



Predicción de inestabilidad de microsatélites en cáncer colorrectal a partir de hematoxilina-eosina (**xDEEP-MSI**)

Cristina Alenda González

Hospital General Universitario Dr Balmis (Alicante)

alenda_cri@gva.es



Servicio de Anatomía Patológica HGU Dr. Balmis

- 10 patólogos, 7 MIR, 16 TSAP, 3 administrativos
- Actividad: 29.000 biopsias y 16.000 citologías

¿Cómo surgió la idea?

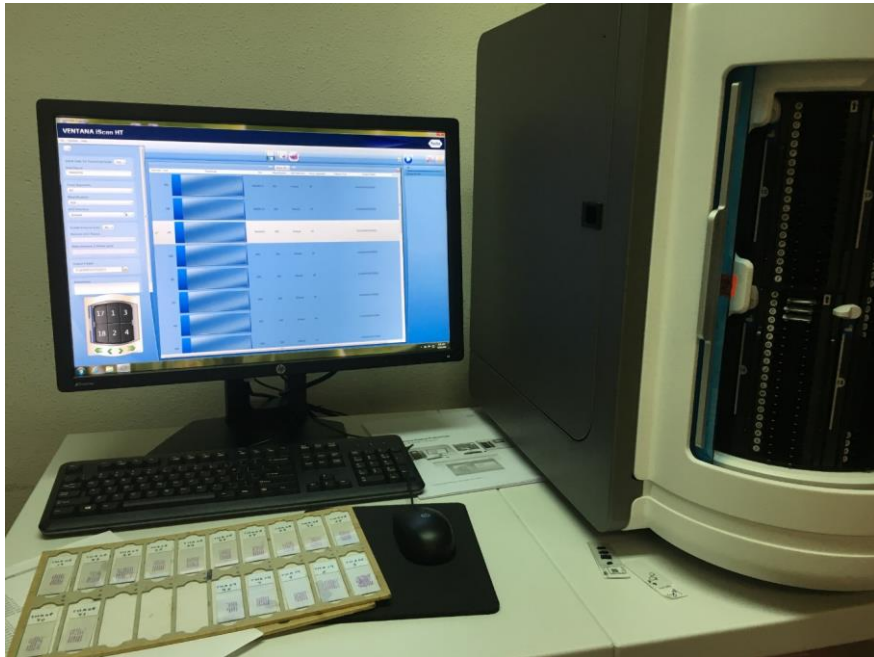
Andrés Torrubia. Ingeniero de Telecomunicaciones, experto en IA



Aurelia Bustos. Oncóloga Médica e Ingeniera Informática, con doctorado en IA y aprendizaje profundo

¿Qué podíamos aportar nosotros?

- **Artemio Payá y Cristina Alenda.** Patólogos con experiencia en investigación en cáncer colorrectal
- Series EPICOLON I y EPICOLON II: dos proyectos multicéntricos con **2000 pacientes con cáncer colorrectal (CCR)** de 25 hospitales
- Un escáner







¿Qué hipótesis nos planteamos?

A partir de imágenes digitalizadas de carcinoma colorrectal teñidas con H&E se puede predecir el perfil molecular de los tumores

Nos animamos a pedir un proyecto en la convocatoria Desarrollo Tecnológico en Salud (DTS) del **ISCIII** que nos concedieron:

DTS2019/0178: Predicción pronóstica y de perfil molecular de carcinomas colorrectales mediante tecnología de inteligencia artificial a partir de imágenes tumorales digitalizadas. 66.000€

			Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación		2019
Expediente N°					
INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Cristina Alenda González					
MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD					
SECCIÓN OBJETIVOS					
(Ajustese al espacio disponible)					
<p>Las técnicas de Inteligencia Artificial (IA), basadas en aprendizaje profundo, están consiguiendo resultados prometedores en el campo biomédico. En algunas especialidades como Dermatología, Radiología y Anatomía Patológica, donde la imagen es el centro del diagnóstico, se están desarrollando modelos de predicción y de reconocimiento de patrones, a veces con mayor precisión que especialistas cualificados. En el campo de la Patología Computacional, la riqueza de las imágenes microscópicas ofrece infinidad de atributos, imperceptibles por el ojo humano, que pueden ser explotadas con técnicas de IA.</p>					
<p>Las hipótesis que planteamos para este trabajo son dos:</p> <ul style="list-style-type: none">- A partir de imágenes digitalizadas de CCR teñidas con H&E se puede predecir el perfil molecular de los tumores, es decir, las mutaciones asociadas y que definen a cada tipo tumoral.- A partir de imágenes digitalizadas de CCR teñidas con H&E se puede predecir la supervivencia de los pacientes.					
<p>Objetivos principales:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Desarrollar un modelo de predicción basado en Inteligencia Artificial a partir de imágenes microscópicas digitalizadas de carcinoma colorrectal (serie EPICOLON I, 1200 pacientes).<ol style="list-style-type: none">1.1. Predecir el perfil molecular del tumor (KRAS, NRAS, BRAF, metilación MLH1, metilación CIMP, IMS, alteraciones proteínas reparadoras, mutación germinal genes reparadores).1.2. Predecir la supervivencia (global y libre de enfermedad) de los pacientes con CCR.2. Validar el modelo en una segunda serie de CCR (EPICOLON II, 800 pacientes).					
<p>Objetivo secundario:</p> <p>Determinar la explicabilidad del modelo, es decir, tratar de identificar qué parámetros morfológicos ha utilizado el modelo para establecer la predicción.</p>					

Objetivos del proyecto

Predecir el estado de **inestabilidad de microsatélites (IMS)** a partir de imágenes microscópicas digitalizadas.

 GOBIERNO DE ESPAÑA	 MINISTERIO DE CIENCIA, INNOVACIÓN Y UNIVERSIDADES	 Instituto de Salud Carlos III	Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación	 Unión Europea Fondo Europeo de Desarrollo Regional "Una manera de hacer Europa"	2019
Expediente Nº					
INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Cristina Alenda González					
MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO EN SALUD					
SECCIÓN OBJETIVOS					
(Ajustese al espacio disponible)					
<p>Las técnicas de Inteligencia Artificial (IA), basadas en aprendizaje profundo, están consiguiendo resultados prometedores en el campo biomédico. En algunas especialidades como Dermatología, Radiología y Anatomía Patológica, donde la imagen es el centro del diagnóstico, se están desarrollando modelos de predicción y de reconocimiento de patrones, a veces con mayor precisión que especialistas cualificados. En el campo de la Patología Computacional, la riqueza de las imágenes microscópicas ofrece infinidad de atributos, imperceptibles por el ojo humano, que pueden ser explotadas con técnicas de IA.</p>					
<p>Las hipótesis que planteamos para este trabajo son dos:</p> <ul style="list-style-type: none">- A partir de imágenes digitalizadas de CCR teñidas con H&E se puede predecir el perfil molecular de los tumores, es decir, las mutaciones asociadas y que definen a cada tipo tumoral.- A partir de imágenes digitalizadas de CCR teñidas con H&E se puede predecir la supervivencia de los pacientes.					
<p>Objetivos principales:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Desarrollar un modelo de predicción basado en Inteligencia Artificial a partir de imágenes microscópicas digitalizadas de carcinoma colorrectal (serie EPICOLON I, 1200 pacientes).<ol style="list-style-type: none">1.1. Predecir el perfil molecular del tumor (KRAS, NRAS, BRAF, metilación MLH1, metilación CIMP, IMS, alteraciones proteínas reparadoras, mutación germinal genes reparadores).1.2. Predecir la supervivencia (global y libre de enfermedad) de los pacientes con CCR.2. Validar el modelo en una segunda serie de CCR (EPICOLON II, 800 pacientes).					
<p>Objetivo secundario:</p> <p>Determinar la explicabilidad del modelo, es decir, tratar de identificar qué parámetros morfológicos ha utilizado el modelo para establecer la predicción.</p>					

Proyectos EPICOLON I y EPICOLON II

- Proyectos multicéntricos (25 hospitales) de población no seleccionada con CCR: 1200 y 800 pacientes (2.000 pacientes)
- **Objetivo:** determinar la prevalencia de síndrome de Lynch en España y la susceptibilidad genética
- Principales resultados: Sd Lynch 2%, MMR 7,4%

CCR HGU Alicante

- 283 pacientes



57 TMAs
2 punch 1 mm por caso

ORIGINAL CONTRIBUTION

Accuracy of Revised Bethesda Guidelines, Microsatellite Instability, and Immunohistochemistry for the Identification of Patients With Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer

Virginia Piñol, MD
Antoni Castells, MD
Montserrat Andreu, MD
Sergi Castellvi-Bel, PhD
Cristina Alenda, MD
Xavier Llor, MD
Rosa M. Xicola, PhD
Francisco Rodríguez-Moranta, MD
Artemio Payá, MD
Rodrigo Jover, MD
Xavier Bessa, MD
for the Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association

HEREDITARY NONPOLYPOSIS COLORECTAL CANCER (HNPCC), also named Lynch syndrome, is an autosomal dominant disorder that accounts for approximately 1% to 3% of all colorectal cancers.^{1,2} HNPCC is caused by germline mutations in DNA mismatch repair genes, mainly MSH2 and MLH1.³ Defects on this pathway lead to changes in the length of nucleotide repeat sequences of tumor DNA, termed microsatellite instability.

Although a great advance in the understanding of the molecular basis of HNPCC has taken place in the last decade, optimal selection of individuals for HNPCC genetic testing remains controversial.⁴ In 1991, the International

Context The selection of individuals for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) genetic testing is challenging. Recently, the National Cancer Institute outlined a new set of recommendations, the revised Bethesda guidelines, for the identification of individuals with HNPCC who should be tested for microsatellite instability.

Objective To establish the most effective and efficient strategy for the detection of MSH2/MLH1 gene carriers.

Design, Setting, and Patients A prospective, multicenter, nationwide study (the EPICOLON study) in 20 hospitals in the general community in Spain of 1222 patients with newly diagnosed colorectal cancer between November 1, 2000, and October 31, 2001.

Interventions Microsatellite instability testing and MSH2/MLH1 immunostaining in all patients regardless of age, personal or family history, and tumor characteristics. Patients whose tumors exhibited microsatellite instability and/or lack of protein expression underwent MSH2/MLH1 germline testing.

Main Outcome Measures Effectiveness and efficiency of both microsatellite instability testing and immunostaining, either directly or previous selection of patients according to the revised Bethesda guidelines, were evaluated with respect to the presence of MSH2/MLH1 germline mutations.

Results Two hundred eighty-seven patients (23.5%) fulfilled the revised Bethesda guidelines. Ninety-one patients (7.4%) had a mismatch repair deficiency, with tumors exhibiting either microsatellite instability (n=83) or loss of protein expression (n=81). Germline testing identified 11 mutations (0.9%) in either MSH2 (7 cases) or MLH1 (4 cases) genes. Strategies based on either microsatellite instability testing or immunostaining previous selection of patients according to the revised Bethesda guidelines were the most effective (sensitivity, 81.8% and 81.8%; specificity, 98.0% and 98.2%; positive predictive value, 27.3% and 29.0%, respectively) to identify MSH2/MLH1 gene carriers. Logistic regression analysis confirmed the revised Bethesda guidelines as the most discriminating set of clinical parameters (odds ratio, 33.3; 95% confidence interval, 4.3-250; P=.001).

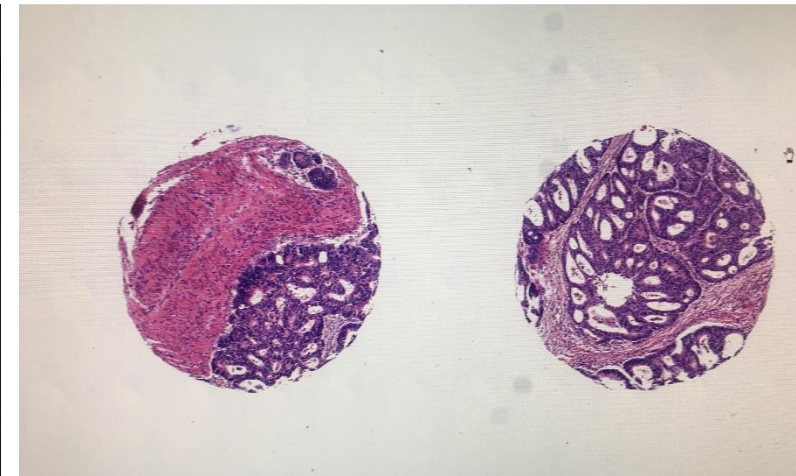
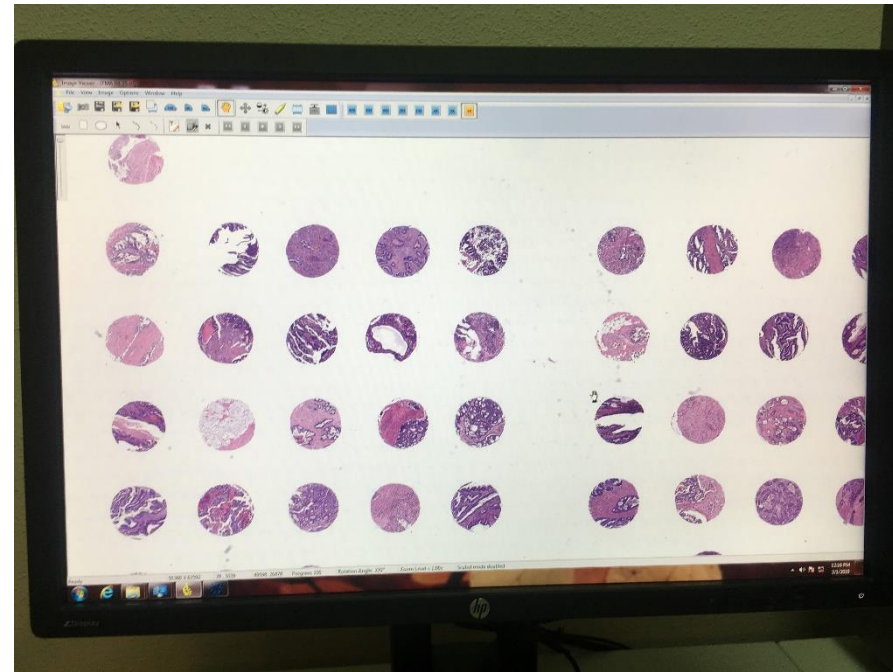
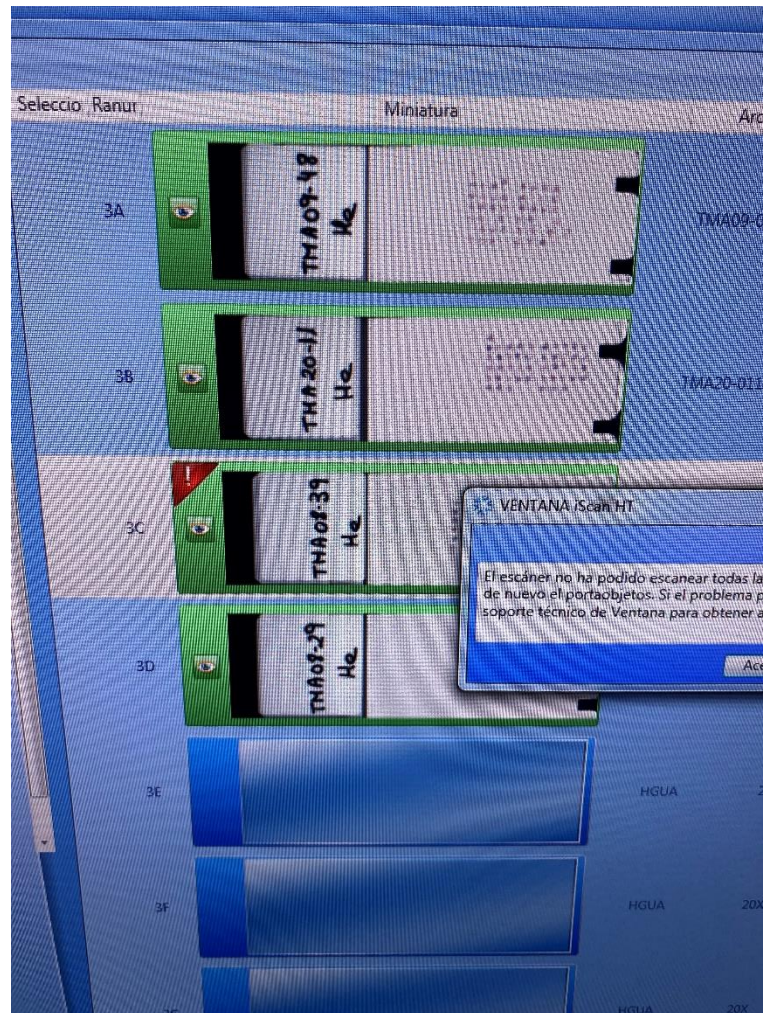
Conclusion The revised Bethesda guidelines constitute a useful approach to identify patients at risk for HNPCC. In patients fulfilling these criteria, both microsatellite instability testing and immunostaining are equivalent and highly effective strategies to further select those patients who should be tested for MSH2/MLH1 germline mutations.

Author Affiliations: Department of Gastroenterology, Institut de Malalties Digestives, Hospital Clinic, Institut d'Investigadors Biomèdics August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona (Drs Piñol, Castells, Castellvi-Bel, and Rodríguez-Moranta); Department of Gastroenterology, Hospital del Mar, Barcelona (Drs Andreu and Bessa); Departments of Pathology (Drs Alenda and Payá) and Gastroenterology (Dr Jover), Hospital General Universitario de Alicante, Alicante; and Department of Gastroenterology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona (Drs Llor and Xicola), Spain. The Gastrointestinal Oncology Group members are listed at the end of this article.

Corresponding Author: Antoni Castells, MD, Department of Gastroenterology, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain (castells@clinic.ub.es).

1986 JAMA, April 27, 2005—Vol 293, No. 16 (Reprinted) ©2005 American Medical Association. All rights reserved.

Desarrollo del proyecto: **DIGITALIZACIÓN**



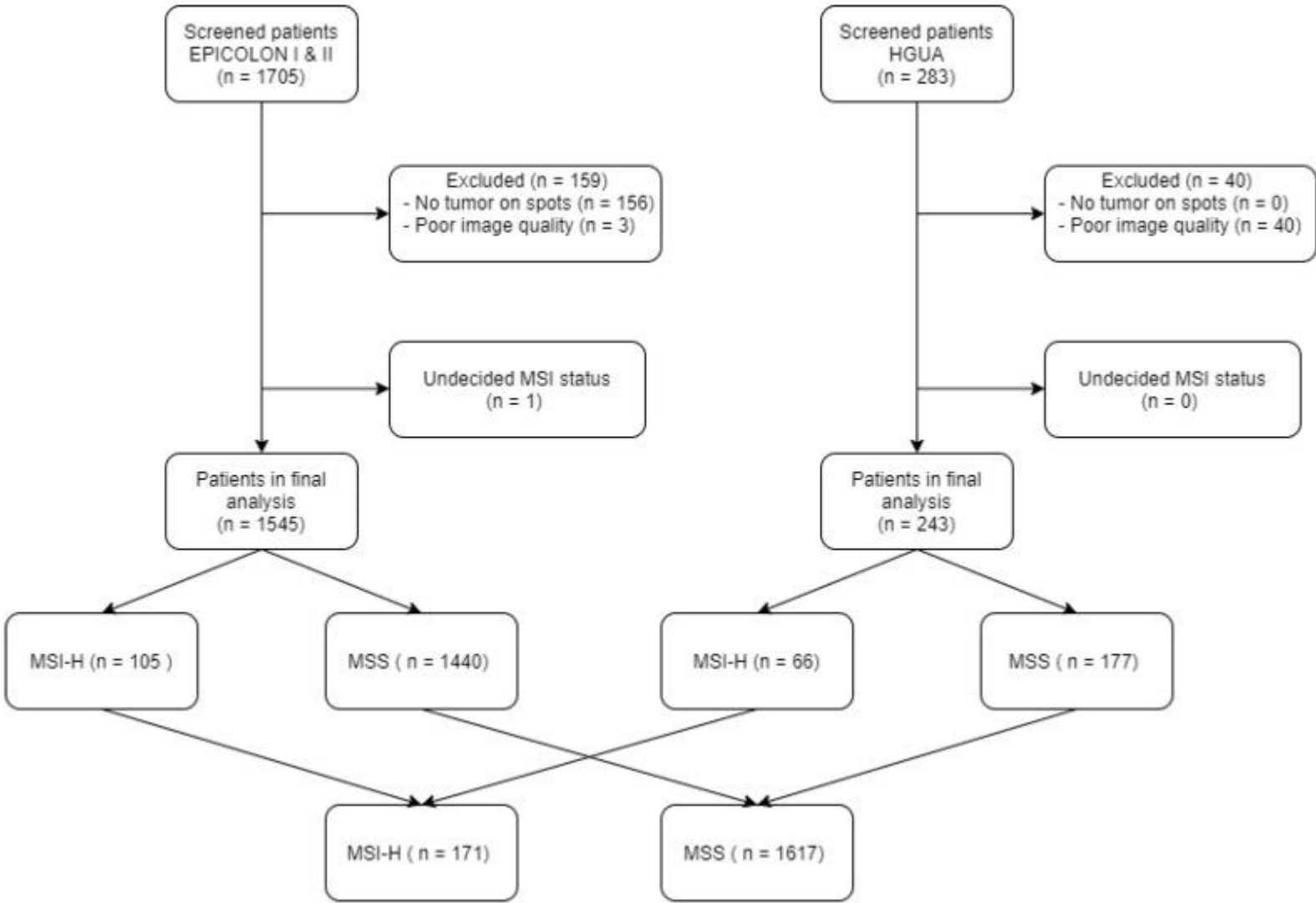
Imágenes en formato TIF 40x, resolución 0.25 microns per pixel (MPP).

Desarrollo del proyecto: ANÁLISIS DE IMÁGENES (QuPATH)

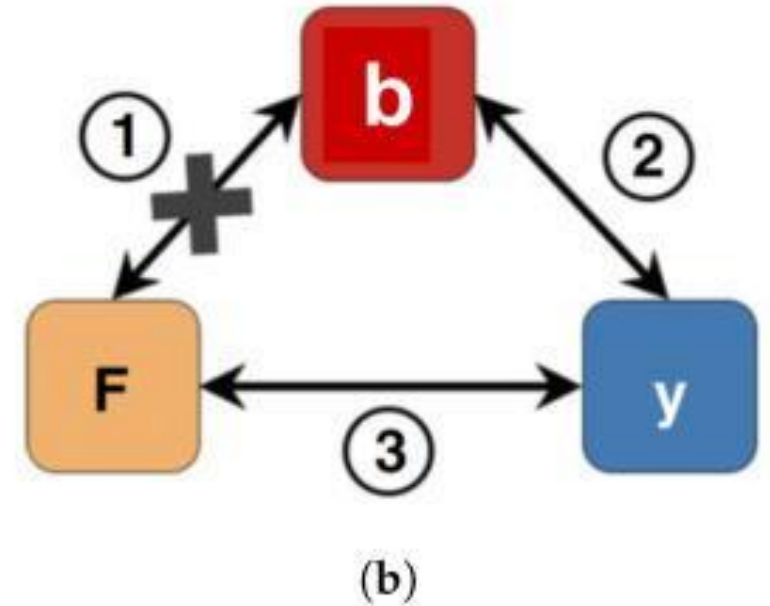
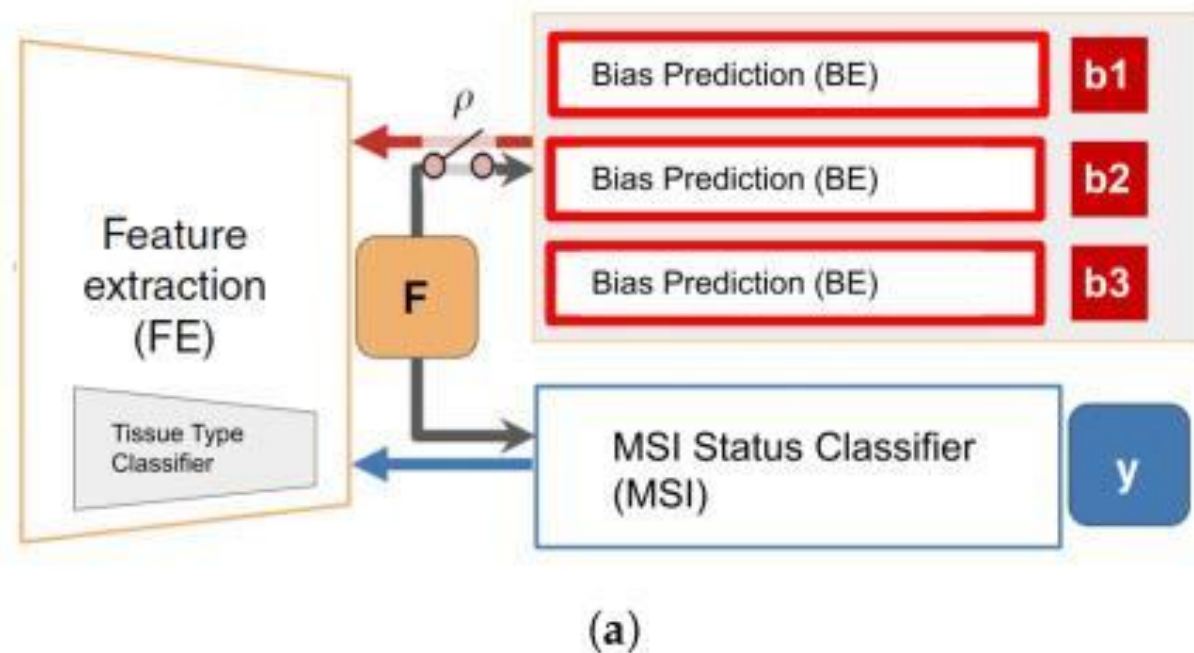
The screenshot displays the QuPath software interface for histology image analysis. The main workspace shows a grid of tissue cores with zoomed-in views of several cores. A sidebar on the left lists the image IDs. A 400µm scale bar is present at the bottom left. A data table at the bottom right provides coordinates for a specific core.

Core	X (µm)	Y (µm)	Z
Core: 7-E	11851.24	15109.83	226, 221, 229

Desarrollo del proyecto. FILTRADO DE CASOS



Desarrollo del proyecto: DEEP LEARNING ARCHITECTURE

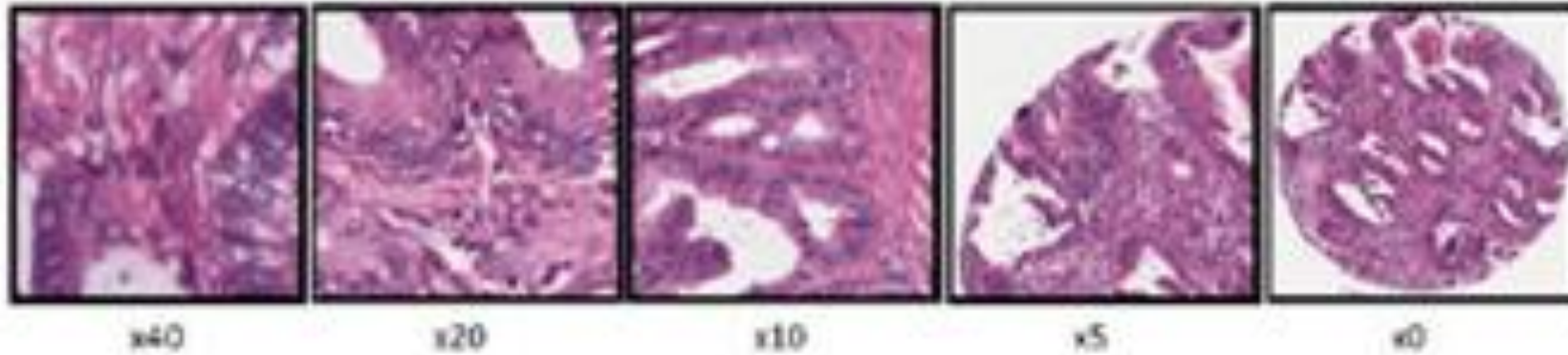


La arquitectura de aprendizaje profundo (**Deep Learning, DL**) consistía en un sistema de extremo a extremo (END-TO-END) que vinculaba tres tipos de módulos:

- Un clasificador de **tejidos**
- Un sistema de identificación y ablación de **sesgos**
- El clasificador del estado **IMS**

Desarrollo del proyecto: MÓDULO PRE-PROCESADO DE IMAGEN

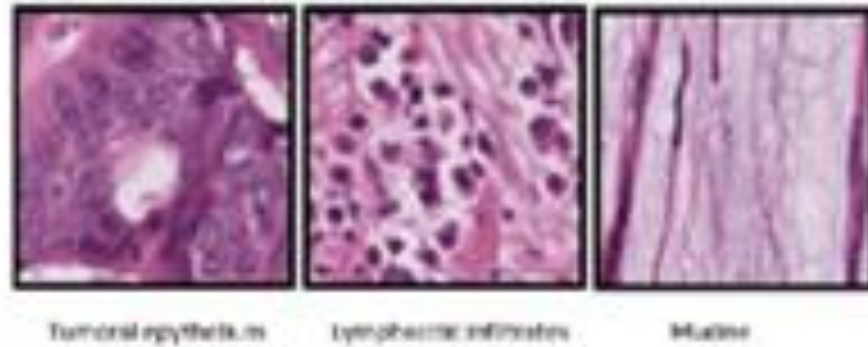
Se implantó un módulo de pre-procesado de imagen mediante el cual, **de cada spot del TMA**, se extrajeron **imágenes de 224 x 224 pixels** correspondientes a regiones adyacentes a diferentes aumentos



Desarrollo del proyecto: MÓDULO PRE-PROCESADO DE IMAGEN

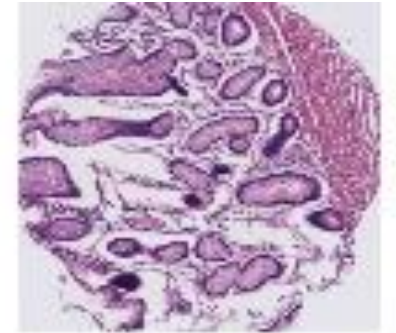
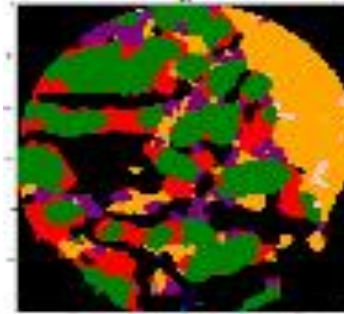
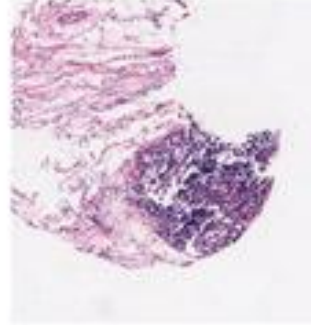
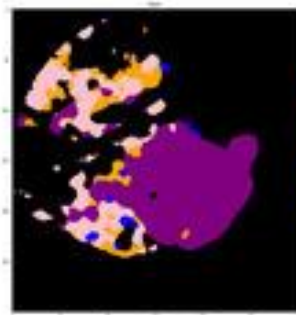
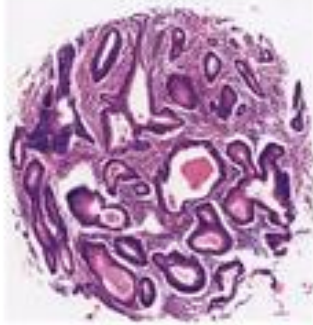
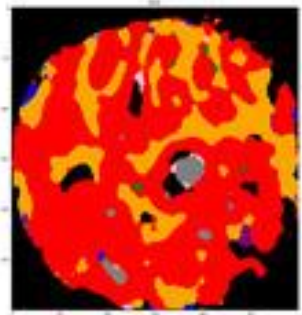
Se **filtraron los spots** sin tejido viable o no aptos para diagnóstico y finalmente se generaron **100.000 imágenes no superpuestas** que se etiquetaron con **9 tipos de tejido**:

- Tejido adiposo (ADI)
- Fondo sin tejido (BACK)
- Debrids (DEB)
- Linfocitos (LYM)
- Moco (MUC)
- Músculo (MUS)
- Mucosa normal (NORM)
- Estroma (STR)
- Adenocarcinoma (TUM)



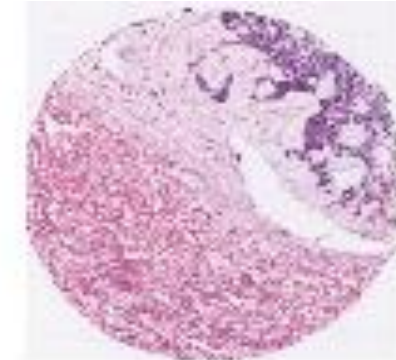
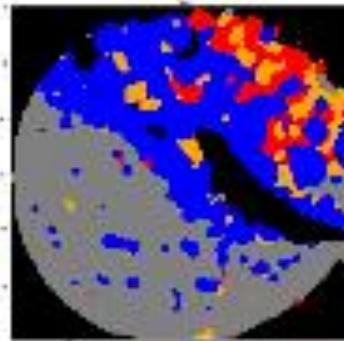
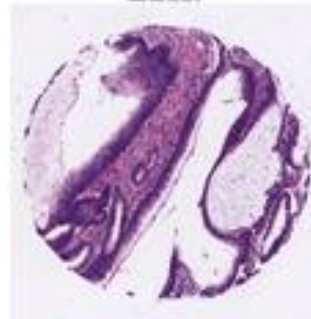
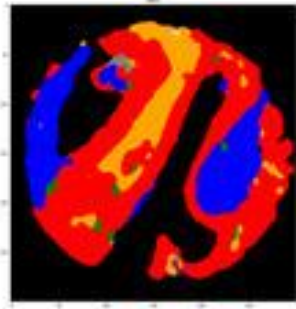
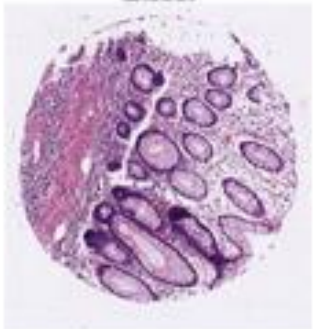
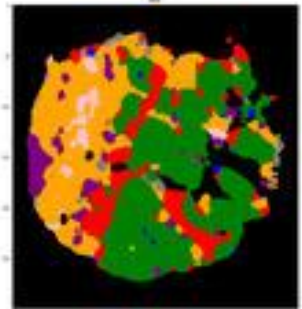
Nosotros etiquetamos algunas imágenes para clasificar los tipos de tejidos, pero **el modelo se entrenó con bancos de imágenes públicos**. Después del entrenamiento, comprobamos que el módulo había etiquetado bien los tipos de tejidos en algunas imágenes.

Desarrollo del proyecto: MÓDULO PRE-PROCESADO DE IMAGEN



(a)

(b)

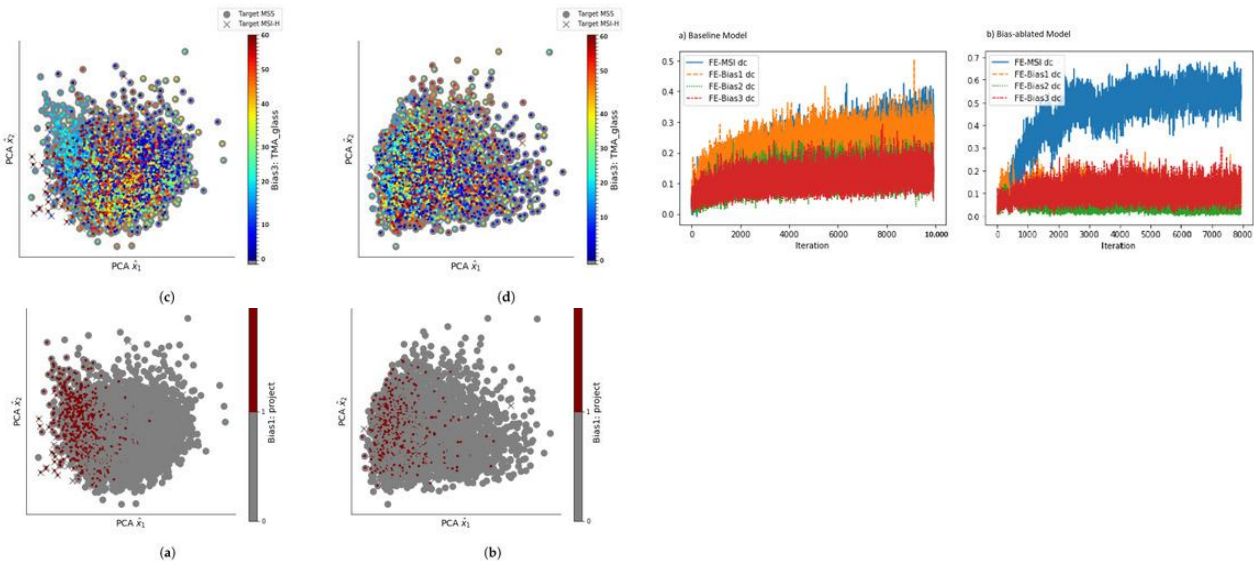
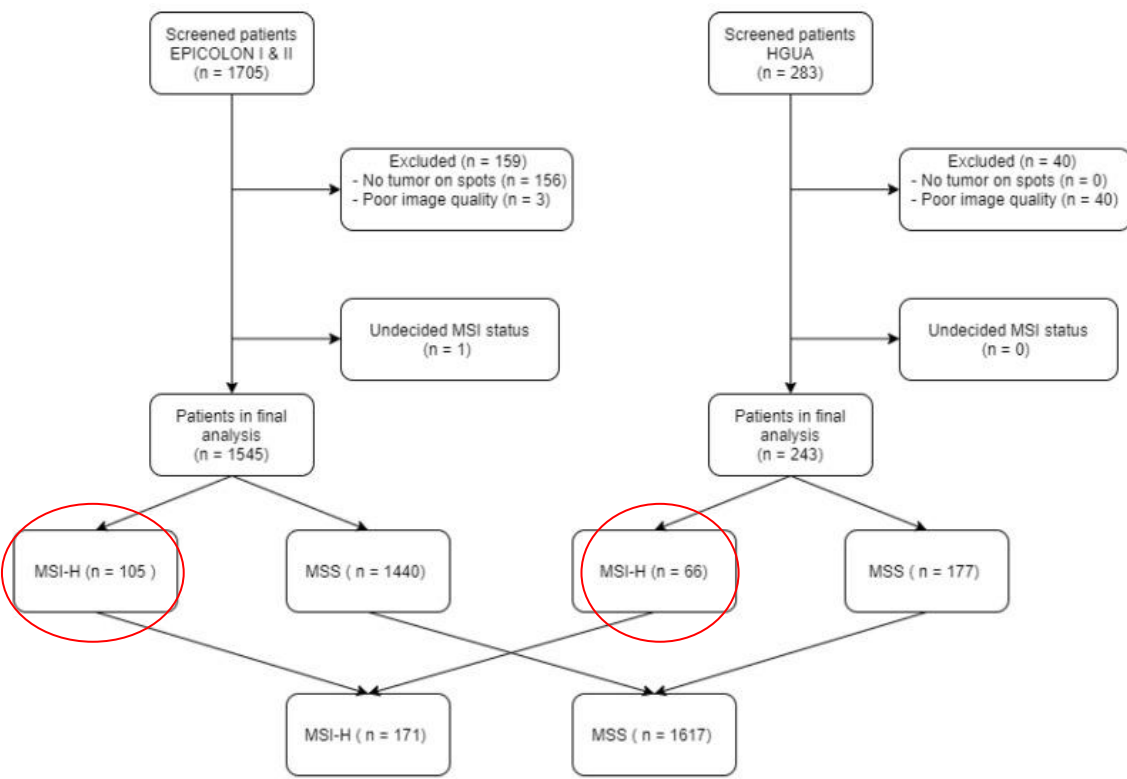


(c)

(d)

AUC 0,98

Desarrollo del proyecto: IDENTIFICADOR Y ABLACIÓN DE SESGOS



- El estudio de sesgos identificó un **sesgo hospitalario**.
- La red explotaba las características particulares de las imágenes del **hospital enriquecido con casos IMS** para realizar un **atajo en la predicción**
- Se implantó una técnica de aprendizaje profundo mediante un entrenamiento de dinámica adversaria de separación de factores de confusión (**modelo de ablación de sesgos**)

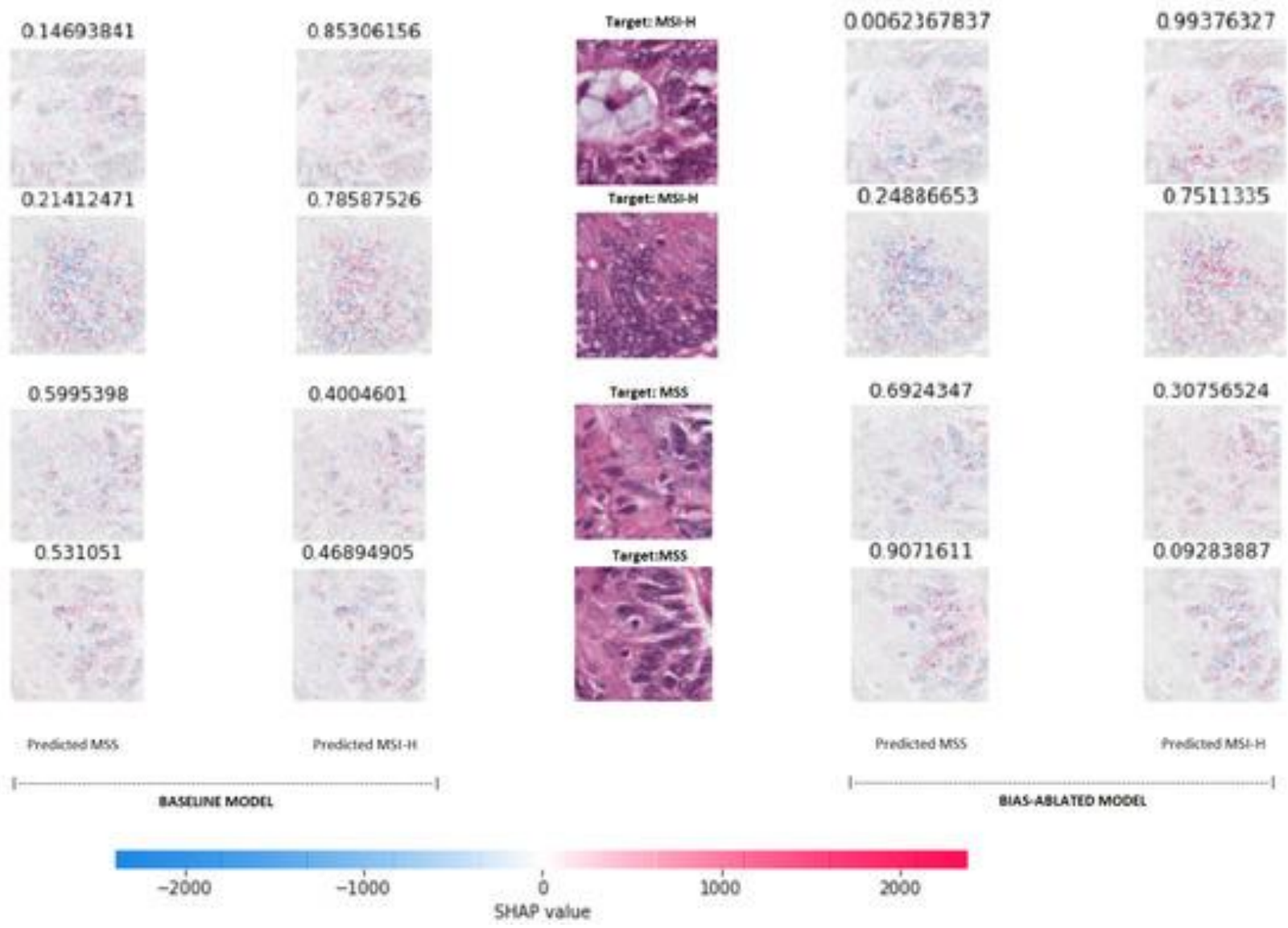
Desarrollo del proyecto: ENTRENAMIENTO DEL MODELO

- Una vez resueltos los sesgos y demostrada la validez del **módulo clasificador de tejido**, éste se utilizó para la **preselección de las regiones de interés**, enlazando con la entrada al **módulo clasificador del estado IMS**
- **Entrenamiento del modelo**: los datos se dividieron en 80/20 (entrenamiento/validación)
- **Validación cruzada** por 5 veces garantizando que las imágenes de cada paciente sólo pertenecían al grupo entrenamiento o validación, pero no ambos
- Algoritmo de **votación mayoritaria** para la decisión del estado de IMS a nivel de paciente

Desarrollo del proyecto: ENTRENAMIENTO DEL MODELO

Metric	Value	95% CI	Definition
AUC	0.90	0.87–0.93	
Accuracy *	88%	83.8–91.4%	$S * P + E * (1 - P)$
Sensitivity (S)	87%	79.5–91.3%	$\frac{TP}{TP+FN}$
Specificity (E)	88.3%	86.5–89.9%	$\frac{TN}{TN+FP}$
Positive Predictive Value *	56.5%	52.6–60.4%	$\frac{S * P}{S * P + (1 - E) * (1 - P)}$
Negative Predictive Value *	97.3%	96–98.2%	$\frac{E * (1 - P)}{E * (1 - P) + (1 - S) * P}$

Resultados: EXPLICABILIDAD DEL MODELO (técnica SHAP)



- ¿En qué se ha fijado el modelo para realizar la predicción?
- Los **valores y mapas de color** ayudan a interpretar visualmente las características que influyen en las predicciones.
- En el caso de la IMS estas características se ubicaron principalmente en el **núcleo de las células**

Article

xDEEP-MSI: Explainable Bias-Rejecting Microsatellite Instability Deep Learning System in Colorectal Cancer

Aurelia Bustos ^{1,*}, Artemio Payá ^{2,3}, Andrés Torrubia ¹, Rodrigo Jover ^{2,3}, Xavier Llor ⁴, Xavier Bessa ⁵, Antoni Castells ⁶, Angel Carracedo ⁷ and Cristina Alenda ^{2,3,*}

¹ AI Cancer Research Unit, MedBravo, 03560 Alicante, Spain; andres@medbravo.org

² Pathology Department, Alicante University General Hospital (HGU/A), 03010 Alicante, Spain; paya_ar@gva.es (A.P.); jover_rod@gva.es (R.J.)

³ Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISAIBIA), 03010 Alicante, Spain

⁴ Department of Medicine, Yale Cancer Center, Yale University, New Haven, CT 06511, USA; xavier.lli@yale.edu

⁵ Gastroenterology Department, Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), 08003 Barcelona, Spain; xbessa@parcdesalutmar.cat

⁶ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Gastroenterology Department, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; CASTELLS@clinic.cat

⁷ Fundación Pública Gallega de Medicina Genómica (GMO), 15706 Santiago de Compostela, Spain; angel.carracedo@usc.es

* Correspondence: aurelia@medbravo.org (A.B.); alenda_cri@gva.es (C.A.)



Citation: Bustos, A.; Payá, A.; Torrubia, A.; Jover, R.; Llor, X.; Bessa, X.; Castells, A.; Carracedo, A.; Alenda, C. xDEEP-MSI: Explainable Bias-Rejecting Microsatellite Instability Deep Learning System in Colorectal Cancer. *Biomolecules* 2021, 11, 1786. <https://doi.org/10.3390/biom11121786>

Academic Editor: William Cho

Received: 3 November 2021

Accepted: 26 November 2021

Published: 29 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The prediction of microsatellite instability (MSI) using deep learning (DL) techniques could have significant benefits, including reducing cost and increasing MSI testing of colorectal cancer (CRC) patients. Nonetheless, batch effects or systematic biases are not well characterized in digital histology models and lead to overoptimistic estimates of model performance. Methods to not only palliate but to directly abrogate biases are needed. We present a multiple bias rejecting DL system based on adversarial networks for the prediction of MSI in CRC from tissue microarrays (TMAs), trained and validated in 1788 patients from EPICOLON and HGUA. The system consists of an end-to-end image preprocessing module that tile samples at multiple magnifications and a tissue classification module linked to the bias-rejecting MSI predictor. We detected three biases associated with the learned representations of a baseline model: the project of origin of samples, the patient's spot and the TMA glass where each spot was placed. The system was trained to directly avoid learning the batch effects of those variables. The learned features from the bias-ablated model achieved maximum discriminative power with respect to the task and minimal statistical mean dependence with the biases. The impact of different magnifications, types of tissues and the model performance at tile vs patient level is analyzed. The AUC at tile level, and including all three selected tissues (tumor epithelium, mucin and lymphocytic regions) and 4 magnifications, was 0.87 ± 0.03 and increased to 0.9 ± 0.03 at patient level. To the best of our knowledge, this is the first work that incorporates a multiple bias ablation technique at the DL architecture in digital pathology, and the first using TMAs for the MSI prediction task.

Keywords: digital pathology; deep neural networks; bias ablation; adversarial networks; colorectal carcinoma; microsatellite instability

1. Introduction

Approximately 3% of colorectal cancers (CRC) arise in the context of Lynch syndrome (LS), where the patient has a germline mutation in a DNA mismatch repair (MMR) gene [1]. Historically, CRC patients were tested for LS if they were at high risk according to clinical criteria, e.g., aged under 50 years or with a strong family history. Several clinicopathologic criteria (e.g., Amsterdam criteria, revised Bethesda guidelines) were used to identify

Herramienta de **screening de IMS** mediante un modelo de aprendizaje profundo explicable, que integra **procesamiento de imágenes**, **análisis de tejidos** y una arquitectura novedosa de **ablación de sesgos**

Siguientes fases del proyecto

- No hemos incluido en el modelo **datos clínico-patológicos** como edad, sexo, localización, etc. Esto dará más potencia al algoritmo, pero no hemos querido utilizarlo todavía
- Nos habría interesado mucho poder predecir los pacientes con **síndrome de Lynch**, pero no tenemos un número suficiente de casos para abordar este objetivo
- Ahora estamos trabajando en la predicción de **KRAS** y **BRAF**

Nuevas líneas de investigación

- Tumores cerebrales
- VHL
- Secuenciación masiva
- Red federada
- Lenguaje natural

ISABIAL



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA Y BIOMÉDICA DE ALICANTE

De la investigación a la calidad asistencial



**GENERALITAT
VALENCIANA**

Conselleria de Sanitat
Universal i Salut Pública



**ALACANT
HOSPITAL GENERAL**
DEPARTAMENT DE SALUT