va digitalizando a partir de líneas perpendicular al eje mayor del cristal. Y cuando llega a un punto de enfoque, realiza esta tarea.
- Una vez digitalizada toda la preparación, los datos se vuelcan al disco duro o servidor.

Como la selección del área a escanear no es igual en todos los cristales, el tiempo de escaneo y el tamaño del archivo varían. El error más frecuente en este tipo de aparatos es el del desenfoque, que se solucionaba introduciendo de forma manual más puntos de enfoque.

Es necesario tener un buen control de las muestras escaneadas. Utilizando como soporte el programa *EXCEL*, se dispuso una hoja de trabajo con todas las preparaciones, dónde quedaba reflejada en qué fase del proceso se encontraba cada muestra y cualquier incidencia.

- Fase 1: Muestra no escaneada, pero que cumple criterios de inclusión
- Fase 2: Muestra escaneada
- Fase 3: Muestra escaneada, identificada, revisada y en dispositivo de almacenaje final.

Para garantizar el cumplimiento total del escaneo en un tiempo aceptable, se estableció un estricto horario detallado en el “*Anexo III*”

6.5 Comparativa imagen TIFF e imagen JPEG2000

La imagen en el formato TIFF (.tiff) es una imagen “en bruto” en la que no se producen pérdidas. En cambio, en el formato JPEG2000 (.jp2) la imagen sufre una pérdida al comprimirse. Partiendo de una misma preparación escaneada en cada uno de estos formatos se evaluarán las diferencias que existen entre ellas. Se realiza el agrupado en clústeres mediante el algoritmo K-means en ambas imágenes, estableciéndose el clúster 1 como estroma, el clúster 2 como luz y el clúster 3 como núcleos y se realizó una matriz de confusión.

6.6 Definición de características histológicas detectables.

Bajo la supervisión de los patólogos, se definieron los parámetros característicos y cuantificables de los diferentes tipos histológicos importantes para la caracterización del grado Gleason y la secuencia de valoración de las preparaciones que se realiza en este análisis. Se definieron en una primera reunión los aspectos destacables y definitorios de los diferentes grados de Gleason. Posteriormente, se trató de segmentar estos aspectos tal y como se describe en el apartado 6.7

6.7 Análisis de imagen

Por defecto, las imágenes se encuentran en el espacio de color RGB para poder ser reproducidas en los medios físicos de visualización habituales. Por lo tanto el primer paso debe de ser la conversión al espacio de color CIELAB. Seguidamente se realiza el análisis propiamente dicho:

- Segmentación de luz y núcleo mediante el algoritmo K-means y validación
- Segmentación de estroma y citoplasma y validación

- Deducción de los Componentes Problema Finales (CPF) y extracción de características

A continuación se expone más detalladamente los pasos de este proceso.

Se Aplicó el algoritmo K-means, para identificar los componentes próximos al blanco (luces) y los componentes próximos al negro (núcleos). La validación se realizó superponiendo la imagen original y valorando el número de falsos negativos y falsos positivos

El algoritmo K-means permite un agrupamiento en clústeres. En nuestro caso, en dependencia de la intensidad del pixel. Es necesario fijar un número de clústeres o grupos (K). Su funcionamiento básico es el siguiente:

- Se prefijan los centroides de cada clúster (K).
- Se realiza el proceso de asignación de los pixeles al clúster más próximo, en función de la distancia al centroide.
- Los centroides se vuelven a establecer promediando todos los pixeles.
- El punto 2 y 3 se repiten hasta que se logre la convergencia y ningún pixel cambie de clúster.

Mediante técnicas de análisis de texturas y otros algoritmos como los basados en la deconvolución de los colores, se identifica el estroma y el citoplasma. La validación se realiza superponiendo la imagen original marcada por el experto y calculando el coeficiente de similitud Jaccard.

Tras la segmentación del estroma, los componentes delimitados por estos serán detectados como Componentes Problema Totales (CPT). Sobre estos se realiza una deducción basada en características histopatológicas para detectar los componentes que claramente no son tumorales y excluirlos de nuestro análisis. De esta manera quedan constituidos los Componentes Problema Finales (CPF) que serán etiquetados por el experto.

Se extraen datos sobre las características de los núcleos entre si y la luz; la forma glandular y datos de atipia mediante técnicas de análisis de imagen.

Finalmente, se establece un clasificador de aprendizaje supervisado adecuado a la naturaleza de las variables correspondientes a las características detectadas. Los algoritmos de machine learning de este tipo más utilizados son Random Forest (RF) y Support Vector Machine (SVM).

Los algoritmos utilizados están programados en C++ y en el lenguaje de programación de *MATLAB*

6.8 Etiquetado de los Componentes Problema Finales (CPF)

Los patólogos visualizan los diferentes Componentes Problema Finales (CPF) junto a la porción de la imagen original adyacente a estos, para su correcta contextualización. Deben de identificar cada CPF con el patrón al que pertenecen.

Se utiliza para este fin, un software optimizado para permitir la identificación rápida pulsando una tecla.

6.9 Clasificación de los CPF en los patrones Gleason

A partir de los CPF identificados se establece un clasificador de aprendizaje supervisado adecuado a la naturaleza de las variables que se corresponden a las características detectadas (distribución de los núcleos, presencia de luz, forma...). Los algoritmos de machine learning de este tipo más utilizados son Random Forest (RF) y Support Vector Machine (SVM).

6.10 Análisis final de los resultados del software.

El análisis del funcionamiento de nuestro software se valora mediante una matriz de confusión. Este método es idóneo porque permite la valoración del grado de acierto y caracterizar el error. A modo de ejemplo y facilitar el correcto entendimiento de este apartado, se ha realizado una matriz de confusión orientativa, representada en la *tabla 5*. Los CPF identificados por el patólogo se representan con la letra “P” y los identificados por el software mediante una “S”. Al tratarse únicamente esta tabla para fines explicativos no se han incluido todos los patrones.

<u>Matriz de confusión</u>		<u>Patólogo (CPF)</u>		
		<u>Glándulas discretamente bien formadas (P)</u>	<u>Cribiforme (P)</u>	<u>Glándulas fusionadas (P)</u>
<u>Software (CPF)</u>	<u>Glándulas discretamente bien formadas (S)</u>	<u>Acierto (Glándulas discretamente bien formadas)</u>	<u>Cribiforme clasificado como Glándulas discretamente bien formadas</u>	<u>Glándulas fusionadas clasificado como Glándulas discretamente bien formadas</u>
	<u>Cribiforme (S)</u>	<u>Glándulas discretamente bien formadas clasificado como Cribiforme</u>	<u>Acierto (Cribiforme)</u>	<u>Glándulas fusionadas clasificado como Cribiforme</u>
	<u>Glándulas fusionadas (S)</u>	<u>Glándulas discretamente bien formadas clasificado como Glándulas fusionadas</u>	<u>Cribiforme clasificado como Glándulas fusionadas</u>	<u>Acierto (Glándulas fusionadas)</u>

Tabla 5: Matriz de confusión para la validación de los resultados finales.

A partir de estos datos se podrán calcular algunos estadísticos descriptivos como la precisión global, la Logloss y el área bajo la curva. Que permitirá una correcta valoración de nuestros datos.

6.11 Aspectos éticos

De acuerdo a las características de nuestro estudio al precisar el manejo de información sensible de pacientes, y en concreto de su ámbito oncológico se solicitó la aprobación del estudio por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA). Dicha aprobación se adjunta en el “Anexo IV”.

7. Resultados

7.1 Proceso de escaneo

Antes de comenzar esta tarea, pese a tener definido que el escaneo se realizaría a 40X (0.25 μ M/pixel), se tomó un mismo caso y se realizó este procedimiento también a la magnificación 20X (0.5 μ M/pixel) exponiéndose las diferencias encontradas en la *tabla 6*.

	X20 (0.5 μ M/pixel)	X40 (0.25 μ M/pixel)
T. escaneo 1 caso	1.5h	4h
T. escaneo todos los casos (127 casos)	195h	510h
Número de casos /semana según el horario propuesto.	45-46/sem 1380-1840Gb/sem	20
Duración escaneo del proyecto completo según el horario que planteo	3 Semanas	7 Semanas
Tamaño 1 caso	30-40 Gb	100-110 Gb
Tamaño total casos (120 casos)	3.6-4.8 Tb	12-13 Tb
Necesidad de copia a almacén definitivo desde disco duro externo (930Gb)	1 vez/semana	3 veces/semana

Tabla 6: Comparativa entre escaneado 20X y 40X.

Desgraciadamente, por algunos problemas técnicos no se ha logrado el objetivo de escanear todas las muestras. Se produjeron retrasos a la hora de recibir la formación necesaria para manejar el aparato, también se dedicó un tiempo a establecer la mejor dinámica de escaneo y hubo algún periodo en que no se pudo utilizar el aparato. Esto ha provocado que el número de casos escaneados hasta la fecha sea de 59 (46.5% del total de casos). Son un total de 2192 cristales, lo que nos da una media de 37.15 cristales por caso:

- Se excluyeron 5 cristales (0.23%), por encontrarse dañado el cristal (no se tiene en cuenta las preparaciones de ganglios linfáticos).
- El número de cristales repetidos es de 53 (2.70%), dentro del límite del 5% establecido como aceptable por la SEAP²⁰. El motivo principal fue que tenían aún restos de las marcas que realizan los patólogos sobre el cristal y que no habían sido correctamente limpiadas. El segundo motivo en frecuencia fue errores de

desenfoque. Finalmente, el motivo de menos frecuencia fue el provocado por fallos en la transferencia de datos a los discos duros.

7.2 Comparativa imagen TIFF e imagen JPEG2000

Una vez escaneados los cristales en ambos formatos, se evaluaron las diferencias entre los clústeres de las dos imágenes mediante esta matriz de confusión (figura 5):

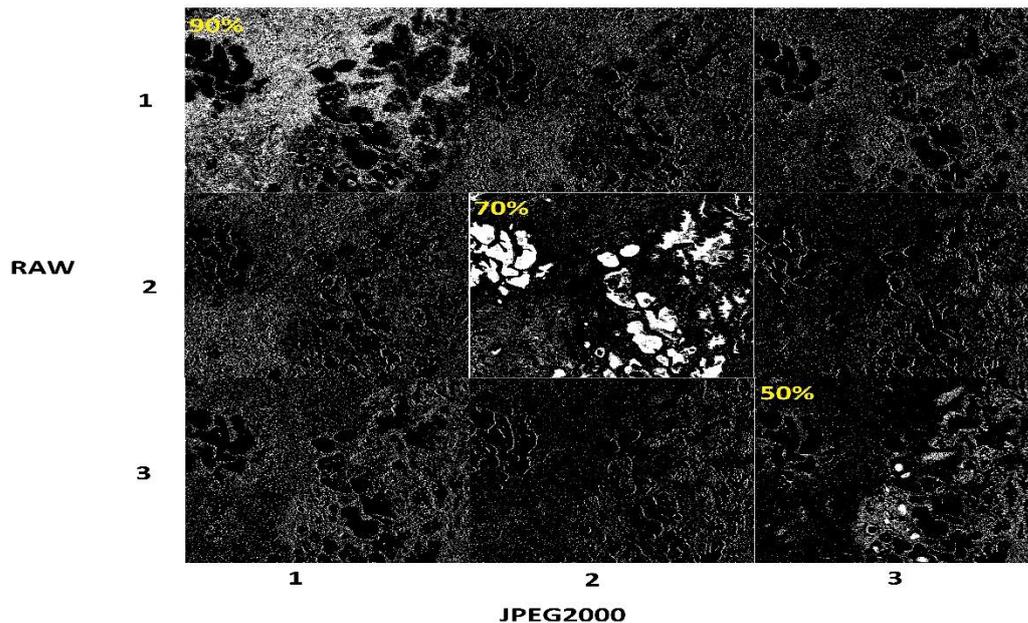


Figura 6: **Matriz de confusión entre la imagen en TIFF (Raw) y JPEG2000.** Variación de los pixeles incluidos en cada clúster. 1 Raw) clúster de estroma de la imagen en TIFF. 2 Raw) clúster de luz de la imagen en TIFF. 3 Raw) clúster de núcleos en la imagen en TIFF. 1 JPEG2000) clúster de estroma de la imagen comprimida. 2 JPEG2000) clúster de luces de la imagen comprimida. 3 JPEG2000) clúster de núcleos en la imagen comprimida.

El porcentaje que aparece en la diagonal hace referencia al grado de concordancia entre los clústeres emparejados de la imagen en TIFF y la imagen en JPEG2000. Donde más variación se ha producido es en el clúster de núcleos. Esto es debido al tipo de compresión que utilizan las imágenes en JPEG2000, basada en la transformada de Wavelet. Para interpretar estos datos, a efectos prácticos, este modelo de compresión parte de la imagen de tamaño original y va realizando filtros a resoluciones más bajas y va detectando las diferencias entre estas imágenes realizando una interpolación. Como en nuestro caso el componente principal de toda la muestra es el estroma, este será el principal componente cuando la imagen está a baja resolución, por esa razón es el componente que menos varía en nuestro análisis.

Pese a estos resultados, dado que el tamaño de la imagen en formato TIFF, supone 15 veces el tamaño de la imagen en JPEG2000 y ambas están recomendados por la Asociación Española de Anatomía Patológica, se utiliza este último tipo de formato³⁵.

7.3 Secuencia de aplicación de técnicas de análisis

Se muestra el esquema de deducción jerarquizada de componentes:

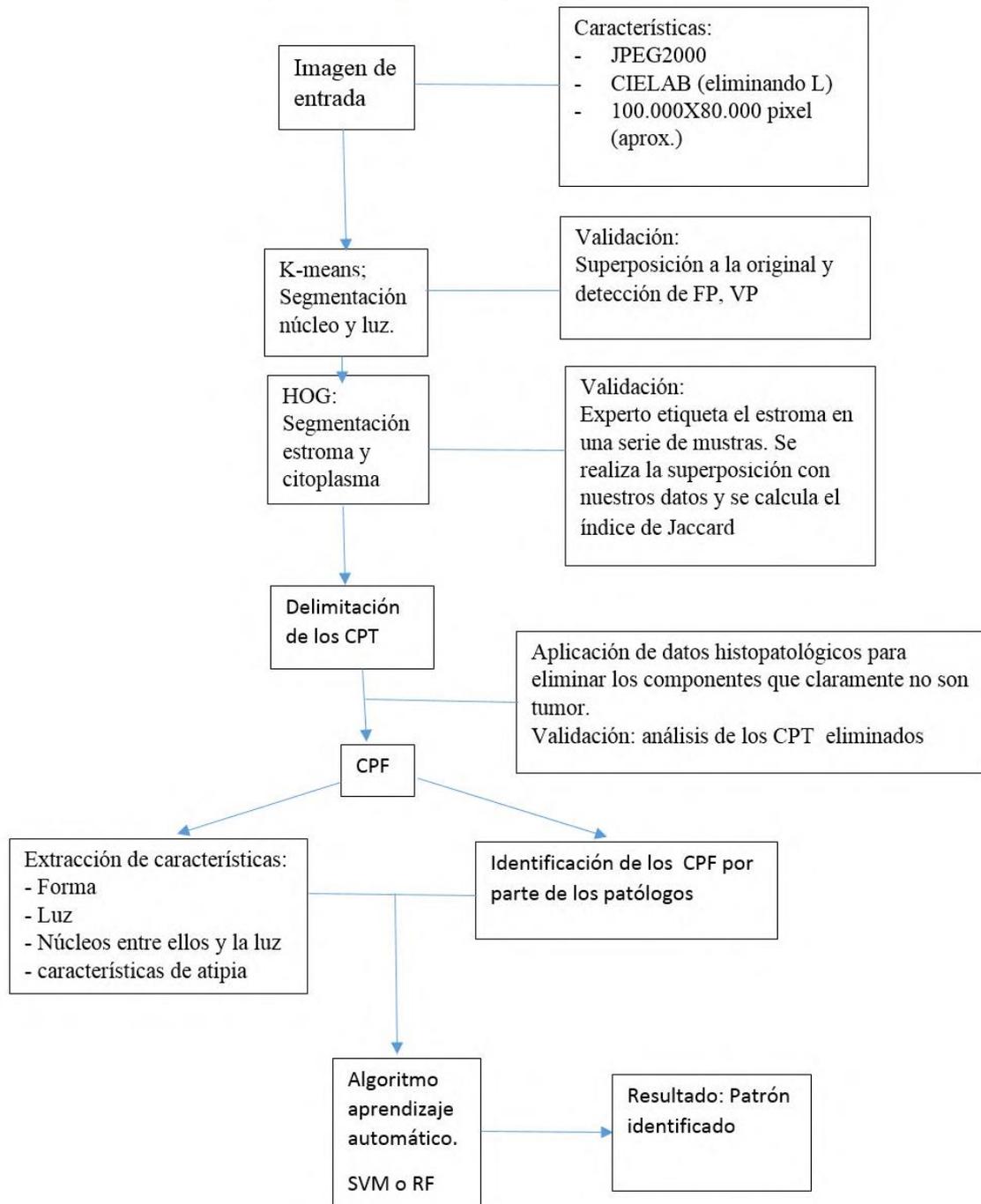


Figura 7: Esquema deducción.

7.4 Segmentación núcleo y luz

Tal y como se ha descrito en el apartado de *Material y métodos* (6.7), para la segmentación de los núcleos y de la luz de las glándulas, se ha implementado el algoritmo K-means. Los núcleos son los componentes más cercanos al negro y las luces los componentes más cercanos al blanco. Para ello se han evaluado 5 posibilidades que aparecen representadas en la tabla *tabla 7*, variando el número de clústeres de agrupamiento (K) y los clústeres destinados tanto a la luz, como a los núcleos.

Nº Opción	Nº Clusters (K)	Nº cluster al negro	Resto	Nº cluster al blanco
1	K=5	1-2	3-4	5
2	K=3	1	2	3
3	K=4	1	2-3	4
4	K=5	1	2-3-4	5
5	K=6	1-2	3-4-5	6

Tabla 7: Opciones K-means.

Se ha utilizado para decidir la opción más óptima de segmentado el software *Photoshop*. Con este software, se ha realizado la superposición de la imagen original con las siguientes máscaras:

- Máscara de clúster cercanos al negro. Estableciendo la transparencia de la capa oportuna, se valoraron estos errores:
 - Núcleos no marcados. Falsos negativos (FN)
 - Componentes de la imagen que no son núcleo y se marcan como tal. Falsos positivos (FP)
- Máscara de Clúster cercanos al blanco. Estableciendo los mismos ajustes, se valoraron:
 - Luz no marcada. Falsos negativos (FN)
 - Componentes de la imagen que no son luz, pero se marcan como tal. Falsos positivos (FP)

Se dio prioridad a la opción que menos falsos negativos producía y se valoró en segundo lugar los falsos positivos y las estrategias para poder identificarlos y descartarlos de esta capa.

A continuación, se muestra el proceso de segmentación con la opción elegida, opción número 1. Los pasos intermedios en este proceso aparecen en las *figuras 8, 9 y 10*:

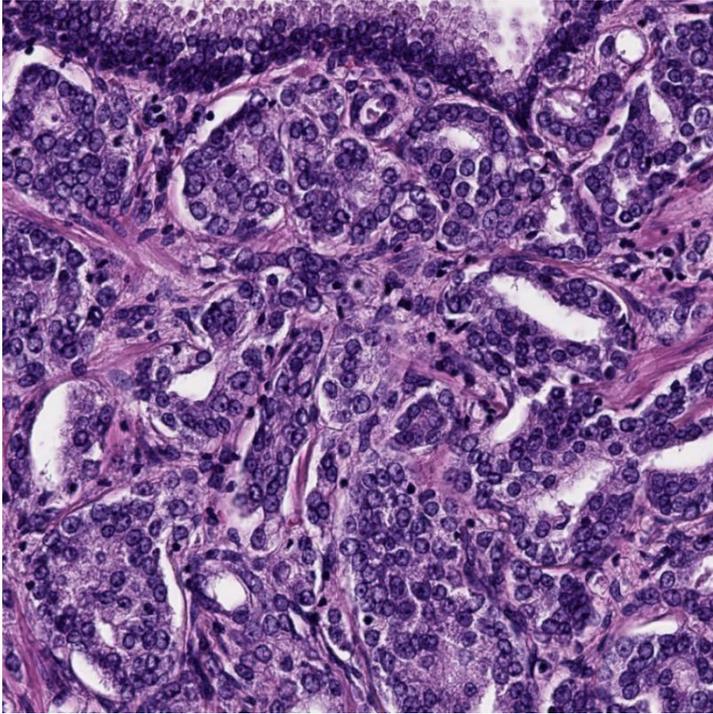


Figura 8. Imagen input.

Se ha elegido una porción de la imagen con Gleason 4 (patrón predominante de fusión de glándulas). Además, muchos de los núcleos presentan un aclaramiento de la paracromatina. A priori, este sería el tipo de núcleo que ofrece mayor dificultad a la hora de detectarlo.

Figura 8: Output (imagen de salida) de la aplicación del algoritmo K-means.

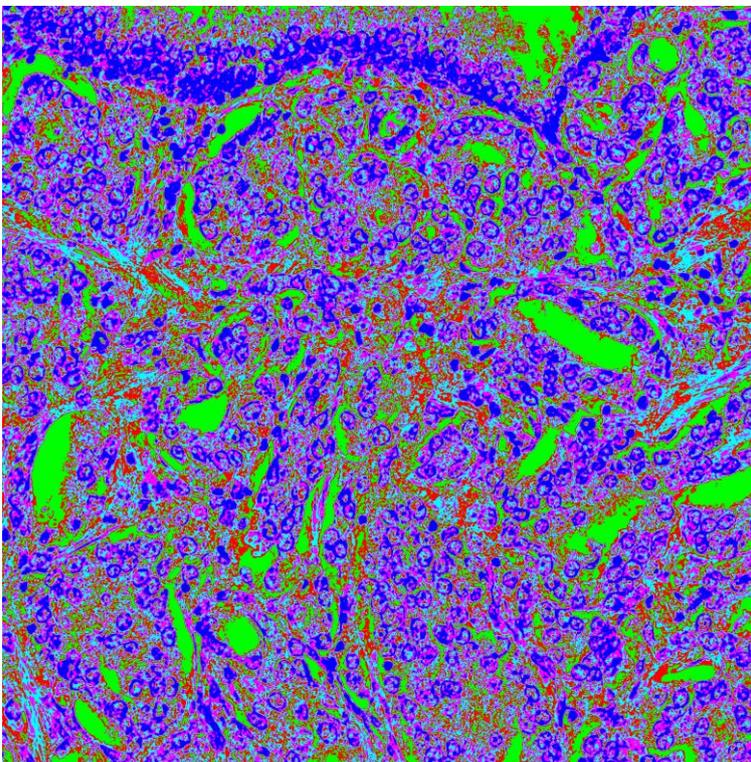


Figura 9. Output de los 5 clústeres.

1. Violeta: Núcleo
2. Azul oscuro: Núcleo
3. Cian: Resto
4. Rojo: Resto
5. Verde: Luz

Figura 9: Output (imagen de salida) de la aplicación del algoritmo K-means.

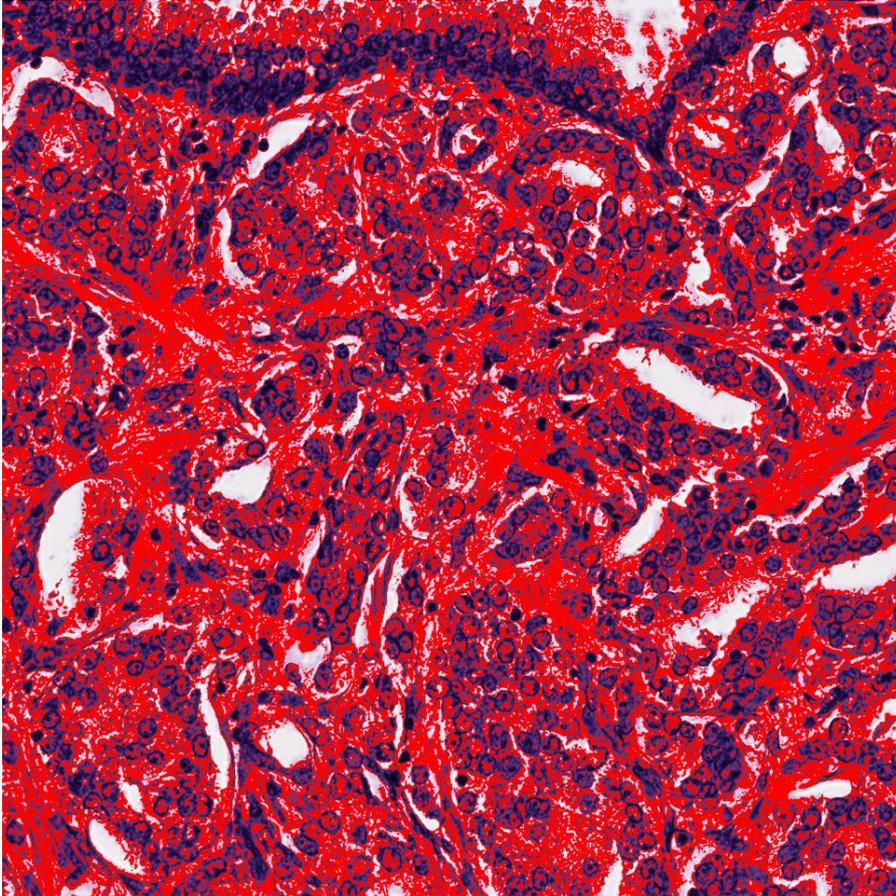


Figura 10. Agrupamiento de los clústeres.

Núcleos en azul oscuro.
Clústeres 1-2 agrupados.

Luz en blanco. Clúster 5.

El resto, que no se utilizará, aparece pintado en rojo para la mejor visualización.

Figura 10: Imagen final del proceso segmentación de núcleo y luz. Agrupamiento 1-2 núcleos y 5 luz.

En la parte superior de la *figura 8* se aprecia el epitelio de una glándula normal que es detectado correctamente. En la parte tumoral, los núcleos con aclaramiento de la paracromatina, también son detectados, y se considerarán atípicos. Este dato es importante para posteriores etapas del proceso.

7.5 Definición de características histológicas

A continuación se definen en las *tablas 8, 9 y 10* las características de los diferentes componentes celulares que son marcados como próximos al negro, próximos al blanco y resto. Separando las características propias del componente celular y sus relaciones externas.

Próximos al blanco (Luz)	Características intra.	Relaciones extra.
Vaso	- Puede tener, pero no siempre hematíes en la luz - Puede tener, pero no siempre cel. Endotelial protruyendo luz	-En estroma
Glandular (Benigna)	- Normalmente luces grandes, onduladas con cuerpo amiláceo	- Luz rodeada de epitelio normal
Glandular anormal	- Mucina azul - Cristaloides	- Luz rodeada de epitelio anormal
Cribiforme	- Varias luces	- En un mismo componente glandular
Artefacto estroma	- Luces poligonales	- En estroma
Artefacto luz glandular	- Se separan el epitelio del estroma	- Deja de un lado el estroma y de otro el componente glandular
Artefacto corte cuchillo	- Luces poligonales	- Forman una línea, no conexa, perpendicular al corte
Grasa Periprostática	-Luces características de forma poligonal	- Tabiques muy finos de estroma que separa estas luces, y muy vascularizados

Tabla 8: Características propias y de relación con el exterior de los componentes “Hacia el blanco”. Clúster 5.

Resto	Características intra.	Relaciones extra.
Hematíe.	- Rojos - Sin núcleo	- Dentro de los vasos
Cuerpo amiláceo (muy raro en glándula maligna)	- Rosado - Compuesta de círculos concéntricos - Límites bien definidos	- Dentro de la luz glandular - Pueden estar rodeados de luz o tocando la pared
Cristaloide	-Estructura geométrica eosinófila, romboidales y prismáticas	- Pueden estar rodeados de luz o tocando la pared

Tabla 9: Características propias y con el exterior de los componentes “resto”. Clúster 3 y 4.

Próximo al negro (núcleo)	Características intra.	Relaciones extra.
N. Epiteliales (benignas)	- Epitelio puede ser cúbico, cilíndrico o pseudoestratificado - Pueden tener más de una capa de células.	- Luz grande
N. Epitelial atípica (maligna)	- Agrandamiento nuclear e hiper cromasia (mas teñida) - Nucléolos grandes, localizados en la periferia (puede haber varios) - Núcleo con aclaramiento de la paracromatina - Mitosis infrecuentes pero muy sugestivas de malignidad - No tiene capa basal	- Puede tener luz pequeña - Puede tener varias luces asociadas (cribiforme) - Puede no tener luz asociada - Puede estar suelta por el estroma
N. Epitelio vesícula seminal	- Pigmento amarillo (este pigmento no es fruto de la tinción es propio de esta parte de la próstata)	- Este epitelio puede simular algunos rasgos de atipia, pero no se tienen en cuenta.
N. Endotelio vascular (capilar)/vaso linfático	- Núcleo alargado	- Protruye luz vaso
N. Vaso grande	-Endotelio + capa muscular ordenada	- En estroma
N. Fibroblasto/ musculo liso	-Núcleo alargado	- En estroma
Linfocito (no siempre presente)	- Núcleo teñido más intensamente - Citoplasma inexistente - Cromatina homogénea (mismo color)	- En estroma - Toman cualquier distribución espacial posible.
Neutrófilo (poco frecuente)	- Núcleo multilobulado - Citoplasma presente	- En estroma - Toman cualquier distribución espacial posible
Límite quirúrgico	-Línea discontinua verde, roja o negra	- Separa el material en si del porta sin preparación
Artefacto por plegamiento	- Se tiñe de una forma más oscura porque (tejido más grueso.)	- Son líneas o formas geométricas
N. Adipocito	- Alargado, pequeño y en la periferia	- El adipocito está en la periferia. El citoplasma está vacío.
N. célula Schwann	- Núcleo y resto de los componentes del nervio, están ondulados de una forma característica.	- En estroma, separado de él normalmente por un halo blanco. - Se encuentra en la periferia de la próstata.

Tabla 10: Características propias y de relación con el exterior de los componentes “Hacia el negro”. Clúster 1 y 2.

8. Discusión

Este trabajo final de grado ha servido para sentar las bases del abordaje definitivo que permitirá cumplir el objetivo principal del proyecto. Para ello hemos intentado seguir el mismo procedimiento que seguiría un patólogo a la hora de gradar este tipo de tumor. Prueba de ello es que nosotros hayamos optado por detectar cada patrón y a partir de este, el grado Gleason, tal y como realiza el profesional. En lugar de seguir el procedimiento descrito en la mayoría de trabajos que abordaban la detección del grado Gleason directamente.

También hemos planteado una sistemática para el marcaje de los diferentes patrones por el experto a partir de CPF que no aparece reflejada en ninguno de los artículos revisados hasta la fecha. En los trabajos en que se utilizaban imágenes marcadas por el patólogo, estas eran marcadas directamente en las preparaciones sin muchas medidas facilitadoras para esta tarea. Este procedimiento requiere mucho tiempo y esfuerzo por parte del patólogo. Además, la rotulación suele realizarse mediante herramientas básicas en entornos de editado provocando que se introduzca ruido que disminuye la calidad del análisis posterior. En cambio, nuestro enfoque comienza con un primer procesado de la imagen seleccionando los componentes delimitados por el estroma y eliminado de estos, los componentes que claramente no son tumor. Después de este procedimiento es cuando el patólogo realiza el etiquetado de los CPF de una forma rápida y sin introducir ruido al análisis.

En este trabajo se han utilizado imágenes completas de tipo WSI de un tamaño aproximado de 100.000X70.000 píxeles, muy superior a la mayoría de trabajos. Donde se utilizaban porciones de estas imágenes que no solían superar los 10.000X10.000 píxeles. Este hecho hace más complicado el análisis provocando una serie de limitaciones técnicas. El tamaño de nuestros archivos solía superar los 2 Gb, pero para realizar los análisis informáticos se debía de trabajar con la imagen descomprimida que solía rondar los 27 Gb. Esto sumado a la memoria necesaria para realizar el análisis, superaba la capacidad de memoria RAM de nuestros aparatos. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, nos vimos obligados a procesar las imágenes en mitades.

Además, las muestras tenían un grosor de 3-4 μ m que era excesivo ya que en condiciones ideales como se muestra en los artículos de patología digital general revisados, se

obtienen menos problemas de desenfoque y de aglomerado de núcleos en cortes más finos.

Tomamos varios trabajos como referencia, algunos de ellos fueron los realizados por el grupo de *Nguyen et al* dónde se encontraron varias limitaciones^{32, 33}. Detectamos que cuando utilizábamos el algoritmo K-mean en el espacio de color RGB, obteníamos variaciones importantes de los centroides entre porciones centrales y periféricas del tejido. Éstas se deben a la propia técnica a la hora de obtener la imagen en el escáner, ya que la porción periférica está mucho más iluminada que la central. Por lo tanto, decidimos hacer una conversión al espacio CIELAB, donde la componente de luminosidad (L) es independiente a los colores. Tras eliminar esta componente (L) y aplicar el algoritmo K-means los problemas se redujeron en gran medida, confirmando nuestro planteamiento.

Este mismo equipo de investigación, realizó la segmentación del estroma con el algoritmo anterior, como ellos mismo parecen dar a entender, al no utilizar el estroma como un dato fiable en su deducción, no se logra hacer una adecuada separación de este componente. Realizamos pruebas con sus mismos parámetros y confirmamos este hecho. Planteamos que la utilización de técnicas de análisis de texturas puede dar mejores resultados.

En la realización de este trabajo de patología digital nos hemos encontrado con varias dificultades importantes, principalmente por la falta de estándares establecidos y el gran tamaño de los archivos.

El formato en el que se deben de obtener estas imágenes, el espacio de color indicado para realizar el análisis, las técnicas de validación de los resultados y los medios físicos para la reproducción de estas imágenes, solo son algunas de las cuestiones que se deberían de resolver ante el auge de esta tecnología.

Para este fin, sería interesante valorar si la variación de píxeles encontrada entre el formato TIFF y JPEG2000 tiene una repercusión clínica a la hora de realizar el diagnóstico histopatológico en el trabajo asistencial. Por nuestra parte, tendría importancia estudiar si los resultados finales de este estudio varían si se utilizará el formato TIFF. También sería posible comparar el formato .tiff, con otros formatos en el mercado .svs, .jpeg, .vsi, .bif. De esta manera se podría cubrir uno de los problemas mencionados por *The Royal College of Pathologist*, la falta de un formato único de archivo que se utilice como estándar en patología digital³⁶.

Dado que actualmente nos encontramos en el proceso de segmentación y que cada paso depende del anterior. Existen unas cuestiones a las que deberemos de prestar gran atención:

- Interacción de los linfocitos en la secuencia de detección.
- Correcta identificación del patrón de células sueltas.
- Correcta identificación del patrón de necrosis central (muy infrecuente).
- Valorar un sistema de contextualización final de las glándulas, para determinar los efectos del corte.

Además de poder reducir la variabilidad interobservador y de obtener más datos valorables del tumor. Con nuestro enfoque establecemos las bases para futuros trabajos en los que podríamos correlacionar cada patrón con la recidiva bioquímica y ofrecer datos objetivos que sean de utilidad para resolver algunos temas controvertidos, como el grado de malignidad que supone el patrón criboso, los criterios para la inclusión al programa de vigilancia activa y ayudar a caracterizar mejor el tumor total, a partir de los datos obtenidos en los cortes histológicos. Además, podríamos analizar otros datos que son relevantes en otros tumores como la presencia de linfocitos intratumor, dato relevante en el cáncer de mama.

Actualmente, pese a que el trabajo con estas imágenes puede estar sujeto a algunas limitaciones técnicas, es muy probable que éstas se solucionen con el avance de la tecnología. Creemos que la patología digital y el análisis de imágenes pueden cambiar el enfoque actual de la histología y de la anatomía patológica. Ganando en objetividad y en la obtención de datos que nos permitan una mejor estratificación del riesgo de los pacientes. Éstas, sin duda, han sido y serán, señas de identidad de una buena práctica médica.

9. Conclusiones

Se ha establecido una dinámica óptima de escaneo de los cristales incluidos en este estudio, cumpliendo con las recomendaciones de la SEAP. Además, esto ha permitido la puesta a punto (calibrado, detección de errores...) del scanner Aperio AT2 de reciente adquisición por el HUMS. Pese a esto, únicamente se ha completado el 50% de los casos incluidos a estudio. Debido a retrasos técnicos, organizativos y a la curva de aprendizaje para su manejo.

En cuanto a la magnificación de la digitalización de imágenes se ha barajado la posibilidad de realizar el escaneo a 20X ($0.5\mu\text{M}/\text{pixel}$) o 40X ($0.25\mu\text{M}/\text{pixel}$). Siguiendo la primera opción se reduce en un factor 1/3 el tiempo de escaneo y el peso del archivo. Pese a esto, el escaneo por 40X permite una mayor caracterización de la muestra (en especial de datos nucleares) y esto puede repercutir en el análisis final.

Gracias al análisis comparativo descrito entre la imagen en formato TIFF y en JPEG2000 hemos establecido una sistemática objetiva para valorar las diferencias entre formatos de imagen a partir del cambio de clúster de los píxeles.

De acuerdo a los datos obtenidos, el algoritmo K-means utilizado sobre imágenes completas se comporta de una manera más adecuada en el espacio CIELAB (eliminando la componente "L") que en el espacio RGB de color.

Comparando varias opciones del algoritmo K-meas que utilizamos para segmentar núcleo y luz hemos determinado la opción que mejor se adecua a nuestro interés:

- K=5, agrupando los clústeres 1 y 2 (más próximos al negro) como núcleo y el clúster 5 (más próximo al blanco) como luz.

Se ha planteado una sistemática de aplicación de técnicas de análisis de imagen para concluir en los CPF. Con esto se consigue dividir el complejo problema de cuantificar los patrones de Gleason en pequeñas unidades que permiten facilitar el abordaje.

10.Futuro trabajo

10.1 Separación estroma y citoplasma

Esta distinción es muy importante ya que el estroma separara los Componentes Problema Totales (CPT) a definir y la detección del citoplasma es útil para caracterizar las luces. Para establecer una adecuada distinción se plantea la implementación del algoritmo HOG (Histograms of Oriented Gradient)²⁹.

Este algoritmo detecta las variaciones en la dirección y en la intensidad de las pequeñas porciones en las que dividiremos la muestra. De esta manera, ponemos en relevancia la variación de dirección de las fibras de colágeno características del estroma y el componente más granular sin direccionalidad característico del citoplasma.

También se valoró la utilización de otras técnicas de análisis de texturas mencionadas en otros trabajos, estas son *Local Binary Patterns*, *Haralick Textures Features* y *Gabor Filters*³⁷.

Tenemos en cuenta que las zonas donde las glándulas están más agrupadas, el componente de estroma se suele encontrar más compacto, deberemos de determinar cómo se comporta el algoritmo HOG y valorar el uso de otros enfoques como técnicas de deconvolución de colores utilizadas para este fin en otras ocasiones³⁸.

10.2 Deducción de componentes celulares

Se muestra una secuencia de aplicación de técnicas de análisis de imágenes que intenta imitar a la valoración que hace el anatomopatólogo de una preparación de prostatectomía radical.

10.2.1 Tratamiento pre-análisis:

- En la capa de núcleos detectaremos el artefacto de plegamiento. Característicamente son áreas grandes de forma geométrica. Estableceremos el límite de valor de área que se corresponde con esta y extraeremos las formas para identificarla y eliminarla del análisis

- En la capa de luces detectaremos las luces que están rodeadas de estroma. Éstas son artefactos presentes en estroma, artefactos provocados por la cuchilla o pequeños capilares sin hematíes en su interior. Estos componentes también serán eliminados de nuestro análisis. En esta misma capa, detectaremos las luces que están en contacto por un lado, con el componente glandular (núcleo, citoplasma) y por otro lado, el estroma. Estas luces únicamente pueden ser retracción periacinar. Ese dato será valorado para la contextualización de las glándulas (figura 11 y 12).

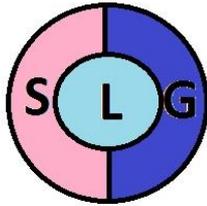


Figura 11: Representación gráfica de la retracción periacinar.

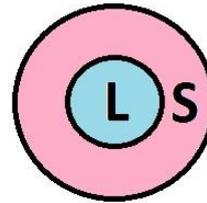


Figura 12: Representación gráfica de los artefactos del estroma y de los capilares.

- Detectaremos en el histograma de la preparación, la coloración amarilla típica del pigmento de la vesícula seminal. Este pigmento es independiente de la tinción de la muestra. Solo se ha detectado una coloración similar en material de degradación en el contexto de infección, además, esa coloración estaba fuera del componente glandular, al contrario del pigmento de la vesícula seminal. Si es detectado en el histograma, la secuencia del programa la buscará dentro de las glándulas, excluyéndola del análisis.
- Identificación del área conexas de luz de mayor tamaño de la imagen (LM). Los componentes de la imagen incluidos en ésta, es decir, las diferentes porciones de tejido, serán identificadas como muestras problema (MP).
- En cada MP se identificará el borde quirúrgico estableciendo el perímetro la MP y detectando aquellos que están segmentados por una gran región de capa núcleo (más próxima al negro) en la intersección LM-MP. Con esto se determinará la orientación de la muestra y se pondrá en contexto con los datos del bloque al que pertenece la muestra.

10.2.2 Análisis:

Mediante la segmentación del estroma en cada muestra problema (MP), podremos identificar las partes que quedan inmersas en éste, estos serán los Componentes Problema Totales (CPT) que incluyen glándulas benignas, glándulas tumorales, y vasos de mayor

calibre con capa muscular. A continuación, se muestran los procedimientos a seguir para excluir del análisis los componentes que claramente no son tumor, para quedarnos finalmente con los Componentes Problema Finales (CPF).

- Tal y como realiza el patólogo, identificaremos las glándulas con una gran luz que es un dato claro de benignidad. Este dato se extraerá de una forma similar a la realizada en el trabajo Diamond et al ³⁹.
- Se eliminan del análisis las glándulas con una luz y varias capas de núcleos, ya que estas son características de glándulas benignas o de neoplasia intraepitelial (PIN) que no se analizarán en este estudio. Al seleccionar únicamente las glándulas de una luz no interfiere con el patrón criboso y patrón de glándulas fusionadas.
- Para determinar el contenido de la luz de los componentes problema totales (CPT) se calculará el perímetro de la luz mayor del CPT y el perímetro de citoplasma interno, la diferencia entre ambos será el contenido de la luz glandular. Mediante técnicas de análisis de textura e histograma se detectan los hematíes, calificando estos CPT como vasos y se excluirán del análisis. El contenido de la luz detectado del resto, se tendrá en cuenta para la posterior clasificación de los patrones.

Después de la eliminación de estos se constituyen los componentes problema finales (CPF). Y serán los que se presenten al patólogo para realizar el etiquetado.

Finalizado ese proceso y para poder realizar la clasificación posterior en cada patrón, deberemos de realizar una extracción de características de cada CPF. De la misma manera que el patólogo se fija en las características nucleares, distribución de los núcleos, forma glandular, presencia de luz y su contenido... Nosotros utilizaremos algoritmos para valorar dichas características, basándonos en otros grupos de trabajo^{33,34}.

10.3 Clasificación de los patrones Gleason

Para poder concluir finalmente en el patrón en cuestión aplicaremos unos de los dos algoritmos de aprendizaje supervisado más utilizados, Random Forest (RF) o Support Vector Machine (SVM). La utilización de uno u otro dependerá del tipo de variables que finalmente utilizemos para describir las características mencionadas de los CPF.

Para la aplicación de estos algoritmos se sigue una misma sistemática que viene ya predefinida. En primer lugar, se separan los 127 casos en dos grupos de una forma aleatoria simple. Uno de ellos incluirá el 80% y será denominado grupo de entrenamiento. El resto, es decir, el 20% constituirá el grupo de prueba.

El grupo de entrenamiento es el que se utiliza para establecer los ajustes internos del algoritmo. Esto es debido a que el circuito está “cerrado” ya que tenemos el *input*, las características extraídas del CPF y el *output* que sería por ejemplo, patrón criboso.

Una vez realizado esto en todos los CPF del grupo de entrenamiento, utilizaremos el grupo de prueba para determinar cómo se realiza esta clasificación. En esta parte dispondremos del *input*, pero lo que queremos es detectar si el algoritmo es capaz de determinar a partir de sus ajustes internos que patrón es. Como las muestras de prueba también están identificadas, podemos determinar si se ha identificado de una forma correcta o no y extraer datos estadísticos, el más importante en este procedimiento se calcula a partir de la sensibilidad y la especificidad, el área bajo la curva (en inglés AUC).

A continuación, se vuelve a realizar la división del grupo de entrenamiento y el de prueba de forma aleatoria, creando dos grupos diferentes a los previos. Se volverá a ajustar el algoritmo a este grupo de entrenamiento y se analizará cómo se comporta en el grupo de prueba valorando el AUC, que se irá incrementando.

Estos pasos se repiten sucesivamente. Hasta que llega un momento donde el AUC se estanca o incluso disminuye. Este dato es nuestra señal de parada. Esta disminución en el desempeño es debida a que el software empieza a sobreajustarse. Es decir, empieza a establecer unos ajustes internos a unos datos puntuales de las variables que no se pueden generalizar.

11. Referencias bibliográficas

1. Epstein J, Egevad L, Amin M, Delahunt B, Srigley J, Humphrey P. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2015;1.
2. García-Porrero J, Hurlé J. Anatomía humana. 1ª ed. Aravaca, Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España; 2013.
3. Netter F. Atlas de anatomía humana. 6ª ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2015
4. McAninch J, Lue T, Smith D, Pineda Rojas E. Smith and Tanagho Urología general. 18ª ed. Madrid: McGraw-Hill education; 2014.
5. Ross M, Pawlina W. Histología. 7ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.
6. Geneser F, Brül A. Geneser Histología. 4ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2015.
7. Las cifras del cáncer en España 2018 [Internet]. Seom.org. 2018 [citado el 1 Mayo 2018]. Disponible en: <https://www.seom.org/es/noticias/106525-las-cifras-del-cancer-en-espana-2018>.
8. European Association of Urology. Prostate Cancer | Uroweb [Internet]. Uroweb. 2018 [citado 1 May 2018]. Disponible en: <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/>
9. Hernández V, Blázquez C, de la Peña E, Pérez-Fernández E, Díaz F, Llorente C. Vigilancia activa en cáncer de próstata de bajo riesgo. Aceptación por el paciente y resultados. *Actas Urológicas Españolas*. 2013;37(9):533-537.
10. Deng F, Donin N, Benito R, Melamed J, Nobin J, Zhou M et al. Size-adjusted Quantitative Gleason Score as a Predictor of Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy. 2016.
11. Iczkowski K, Torkko K, Kotnis G, Storey Wilson R, Huang W, Wheeler T et al. Digital Quantification of Five High-Grade Prostate Cancer Patterns, Including the Cribriform Pattern, and Their Association With Adverse Outcome. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011;136(1):98-107.
12. Guerra Merino I. Libro blanco de la Anatomía Patológica en España. 5ª ed. Madrid: Sociedad Española de Anatomía Patológica; 2017.
13. Amin M, McKenney J, Tickoo S, Paner G, Shen S, Velazquez E et al. Diagnóstico en patología. Madrid: Marbán; 2013.

14. Moch H. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.
15. Epstein J, Netto G. Biopsy interpretation of the prostate. Philadelphia: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
16. Epstein J, Egevad L, Mahul B, Delahunt B, Srigley J, Humphrey P. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American Journal of Surgical Pathology*. 40(2):244-252, February 2016.
17. Ozkan T, Eruyar A, Cebeci O, Memik O, Ozcan L, Kuskonmaz I. Interobserver variability in Gleason histological grading of prostate cancer. *Scandinavian Journal of Urology*. 2016;50(6):420-424.
18. Al Nemer A, Elsharkawy T, Elshawarby M, Al-Tamimi D, Kussaibi H, Ahmed A. The updated grading system of prostate carcinoma: an inter-observer agreement study among general pathologists in an academic practice. *APMIS*. 2017;125(11):957-961.
19. Harbias A, Salmo E, Crump A. Implications of Observer Variation in Gleason Scoring of Prostate Cancer on Clinical Management: A Collaborative Audit. *The Gulf Journal of Oncology*. 2018;25, September 2017:41-45.
20. García Rojo M, Félix Conde A, Ordi J, Ruiz Martín J, Corominas J, Álvarez Alegret R et al. Guía práctica para la implantación de la patología digital. en Guerra Merino I. Libro blanco de la anatomía patológica en España. Madrid: Sociedad Española de Anatomía Patológica.; 2015.
21. Abels E, Pantanowitz L. Current state of the regulatory trajectory for whole slide imaging devices in the USA. *Journal of Pathology Informatics*. 2017;8(1):23.
22. Williams B, DaCosta P, Goacher E, Treanor D. A Systematic Analysis of Discordant Diagnoses in Digital Pathology Compared With Light Microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2017;141(12):1712-1718.
23. Goacher E, Randell R, Williams B, Treanor D. The Diagnostic Concordance of Whole Slide Imaging and Light Microscopy: A Systematic Review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2017;141(1):151-161.
24. Williams B, Bottoms D, Treanor D. Future-proofing pathology: the case for clinical adoption of digital pathology. *Journal of Clinical Pathology*. 2017;70(12):1010-1018.
25. Boyce B. Whole slide imaging: uses and limitations for surgical pathology and teaching. *Biotechnic & Histochemistry*. 2015;90(5):321-330.

26. Jian Ren, Sadimin E, Daihou Wang, Epstein J, Foran D, Xin Qi. Computer aided analysis of prostate histopathology images Gleason grading especially for Gleason score 7. 2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). 2015.
27. Lee G, Veltri R, Zhu G, Ali S, Epstein J, Madabhushi A. Nuclear Shape and Architecture in Benign Fields Predict Biochemical Recurrence in Prostate Cancer Patients Following Radical Prostatectomy: Preliminary Findings. *European Urology Focus*. 2017;3(4-5):457-466.
28. Kallen H, Molin J, Heyden A, Lundstrom C, Astrom K. Towards grading gleason score using generically trained deep convolutional neural networks. 2016 IEEE 13th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI). 2016.
29. Xing F, Yang L. Robust Nucleus/Cell Detection and Segmentation in Digital Pathology and Microscopy Images: A Comprehensive Review. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*. 2016;9:234-263.
30. DiFranco M, O'Hurley G, Kay E, Watson R, Cunningham P. Ensemble based system for whole-slide prostate cancer probability mapping using color texture features. *Computerized Medical Imaging and Graphics*. 2011;35(7-8):629-645.
31. Doyle S, Feldman M, Tomaszewski J, Madabhushi A. A Boosted Bayesian Multiresolution Classifier for Prostate Cancer Detection From Digitized Needle Biopsies. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2012;59 (5):1205-1218.
32. Nguyen K, Sarkar A, Jain AK. Structure and context in prostatic gland segmentation and classification. *Med Image Comput Comput Assist Interv*. 2012;15 (Pt 1):115-23.
33. Nguyen K, Sarkar A, Jain A. Prostate Cancer Grading: Use of Graph Cut and Spatial Arrangement of Nuclei. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 2014;33(12):2254-2270.
34. Nguyen K, Sabata B, Jain A. Prostate cancer detection: Fusion of cytological and textural features. *Journal of Pathology Informatics*. 2011;2(2):3.
35. García Rojo M, Félix Conde A, Ordi J, Ruiz Martín J, Corominas J, Álvarez Alegret R et al. Guía práctica para la implantación de la patología digital. en Guerra Merino I. Libro blanco de la anatomía patológica en España. Madrid: Sociedad Española de Anatomía Patológica.2015.
36. Cross S, Furness P, Igali L, Snead D, Treanor D. Best Practice Recommendations for Implementing Digital Pathology. The Royal College of Pathologist. 2018.

37. Linder N, Konsti J, Turkki R, Rahtu E, Lundin M, Nordling S et al. Identification of tumor epithelium and stroma in tissue microarrays using texture analysis. *Diagnostic Pathology*. 2012;7(1):22.
38. Gertych A, Ing N, Ma Z, Fuchs T, Salman S, Mohanty S et al. Machine learning approaches to analyze histological images of tissues from radical prostatectomyies. *Computerized Medical Imaging and Graphics*. 2015;46:197-208.
39. Diamond J, Anderson N, Bartels P, Montironi R, Hamilton P. The use of morphological characteristics and texture analysis in the identification of tissue composition in prostatic neoplasia. *Human Pathology*. 2004;35(9):1121-1131.
40. Buyyounouski M, Choyke P, McKenney J, Sartor O, Sandler H, Amin M et al. Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017;67(3):245-253.

12. ANEXO I: Datos del informe e Imágenes

12.1 Datos informe

Los datos de importancia que deben de constar siempre en el informe, son:

- **Tipo histológico:** 90-95% de CaP son adenocarcinoma convencional (acinar)
- **Gradación de Gleason:** patrón primario + patrón secundario (incluir / comentar presencia de un patrón terciario si es mayor que los otros dos y > 5%*). Grupo de grado pronóstico.
- **% de patrón 4 si el score Gleason ≥ 7**
- **Volumen tumoral:** % afectación de la glándula y/o tamaño del tumor o nódulo dominante si presente (diámetro máximo +/- dimensión/es adicional/es)
- **Extensión extra-prostática:** Ausente / Presente: informar localización y extensión (focal vs no focal o establecida)
 - L: post, posterolateral D/I, ant, anterolat D/I, ápex y base o cuello vesical
 - E: por CGA ó mm (focal: < 1CGA o 1 mm, en máximo dos secciones;
 - No focal o establecida: dimensión máxima +/- nº de bloqs. (opcional).
- **Invasión de vesículas seminales:** requerida infiltración de pared muscular
 - Si presente: Dcha / Izda / bilateral
- **Márgenes quirúrgicos.** Negativos / positivos:
 - Localización: uni o multifocal y especificar si intra o extraprostáticos
 - Extensión lineal de la afectación si son positivos
 - Patrón de Gleason presente en el margen
- **Invasión linfo-vascular:** presencia / no identificada
- **Invasión perineural:** presencia / no identificada (opcional)
- En su caso: **efecto del tratamiento en el carcinoma**
- **Ganglios linfáticos regionales:** nº positivos / nº total. Dimensión del mayor nódulo metastásico.
- **Estadificación patológica (pTNM)**
- Hallazgos adicionales

**Si el patrón terciario es mayor que los otros dos y ocupa >5% del tumor, algunos patólogos -y así recomienda la publicación de la WHO 2016-, lo incorporan al score Gleason como patrón secundario.*

**CAP Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinoma of the Prostate Gland.*

Figura 13: **Datos del informe de prostatectomía radical de Anatomía Patológica.** Imagen obtenida de (12).

12.2 Imágenes del adenocarcinoma de próstata

- **Datos patognomónicos**

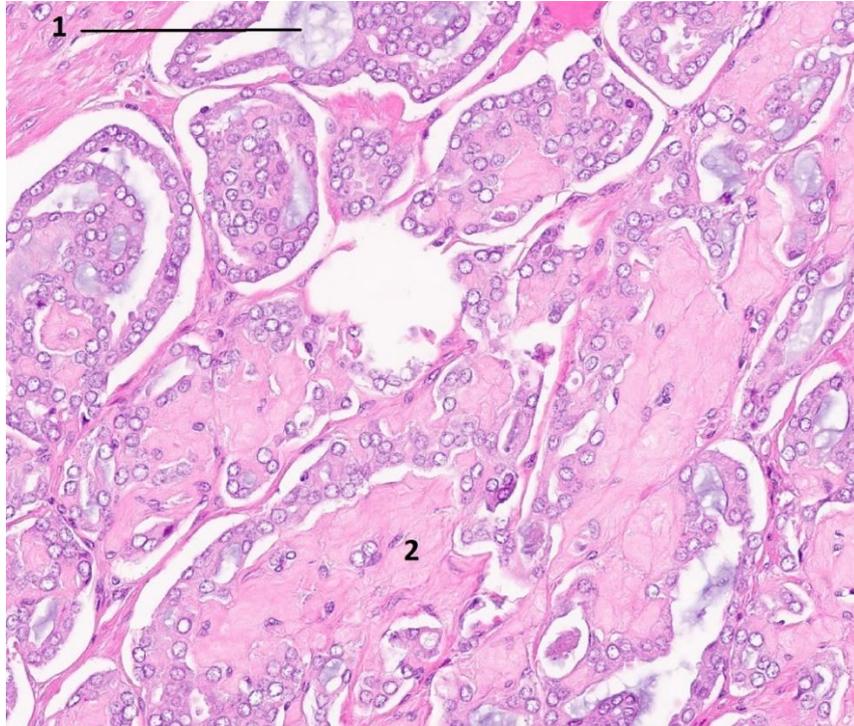


Figura 14: **Fibroplasia mucinosa (2)**. Porción de la imagen gradada como Gleason 3. También se aprecia, un dato no patognomónico, pero sugestivo de malignidad la presencia en el interior de la luz de mucina azul (1). Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 20x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

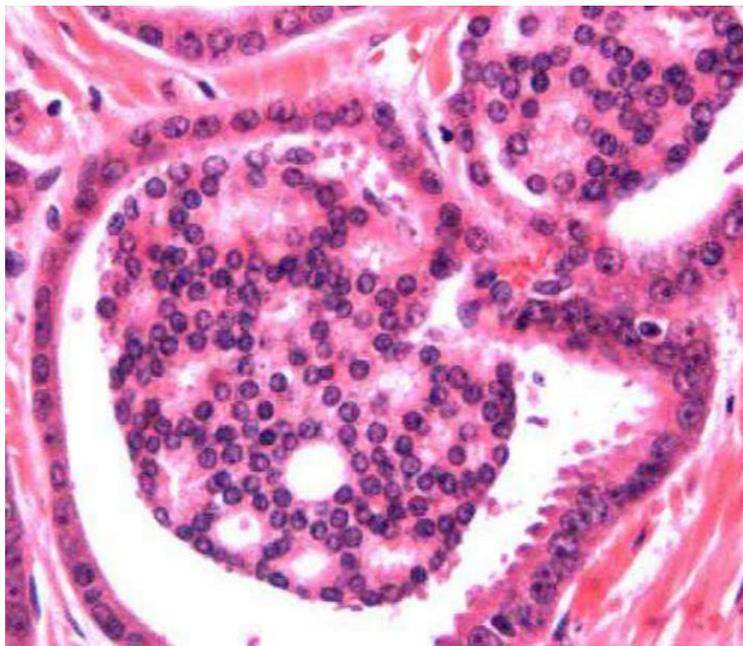


Figura 15: **Glándulas glomeruloides**. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 40x. Imagen obtenida en <https://www.seap.es/documents/10157/1432467/Algaba+-+SEAP+2016.pdf>

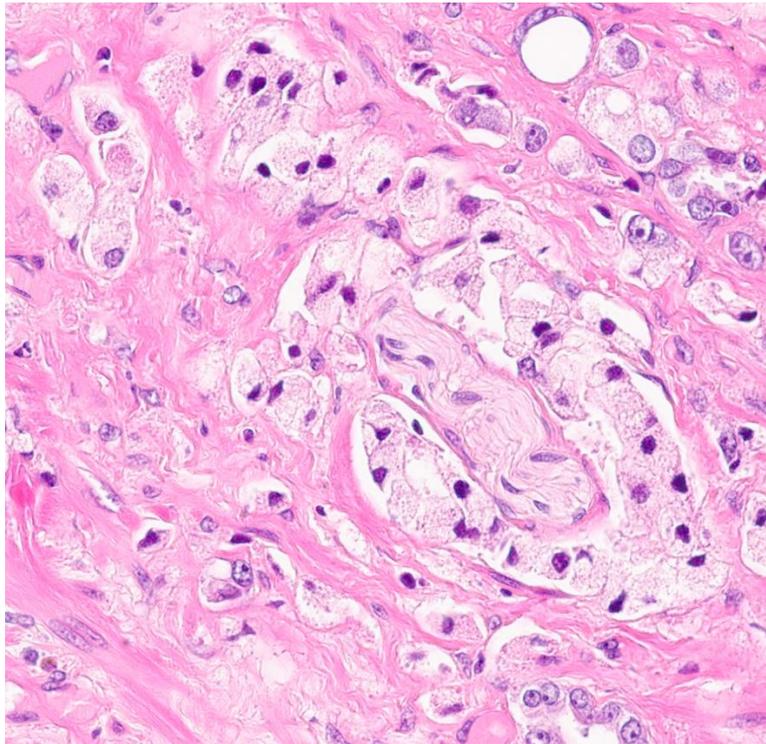


Figura 16: **Invasión perineural.** Las glándulas tumorales rodean completamente a la fibra nerviosa. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 40x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

- **Patrones de Gleason**

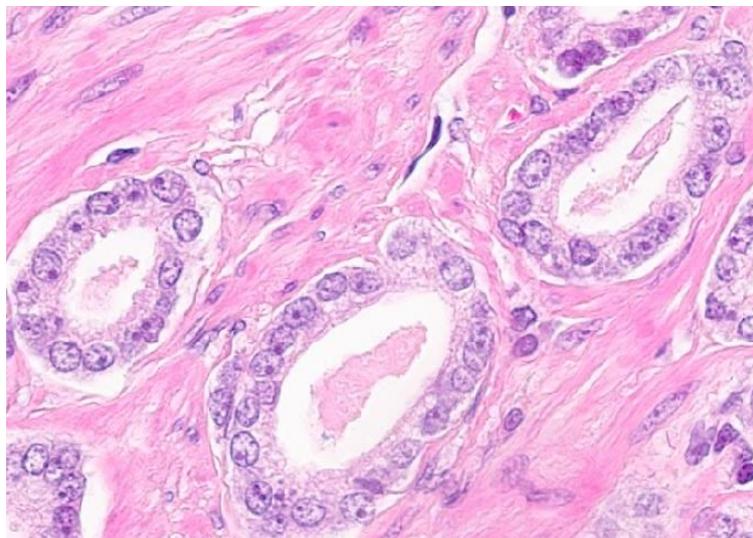


Figura 17: **Patrón de glándulas discretamente bien formadas (Gleason 3).** Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 20x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

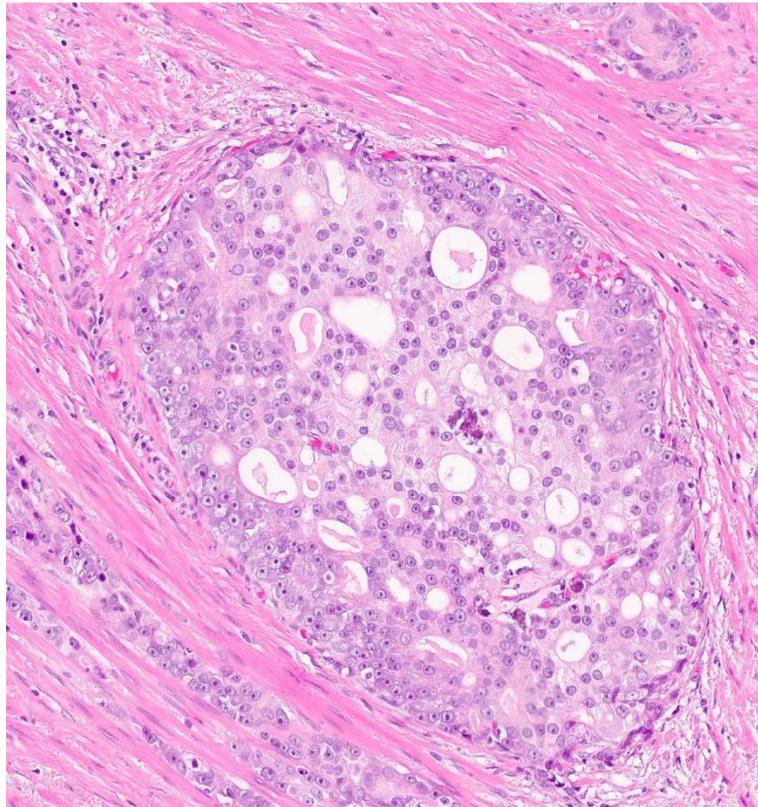


Figura 18: **Patrón criboso (Gleason 4)**. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 20x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

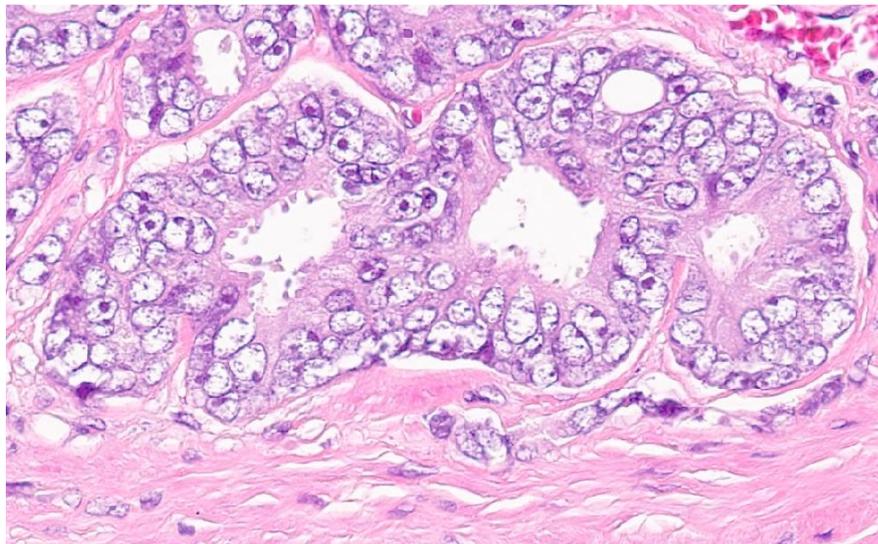


Figura 19: **Patrón de glándulas fusionadas (Gleason 4)**. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 40x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

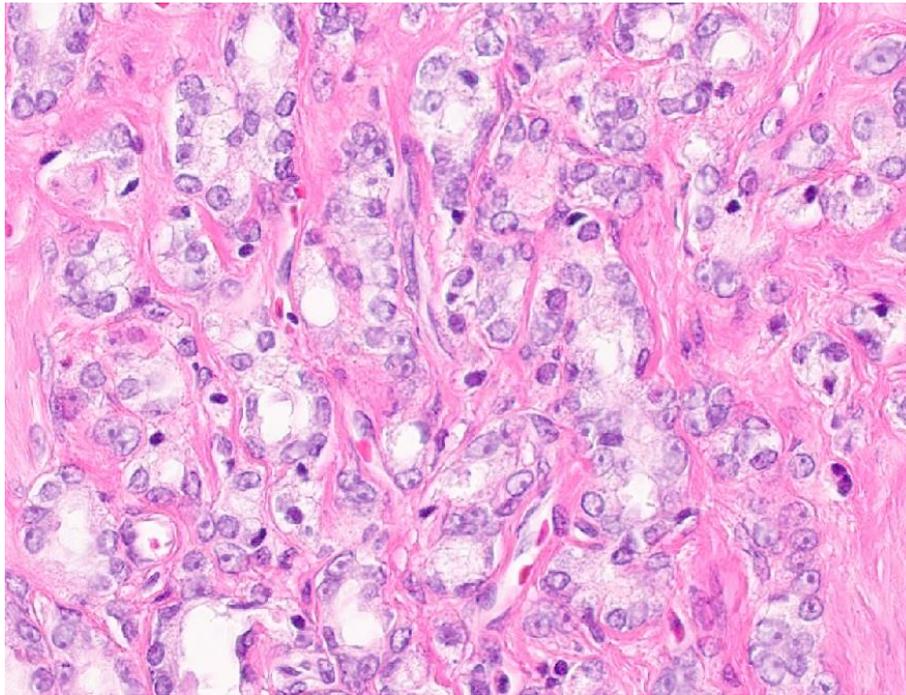


Figura 20: **Patrón de glándulas pobremente formada (Gleason 4)**. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 20x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

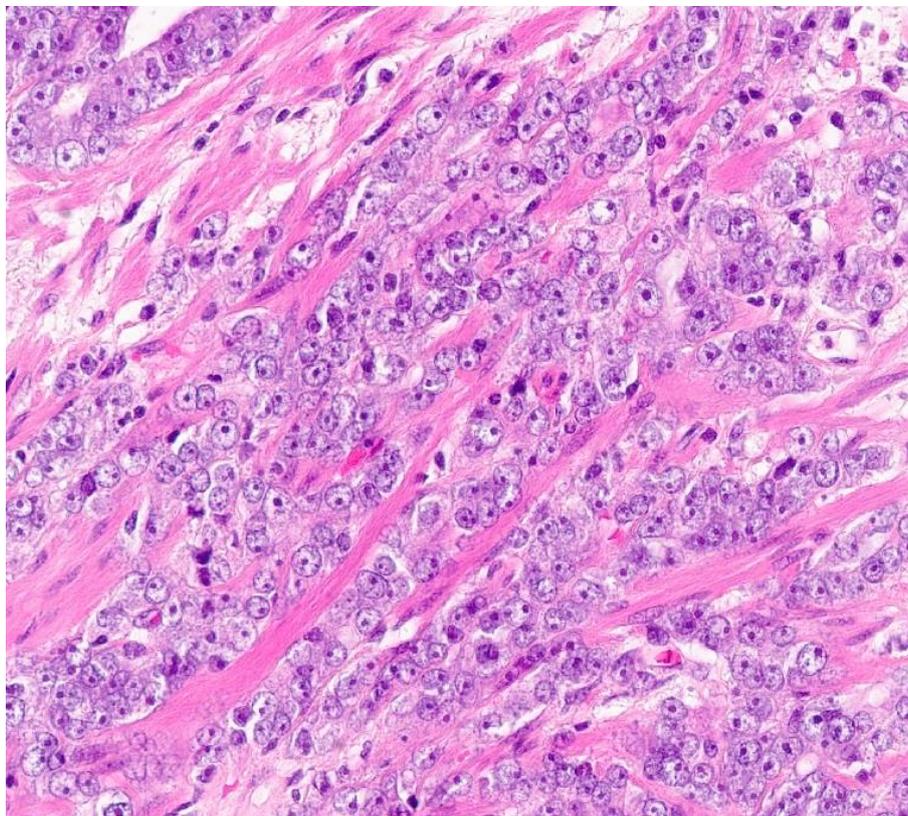


Figura 21: **Patrón de células en cordón (Gleason 5)**. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 20x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

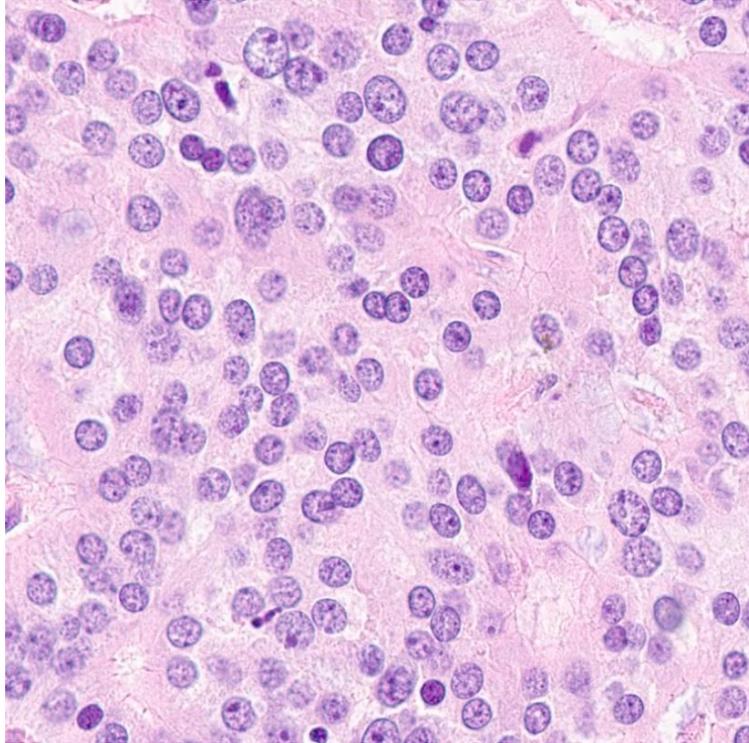


Figura 22: **Patrón de células en sabana (Gleason 5)**. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 40x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

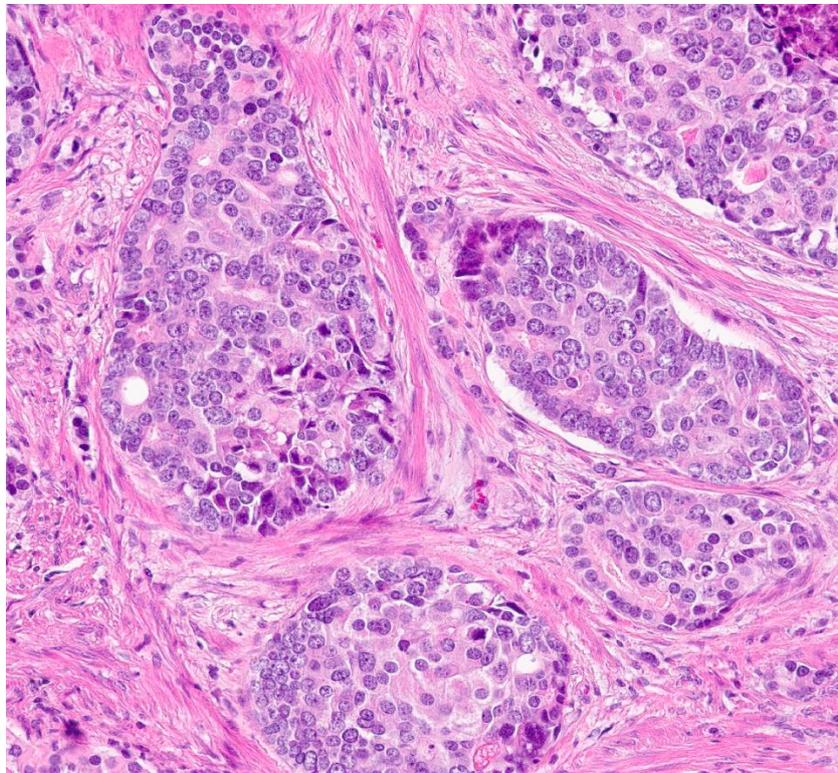


Figura 23: **Nidos sólidos (Gleason 5)**. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 10x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

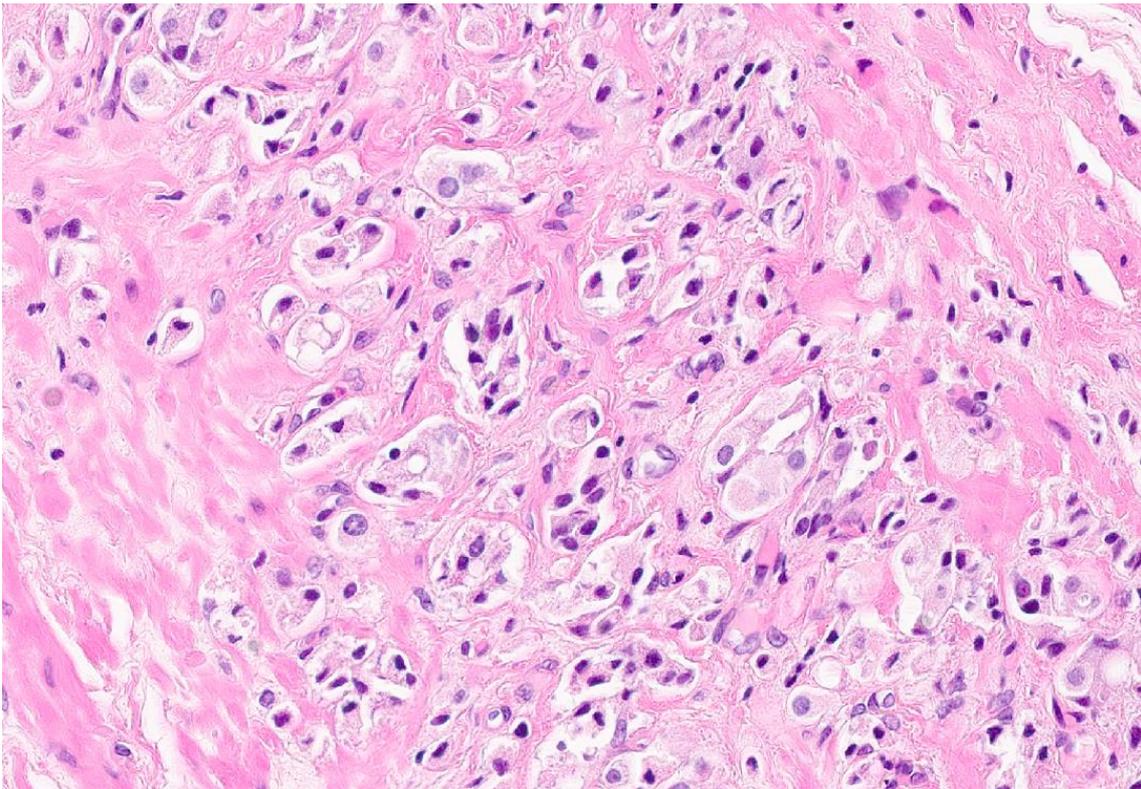


Figura 24: **Patrón en células sueltas (Gleason 5)**. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 20x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

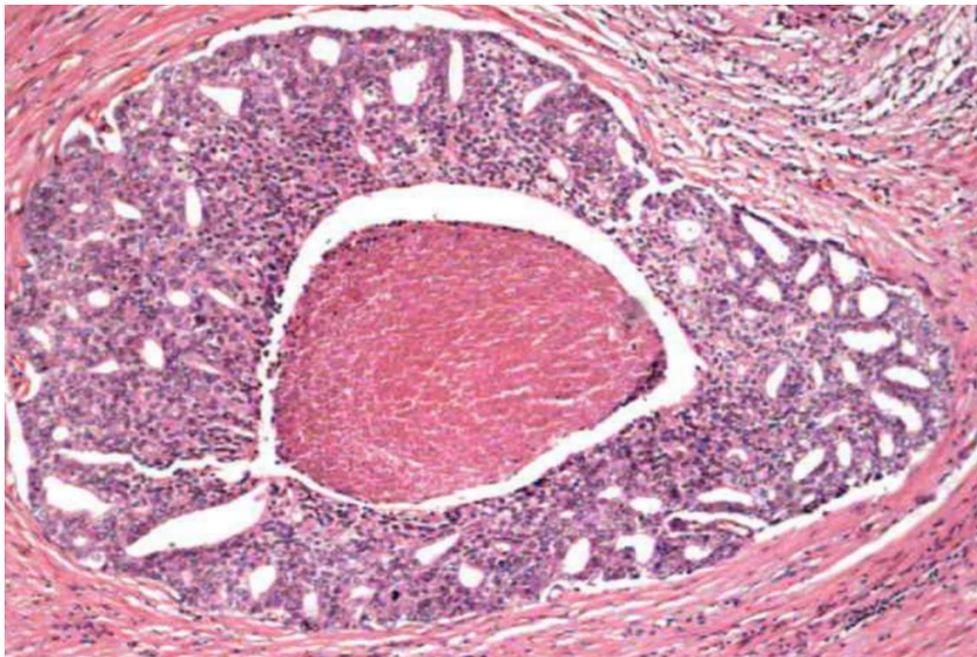


Figura 25: **Patrón necrosis central (Gleason 5)**. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 10x. Imagen obtenida en <https://www.seap.es/documents/10157/1432467/Algaba+-+SEAP+2016.pdf>

- **Otros**

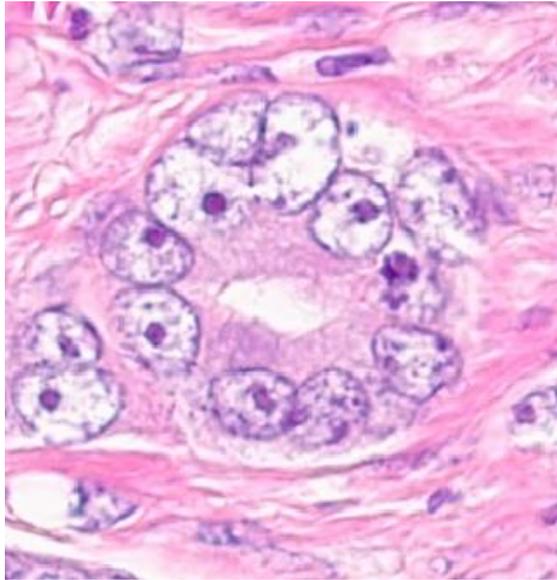


Figura 26: **Características de atipia nuclear.** Nucléolo prominente, aclaramiento de la paracomatina, agrandamiento nuclear. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 40x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

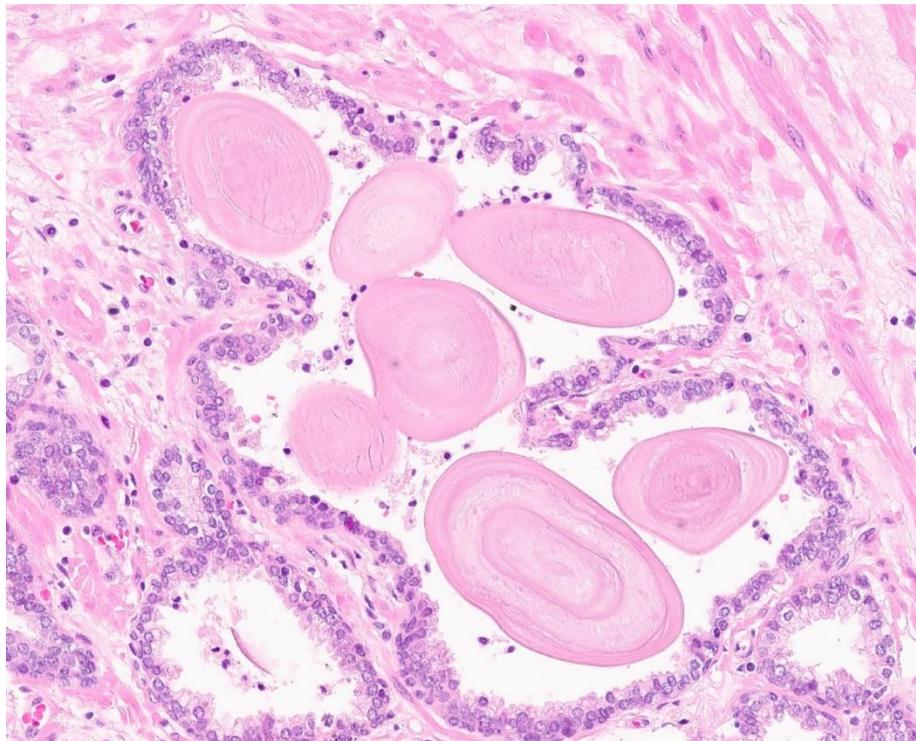


Figura 27: **Cuerpos amiláceos.** Cuando están presente son muy sugestivos de glándulas benignas. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 20x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

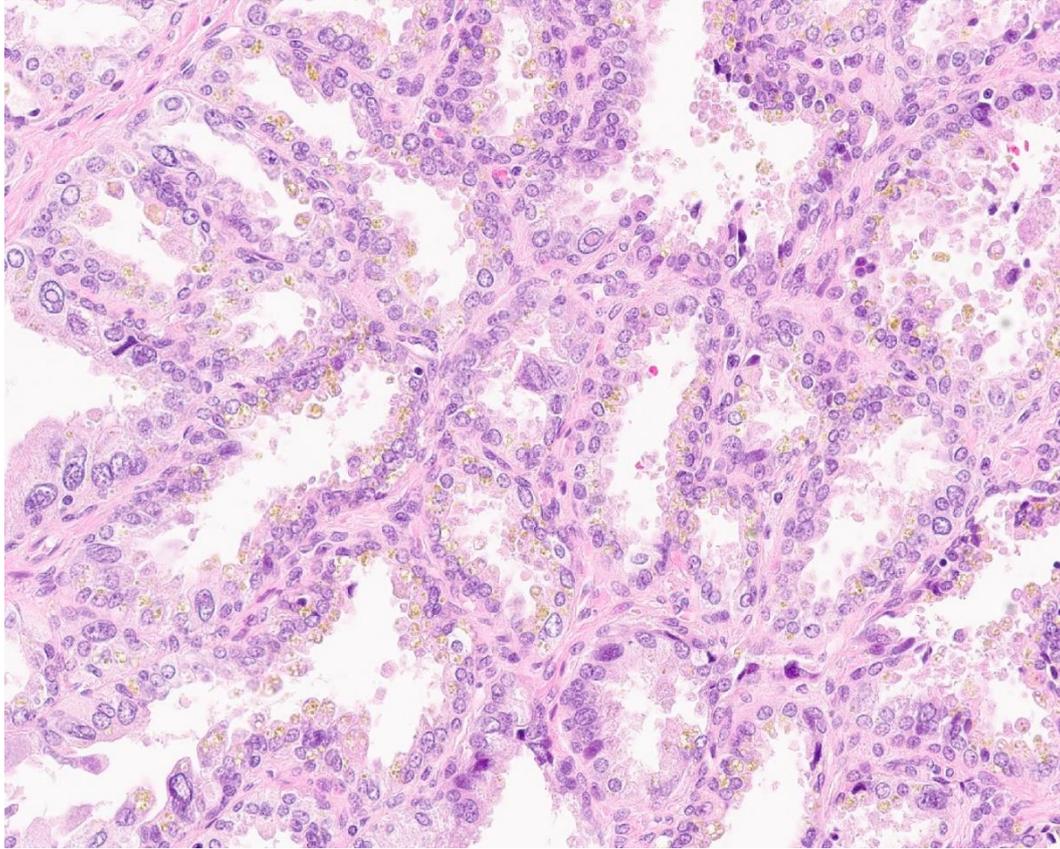


Figura 28: **Glándulas de la vesícula seminal.** Pigmento característico. Fotografía de microscopía óptica, tinción Hematoxilina Eosina (H&E) a 20x. Imagen obtenida en el servicio de anatomía patológica del HUMS.

13.ANEXO II: Clasificación TNM

Para el correcto manejo de cualquier patología oncológica, es necesaria una correcta estadificación, es decir, la combinación de pacientes con unas mismas características y que por lo tanto se beneficiaran de una similar actitud médica. Estas características de tipo clínico o patológico se recogen e la *figura 29*:

American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging System For Prostate Cancer (8th ed., 2017) Table 1. Definitions for T, N, M	
Clinical T (cT)	
T	Primary Tumor
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
T1	Clinically inapparent tumor that is not palpable
T1a	Tumor incidental histologic finding in 5% or less of tissue resected
T1b	Tumor incidental histologic finding in more than 5% of tissue resected
T1c	Tumor identified by needle biopsy found in one or both sides, but not palpable
T2	Tumor is palpable and confined within prostate
T2a	Tumor involves one-half of one side or less
T2b	Tumor involves more than one-half of one side but not both sides
T2c	Tumor involves both sides
T3	Extraprostatic tumor that is not fixed or does not invade adjacent structures
T3a	Extraprostatic extension (unilateral or bilateral)
T3b	Tumor invades seminal vesicle(s)
T4	Tumor is fixed or invades adjacent structures other than seminal vesicles such as external sphincter, rectum, bladder, levator muscles, and/or pelvic wall.
Pathological T (pT)	
T	Primary Tumor
T2	Organ confined
T3	Extraprostatic extension
T3a	Extraprostatic extension (unilateral or bilateral) or microscopic invasion of the bladder neck
T3b	Tumor invades seminal vesicle(s)
T4	Tumor is fixed or invades adjacent structures other than seminal vesicles such as external sphincter, rectum, bladder, levator muscles, and/or pelvic wall
*Note: There is no pathologic T1 classification.	
**Note: Positive surgical margin should be indicated by an R1 descriptor, indicating residual microscopic disease.	
N Regional Lymph Nodes	
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No positive regional nodes
N1	Metastases in regional node(s)
M Distant Metastasis	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis
M1a	Non-regional lymph node(s)
M1b	Bone(s)
M1c	Other site(s) with or without bone disease
*Note: When more than one site of metastasis is present, the most advanced category is used. M1c is most advanced.	

Figura 29: Clasificación TNM clínica y patológica. Imagen obtenida en (40).

Destacamos algunos datos importantes:

- Enfermedad localizada: T1-T2 (N- y M-).
- Enfermedad localmente avanzada: T3 (N- y M-).
- Enfermedad diseminada: cualquier T, con N+ o M+.
- Las metástasis más frecuentes son a hueso.

14.ANEXO III: Horario de escaneo

	LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES
Hora					
8-10	Escaneo	Escaneo	Escaneo	Escaneo	Escaneo/Repetir
10-12	Escaneo	Escaneo	Escaneo	Escaneo	Escaneo/Repetir
12-14	Escaneo	Escaneo	Escaneo	Escaneo	Escaneo/Repetir
14-16	Escaneo	Escaneo	Escaneo	Escaneo	Escaneo/Repetir
16-18	Escaneo	Escaneo	Escaneo	Escaneo	Escaneo/Repetir
18-20	Escaneo	D. externo (8 Casos)	Escaneo	D. externo (8 Casos)	D. externo (5 Casos)
20-22	Escaneo	Descanso	Escaneo	Escaneo/Repetir	Descanso
24-2	Escaneo	Descanso	Escaneo	Escaneo/Repetir	Descanso
2-4	Escaneo	Descanso	Escaneo	Escaneo/Repetir	Descanso
4-6	Escaneo	Descanso	Escaneo	Escaneo/Repetir	Descanso
6-8	Escaneo	Descanso	Escaneo	Escaneo/Repetir	Descanso

Tabla 11: Horario de escaneo.

15.ANEXO IV: Aprobación del CEICA

 <p>GOBIERNO DE ARAGON Departamento de Sanidad</p>	<p>Informe Dictamen Favorable Trabajos académicos C.P. - C.I. PI18/121 23 de mayo de 2018</p>
<p>Dña. María González Hincos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)</p>	
<p>CERTIFICA</p>	
<p>1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 23/05/2018, Acta Nº 10/2018 ha evaluado la propuesta del Trabajo:</p>	
<p>Título: Cuantificación Automática de Patrones de Gleason en el Adenocarcinoma de Próstata.</p>	
<p>Alumno: Alejandro Garzón Arana Director: Ángel Borque Fernando</p>	
<p>Versión protocolo: v2, 18 de abril de 2018</p>	
<p>2º. Considera que</p> <ul style="list-style-type: none">- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables.- El Tutor/Director garantiza la confidencialidad de la información, el adecuado tratamiento de los datos en cumplimiento de la legislación vigente y la correcta utilización de los recursos materiales necesarios para su realización.	
<p>3º. Por lo que este CEIC emite DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.</p>	
<p>Lo que firmo en Zaragoza</p>	
<p>GONZALEZ HINJOS MARIA - DNI 03857456B DNI 03857456B</p>	
<p>Firmado digitalmente por GONZALEZ HINJOS MARIA - DNI 03857456B Fecha: 2018.05.28 16:38:38 +02'00'</p>	
<p>María González Hincos Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)</p>	
<p>Tel. 976 71 48 57 Fax. 976 71 55 54 Correo electrónico mgonzalezh.ceic@aragon.es</p>	
<p>Página 1 de 1</p>	

Figura 30: Dictamen favorable del CEICA.