

# Validación de un método de análisis de imagen digital para cuantificar tinción citoplasmática por inmunohistoquímica en tumores hipofisarios

<sup>1</sup>Bravo MR, <sup>1</sup>Faure EE, <sup>1</sup>Sosa LDV

<sup>1</sup>Centro de Microscopía Electrónica – INICSA - CONICET - Facultad de Ciencias Médicas - UNC

**Persona que presenta:** Bravo MR, melina.bravo@unc.edu.ar **Área:** Básica **Disciplina:** Otra **Resumen:**

La evaluación visual de la tinción citoplasmática por inmunohistoquímica (IHQ) realizada por patólogos muestra alta variabilidad, es subjetiva, consume tiempo y provee datos cualitativos o semicuantitativos. Además, en muestras de tumores hipofisarios se suman desafíos debido al reducido tamaño, presencia de coágulos y desgarramientos del tejido, por la extracción quirúrgica transesfenoidal, lo que dificulta la identificación de células individuales, necesaria para métodos visuales. Los métodos de análisis digital que se basan en la detección de las intensidades de los píxeles del cromógeno mejoran la detección de tinciones débiles y producen datos continuos en lugar de cualitativos. El objetivo fue validar un método de análisis de imagen digital para cuantificar tinción citoplasmática por IHQ en tumores hipofisarios.

Micrografías de secciones de tejido de tumores hipofisarios, con IHQ para FGFR1 reveladas con DAB (marca citoplasmática) fueron analizadas. Los criterios de evaluación de la tinción IHQ se establecieron junto con una patóloga, quien realizó tres evaluaciones visuales con un intervalo de dos semanas, clasificando la expresión del biomarcador en nula, débil, moderada o alta. La cuantificación digital fue realizada por dos observadores de manera independiente mediante ImageJ (plugin IHC-Toolbox), generando un archivo con un histograma para conservar píxeles positivos. Se evaluó la variabilidad intra-observador del método visual mediante la prueba de Kappa-Fleiss ( $\kappa$ ) y la inter-observador del método digital con el Coeficiente de Correlación Intraclass (ICC). Se empleó ANOVA-Tukey para verificar la capacidad del método digital de distinguir entre las categorías del método visual. Para establecer rangos del método digital, se definieron puntos de corte mediante análisis exploratorio y validados con índice Youden (J).

La concordancia intra-observador del método visual fue moderada/alta (expresión nula,  $\kappa=0,96$ ; débil,  $\kappa=0,76$ ; intermedia,  $\kappa=0,65$ ; alta,  $\kappa=0,87$ ). El análisis digital mostró concordancia inter-observador buena (ICC=0,95). El método digital pudo diferenciar entre las categorías cualitativas ( $p<0,05$ ), estableciéndose los rangos de expresión nula ([0-20), J=0,98); débil ([20-60), J=0,80); moderada ([60-90), J=0,72) y fuerte ( $\geq 90$ , J=0,76).

La cuantificación digital, de la tinción citoplasmática por IHQ, podría ser una alternativa rápida, precisa y reproducible. La misma se correlaciona con la categorización del patólogo y permite la conversión de datos cualitativos a cuantitativos.

**Palabras Clave:** Inmunohistoquímica; Procesamiento Digital de Imágenes; Evaluación Cuantitativa  [Versión para impresión](#) |  [PDF version](#)

**Abstract #1761**

## Validation of a Digital Image Analysis Method to Quantify Immunohistochemistry Cytoplasmic Staining in Pituitary Tumors

<sup>1</sup>Bravo MR, <sup>1</sup>Faure EE, <sup>1</sup>Sosa LDV

<sup>1</sup>Centro de Microscopía Electrónica – INICSA - CONICET - Facultad de Ciencias Médicas - UNC

**Persona que presenta:** Bravo MR, melina.bravo@unc.edu.ar **Abstract:**

The visual assessment of cytoplasmic staining by immunohistochemistry (IHC) from pathologists shows high variability, is subjective, time-consuming, and provides qualitative or semi-quantitative data. Additionally, pituitary tumor samples are challenging due to their small size, the presence of blood clots, and tissue damage resulting from transsphenoidal surgical extraction, making it difficult to identify individual cells, which is necessary for visual methods. Digital analysis methods based on detecting chromogen pixel intensities improve the detection of weak staining and produce continuous data. The objective was to validate a digital image analysis method to quantify cytoplasmic staining by IHC in pituitary tumors.

Micrographs of pituitary tumor tissue sections, with IHC for FGFR1 using DAB as a chromogen (cytoplasmic staining), were analyzed. The criteria for evaluating IHC staining were established in collaboration with a pathologist, who performed three visual assessments at two-week intervals, classifying biomarker expression as null, weak, moderate, or high. Digital quantification was performed independently by two observers using ImageJ (IHC-Toolbox plugin), generating a file with a histogram with positive pixels. To evaluate the intra-observer variability of the visual method and the inter-observer variability of the digital method, the Kappa-Fleiss test ( $\kappa$ ) and the Intraclass Correlation Coefficient (ICC) were carried out, respectively. ANOVA-Tukey was used to verify the capacity of the digital method to distinguish between the categories of the visual method. To establish ranges for the digital method, cutoff points were defined through exploratory analysis and validated with the Youden index (J).

The intra-observer agreement of the visual method was moderate/high (null expression,  $\kappa=0.96$ ; weak expression,  $\kappa=0.76$ ; intermediate expression,  $\kappa=0.65$ ; high expression,  $\kappa=0.87$ ). The digital analysis showed good inter-observer agreement (ICC=0.95). The digital method was able to differentiate between the qualitative categories ( $p<0.05$ ), establishing biomarker expression ranges as null ([0-20), J=0.98); weak ([20-60), J=0.80); moderate ([60-90), J=0.72); and strong ( $\geq 90$ , J=0.76).

Digital quantification of IHC cytoplasmic staining could be a rapid, accurate, and reproducible alternative method. It correlates with the pathologist categorization and allows the conversion of qualitative data into quantitative data.

**Keywords:** Immunohistochemistry; Digital Image Processing; Quantitative Evaluation