

ISSN 0719-045X



# Contacto Científico

Revista electrónica científica  
y académica de Clínica Alemana

Especial Anatomía  
Patológica

2020

Vol 10 / N° 1 / 2020

## Jefe Contacto Científico

Dr. Fernando Cádiz V.

## Editor jefe estudios traslacionales

Dr. Mario Fernández A.

## Editor invitado especial Imágenes

Dr. Claudio Silva F-A.

## Comité Editorial

Olenkha Cepeda B.

Dr. Stefan Danilla E.

Dr. David Figueroa P.

Dra. Julia Guerrero P.

Dra. Yalda Lucero A.

Dr. Pablo Lavados G.

Dr. Alex Navarro R.

Dr. Roque Sáenz F.

Dr. Claudio Silva F-A.

Dr. Pablo Soffia S.

Dr. Omar Valenzuela L.

Mariela Wijnant W.

## Periodista y Gestión Editorial

Claudia Carranza C.

## Diseño y Diagramación

Jaime Castillo Talloni

## Contacto Científico

Revista electrónica científica y académica de Clínica Alemana.  
Publicación bimensual

### Misión

“Ser el medio oficial de difusión científico y académico de Clínica Alemana para la comunicación e intercambio de conocimientos, avances científicos y tecnológicos, con el fin de incrementar las competencias, habilidades, capacidades y todo aquello que mejore el cuidado de salud de las personas y contribuya al desarrollo del conocimiento médico en beneficio de la comunidad”.

### Conflictos de interés y responsabilidades

El Editor en Jefe y miembros del Comité Editorial, declaran no tener conflictos de interés o soporte financiero de empresas relacionadas.

Los editores de esta publicación, harán todos los esfuerzos para evitar errores e imprecisiones en las opiniones, declaraciones, cifras y datos publicados en esta revista. Sin embargo, los autores de cada uno de los artículos publicados son responsables del material enviado.

Los trabajos publicados en esta revista, pueden contener opiniones personales de los autores, por lo que no busca constituirse en la única fuente o guía para buenas prácticas y/o para un tratamiento adecuado y seguro.

Por lo anterior, los editores y personas que participan en su revisión, edición y publicación, quedan exentos de toda responsabilidad por las consecuencias que pudiesen ocurrir, producto de imprecisiones o errores en cifras, datos u opiniones.

## Contenidos de esta edición

- 04** Editorial  
Daniel Carvajal
- 05** Secuenciación paralela masiva en tumores sólidos: implicancias actuales y experiencia de un centro terciario chileno  
Francisco Pérez / Daniel Carvajal
- 11** Inteligencia artificial en patología: perspectivas actuales  
Daniel Carvajal
- 15** Evaluación del diagnóstico cito-histológico en screening para cáncer cérvico-uterino de mujeres con HPV-HR positivo: una experiencia institucional  
Leonor Adriana Castiblanco / Francisco Pérez / Carmen Ferone  
Angel Vergara / Yumay Pires
- 19** “Análisis real” y objetivo de la expresión de PD-L1 por inmunohistoquímica en muestras de biopsias transbronquiales y EBUS-TBNA en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en Clínica Alemana  
Yumay Pires / Viviana Ahumada / Macarena Rodríguez / Marcela Schultz  
Daniel Carvajal-Hausdorf
- 25** Correlación cito-histológica de la punción con aguja fina en lesiones de glándula salival  
Jeannie Slater / Carolina Whittle / Francisco Pérez
- 30** Normas Editoriales

## Secciones

Editorial  
Abstracts  
Alerta  
Buenas Prácticas Clínicas  
Cartas al Editor  
Casos Clínicos  
Campañas y Revisión  
Contribución Original  
Controversias  
Cursos y Congresos  
Estado del Arte  
Ética Médica  
Farmacología  
Guías y Protocolos  
Investigación  
Lectura Crítica  
Links- Videos  
Medicina Traslacional  
Metodología de la Investigación  
Misceláneos  
Noticias  
Para su Paciente  
Perlas  
Publicaciones CAS-UDD  
Quiz  
Revisión Clínica  
Temas  
Tips para Publicar  
Trabajos Originales



### Patología cuantitativa: herramientas contra la incertidumbre al servicio del paciente.

**Dr. Daniel E. Carvajal Hausdorf**

Editor jefe

Revista Contacto Científico

Anatomía Patológica

Clínica Alemana – Facultad de Medicina Universidad del Desarrollo

Contacto: dcarvajal@alemana.cl

Durante los últimos 170 años, la Anatomía Patológica ha sido la especialidad médica encargada del diagnóstico de la enfermedad a través del examen de los tejidos humanos. Primordialmente enfocada en la autopsia en un principio, ha evolucionado en los últimos 50 años hacia el análisis de muestras pequeñas y los análisis genómicos, asistida por los avances en imágenes y en biología molecular.

Así como el ejercicio de la medicina se sustenta fundamentalmente en herramientas simples, de alto valor predictivo y bajo costo, como es la anamnesis y el examen físico, la Anatomía Patológica descansa en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. La gran mayoría de las consultas al especialista son resueltas con este recurso, y la correlación entre muestras microscópicas y su correlato quirúrgico o

excisional, nos permite afinar nuestras capacidades. Adicionalmente, la tecnología nos permite extraer mucho más de nuestras “materias primas”, las inclusiones en parafina y las láminas histológicas. El análisis automatizado de imágenes para identificación de marcadores de respuesta a terapia, la determinación de la presencia de virus oncogénicos en muestras citológicas en plataformas estandarizadas, la secuenciación masiva de ADN y ARN tumoral y la inteligencia artificial, constituyen oportunidades para el avance científico y beneficio al enfermo.

En Clínica Alemana de Santiago contamos con la tecnología y la experiencia para utilizar estos recursos para servir a nuestros pacientes. A continuación, les presentamos brevemente nuestra experiencia en algunas de estas áreas

## Artículo Original

# Secuenciación paralela masiva en tumores sólidos: implicancias actuales y experiencia de un centro terciario chileno

**Francisco J. Pérez, PhD (c)**  
**Daniel E. Carvajal, MD**

Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Biomarcadores  
Servicio de Anatomía Patológica  
Departamento de Laboratorio Clínico, Banco de Sangre y Anatomía Patológica  
Clínica Alemana de Santiago, Facultad de Medicina Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

Contacto: frperezb@alemana.cl

### Abreviaciones

NGS: secuenciación paralela masiva.

### Resumen

La medicina de precisión ha mejorado la evolución clínica de los pacientes. La secuenciación paralela masiva (NGS) posibilita el análisis simultáneo de un gran número de genes relevantes en cáncer, potenciando la selección de terapias personalizadas. En Chile el estudio de alteraciones en genes individuales constituye la práctica clínica habitual en diagnóstico oncológico. Clínica Alemana de Santiago ofrece desde 2017, el primer test NGS de aplicación clínica del país.

Entre mayo de 2017 y abril de 2019 se realizaron 83 exámenes, con un promedio de 3 casos mensuales. Los tipos tumorales más frecuentes fueron colon (49%) y pulmón (24%). El 96% de los casos fue secuenciado exitosamente y todos presentaron al menos una mutación, siendo TP53 el gen con mayor frecuencia de alteraciones (90%). Mutaciones de relevancia clínica fueron detectadas en 91%, siendo 64% alteraciones potencialmente accionables. BRAF presentó alteraciones en la mayor variedad de tipos histológicos, con

mutaciones en tiroides, GIST, piel, pulmón y colon. KRAS presentó la mayor prevalencia de alteraciones drogables (38%). A un costo de MM\$ 1,5 este test es la opción más rápida y costo-efectiva para evaluar alteraciones en tres o más genes, en comparación al estudio secuencial de genes individuales en pacientes con tumores sólidos.

### Introducción

Durante los últimos años, el tratamiento del cáncer ha evolucionado desde el paradigma de un esquema terapéutico seleccionado de acuerdo a las características histopatológicas del tumor, hacia la utilización de fármacos dirigidos molecularmente para tratar alteraciones genéticas presentes en una gama de tipos tumorales<sup>(1)</sup>. Este método de tratamiento, conocido como medicina personalizada o de precisión, ha permitido mejorar la evolución clínica de los pacientes y reducir los efectos secundarios.

Las terapias dirigidas han sido utilizadas durante años en la práctica clínica mediante el estudio de fragmentos de ADN en genes individuales, como EGFR en cáncer de pulmón

de células no pequeñas<sup>(2)</sup> y RAS en cáncer colorrectal<sup>(3)</sup>. Sin embargo, estudios sugieren necesidad de caracterizar más exhaustivamente las alteraciones genéticas para identificar correctamente los pacientes que podrían beneficiarse de estas terapias<sup>(1,4-6)</sup>.

El desarrollo de la secuenciación paralela masiva (NGS), ha incrementado la capacidad de generación de datos, permitiendo analizar simultáneamente gran número de genes con relevancia en cáncer, constituyendo una poderosa herramienta en diagnóstico molecular y potenciando la selección de terapias personalizadas<sup>(6)</sup>.

Hasta 2017, el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Biomarcadores de Clínica Alemana de Santiago, ofrecía el estudio de mutaciones en 9 genes: BRAF, EGFR, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, NRAS, PDGFRA y PIK3CA. En mayo de 2017 fue lanzado el panel NGS ONCO-50. Este test, el primer panel NGS de aplicación clínica del país, evalúa en forma simultánea variantes de nucleótido simple (SNV) y pequeñas inserciones y deleciones (INDELS) presentes en 50 oncogenes y genes supresores de tumores.

Este trabajo describe nuestra experiencia utilizando el panel ONCO-50 para el diagnóstico de alteraciones genéticas en tumores sólidos, luego de dos años de implementación.

### Descripción del test

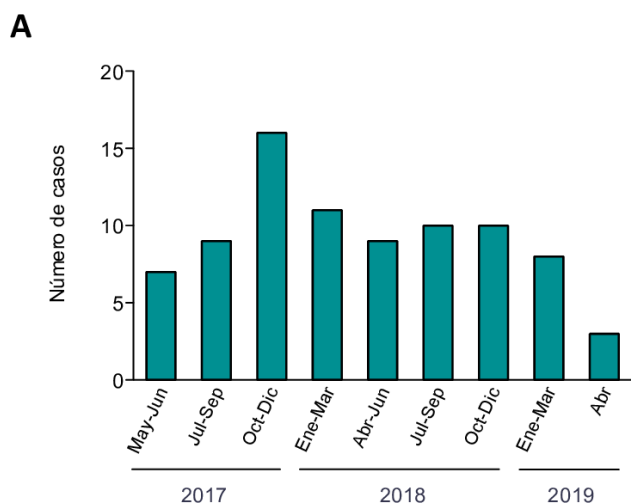
El panel ONCO-50 utiliza la tecnología de secuenciación paralela masiva de Ion Torrent, está basado en el panel Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 (ThermoFisherScientific)

y ha sido optimizado para su utilización con muestras de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE), que es el estándar de procesamiento de tejido en Anatomía Patológica. El test permite generar 207 fragmentos de ADN (amplicones) a partir de 10 ng de ADN total aislado de la muestra y está diseñado para producir amplicones de un tamaño promedio de 154 pares de bases, lo que permite su uso incluso con muestras parcialmente degradadas. Una vez producidos, los fragmentos de ADN son marcados con una secuencia pre-definida de nucleótidos a modo de código de barras molecular, formando una librería de amplicones que luego es amplificada mediante reacción de la polimerasa en cadena en emulsión (emPCR). Las librerías amplificadas son secuenciadas en un secuenciador masivo Ion PGM™ y los datos de secuenciación son evaluados con el programa Torrent Suite. Finalmente las variantes detectadas son analizadas usando el programa Ion Reporter, utilizando filtros informáticos estandarizados durante la validación analítica del examen. Para el estudio de mutaciones fue utilizado como referencia el genoma humano GRCh37/hg19.

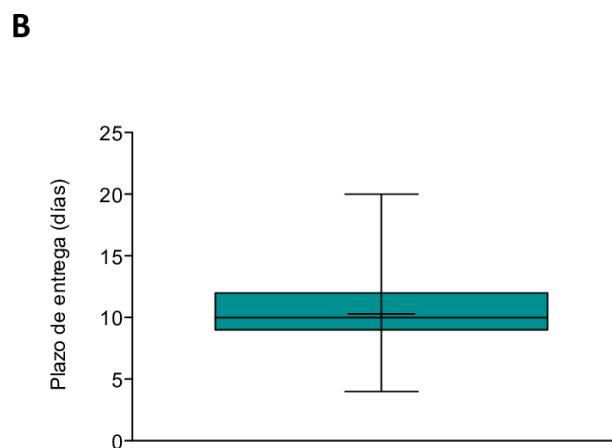
### Resultados

En el período comprendido entre mayo de 2017 y abril de 2019 se realizaron 83 exámenes ONCO-50. La demanda se ha mantenido relativamente estable en el tiempo, con un promedio de tres casos mensuales (**Figura 1A**). El tiempo de entrega de los resultados ha promediado los 10 días hábiles, con un rango intercuartil de 9-12 días (**Figura 1B**). Este tiempo es calculado desde la solicitud del test hasta la publicación del informe y no considera el tiempo empleado en el diagnóstico histopatológico.

**Figura 1. A.** Número de casos del panel ONCO-50 realizados por intervalo de tiempo.



**B.** Diagrama de caja y bigote (box-plot) del plazo de entrega de resultados del panel ONCO-50. N=83.

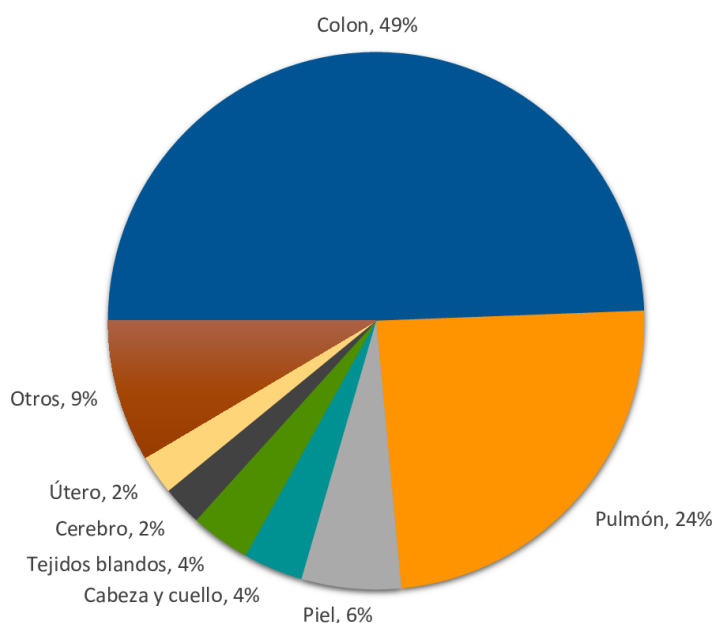


Los tipos tumorales más frecuentemente testeados, de acuerdo a su clasificación histopatológica de origen, fueron colon (49%) y pulmón (24%) (Figura 2). El 96% de los casos (80/83) fue secuenciado exitosamente y en todos ellos se obtuvo resultados analizables. En tres casos (4%) no se contó con la cantidad y/o calidad suficiente de muestra para la secuenciación y estudio de las variantes. En todos los casos válidamente secuenciados se detectó al menos una mutación, siendo TP53 el gen con la mayor frecuencia de alteraciones, detectándose mutaciones en el 90% de

los casos (72/80). Otros genes frecuentemente mutados fueron PIK3CA (30%), KDR (26%), KRAS (24%) y APC (23%) (Figura 3A).

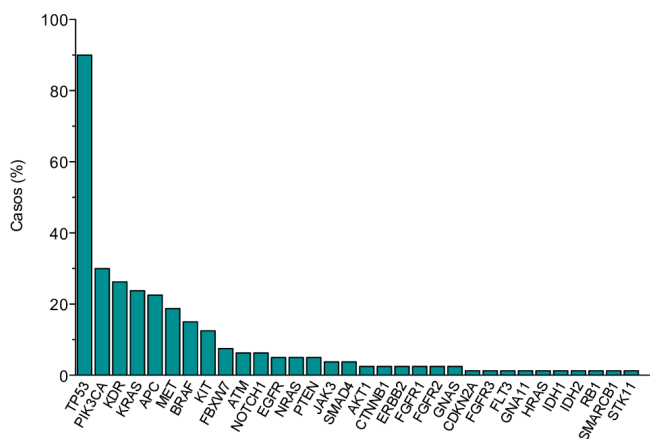
De acuerdo a su efecto biológico, se evidenció una amplia gama de variantes en los genes con alteraciones, predominando polimorfismos en TP53 (68/106), KDR (22/22) y PIK3CA (15/26), mientras que los genes con la más alta frecuencia de variantes con efecto patológico fueron KRAS (18/19), BRAF (12/12) y NRAS (4/4) (Figura 3B).

**Figura 2.** Distribución de casos testeados con el panel ONCO-50 de acuerdo con su clasificación histopatológica de origen. N=83.

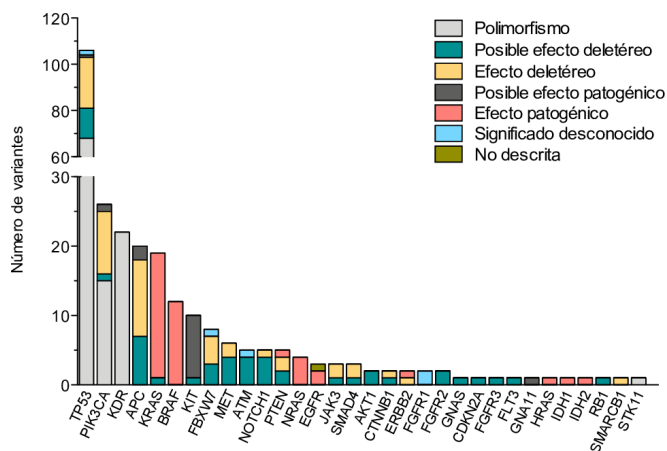


**Figura 3.**

**A.** Frecuencia de mutaciones en los genes del panel ONCO-50 en los casos con alteraciones detectadas. N=80.



**B.** Frecuencia del tipo de variantes, clasificadas de acuerdo con su efecto biológico, de los genes del panel ONCO-50 en los casos con alteraciones detectadas. N=80.

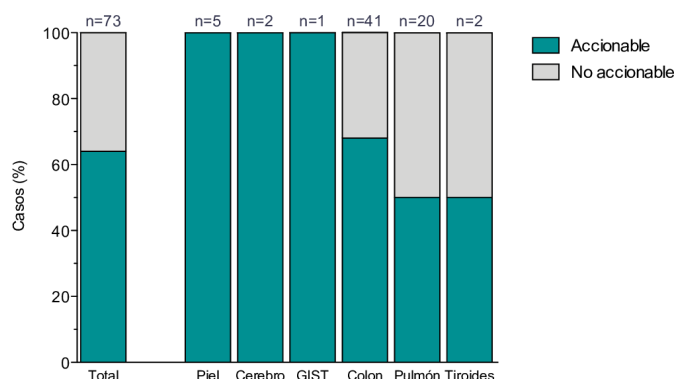


Se detectaron mutaciones de relevancia clínica conocida en el 91% de los casos (73/80), siendo un 64% de ellas (47/73) alteraciones potencialmente drogables, esto es, alteraciones que podrían predecir respuesta a terapias dirigidas<sup>7)</sup>. De acuerdo a la clasificación histológica del tumor, se evidenciaron mutaciones accionables en el 100% de las muestras de piel (5/5), cerebro (2/2) y GIST (1/1); en el 68% de las muestras de colon (28/41) y en el 50% de las muestras de pulmón (10/20) y tiroides (1/2) (**Figura 4A**).

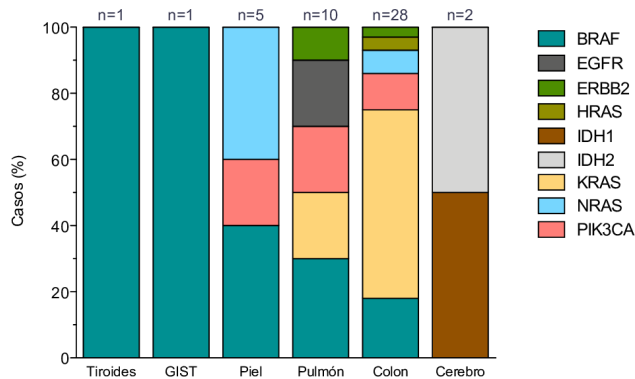
Las alteraciones accionables fueron detectadas en un conjunto de 9 genes: BRAF, EGFR, ERBB2, HRAS, IDH1, IDH2, KRAS, NRAS y PIK3CA. De este grupo, BRAF fue el gen que presentó alteraciones en la mayor variedad de tipos histológicos, con mutaciones detectadas en el 100% de los casos de tiroides (1/1) y GIST (1/1), en el 40% de los casos de piel (2/5), en el 30% de los casos de pulmón (3/10) y en el 18% de los casos de colon (5/28), (**Figura 4B**).

**Figura 4.**

**A.** Frecuencia de variantes accionables y no accionables detectadas de acuerdo con la clasificación histopatológica del tumor.

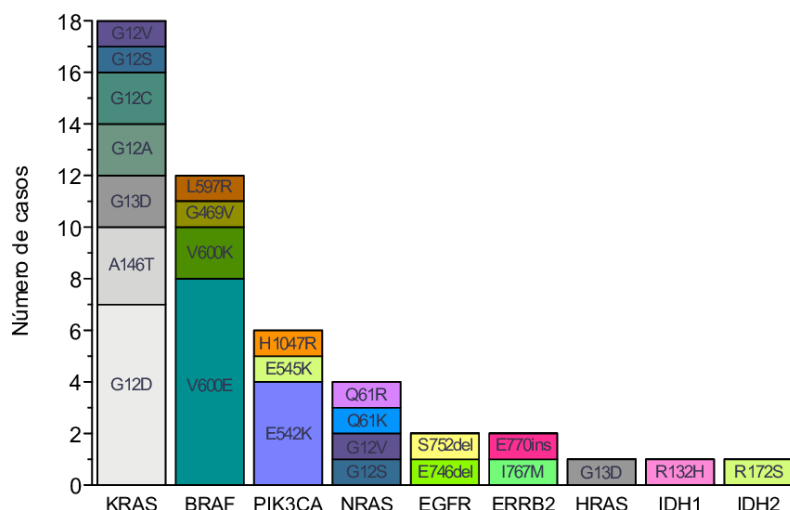


**B.** Distribución de genes con variantes accionables detectadas de acuerdo con la clasificación histopatológica del tumor.



Los tipos histológicos con mayor diversidad de genes con alteraciones drogables fueron colon y pulmón (6 y 5 genes, respectivamente). KRAS fue el gen con la mayor prevalencia de alteraciones predictivas, detectándose mutaciones en el 38% (18/47) de los casos, siendo las mutaciones del codón 12 las más frecuentes (13/18, 72%). Asimismo, NRAS presentó también una elevada frecuencia de mutaciones en el codón 12 (2/4, 50%). Otros genes con elevada prevalencia de alteraciones fueron BRAF, PIK3CA y NRAS, con 25% (12/47), 13% (6/47) y 9% (4/47) de los casos, respectivamente (**Figura 5**). EN BRAF, las mutaciones en el codón 600 fueron las más frecuentemente detectadas (10/12, 83%).

**Figura 5.** Distribución del número de variantes detectadas en los genes con alteraciones accionables. N=47.





El arancel de los tests de estudio de mutaciones en genes individuales está comprendido entre MM\$0,56 para BRAF, IDH1, IDH2, KRAS, NRAS ó PDGFRA, y MM\$0,72 para EGFR (Tabla 1). Considerando que en la práctica clínica habitual es necesario el estudio de más de un gen, el costo del estudio

de alteraciones en el tumor se eleva entre MM\$1,68 y 1,84 dependiendo del tipo histológico tumoral. En comparación, el estudio simultáneo de los 50 genes incluidos en el panel de secuenciación paralela masiva ONCO-50 tiene un arancel de MM\$1,5.

**Tabla 1.** Detalle de aranceles del año 2019 para estudios de mutaciones en genes blancos terapéuticos potenciales. MM\$: Millones de pesos chilenos.

Blancos terapéuticos potenciales					Costo por caso (MM\$)
<b>Genes individuales</b>					
cobas EGFR					0,72
Secuenciación Sanger: KIT					0,70
Secuenciación Sanger: BRAF, IDH1, IDH2, KRAS, NRAS ó PDGFRA					0,56
<b>Combinaciones por tipo de tumor</b>					
Colon (KRAS, NRAS, BRAF)					1,68
Melanoma (BRAF, NRAS, KIT)					1,82
Pulmón (EGFR, BRAF, KRAS)					1,84
<b>Panel de secuenciación ONCO-50</b>					
ABL1	EGFR	GNAS	KRAS	PTPN11	1,50
AKT1	ERBB2	GNAQ	MET	RB1	
ALK	ERBB4	HNF1A	MLH1	RET	
APC	EZH2	HRAS	MPL	SMAD4	
ATM	FBXW7	IDH1	NOTCH1	SMARCB1	
BRAF	FGFR1	JAK2	NPM1	SMO	
CDH1	FGFR2	JAK3	NRAS	SRC	
CDKN2A	FGFR3	IDH2	PDGFRA	STK11	
CSF1R	FLT3	KDR	PIK3CA	TP53	
CTNNB1	GNA11	KIT	PTEN	VHL	

### Conclusiones

En conclusión, el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Biomarcadores de Clínica Alemana de Santiago tiene a disposición de la comunidad médica el primer panel de secuenciación paralela masiva de uso clínico del país. A dos años desde su implementación el test ha sido realizado con éxito en 80/83 (96%) pacientes, llevando a la identificación de mutaciones de relevancia clínica en el 91% (73/80) y permitiendo evidenciar un 64% (47/73) de alteraciones potencialmente accionables, demostrando su utilidad para impactar en el manejo clínico de pacientes con diversos tipos de cáncer.

Nuestros resultados muestran que el empleo de un panel de secuenciación masiva constituye una herramienta efectiva para el diagnóstico y selección de tratamientos en oncología de precisión. Considerando la práctica clínica actual, respecto a la necesidad de la evaluación exhaustiva de las alteraciones genéticas presentes en el tumor para la correcta identificación de pacientes que podrían beneficiarse de terapias dirigidas, la utilización del panel ONCO-50 es la opción más rápida y costo-efectiva si se compara al estudio secuencial de genes individuales en pacientes con cáncer. Finalmente, desde principios de 2019 se encuentra disponible el test ONCO-161, el cual comprende el análisis de mutaciones en hotspots y gen completo, alteración de número de copias y reordenamientos relevantes en 161 oncogenes y genes supresores de tumores, y que complementa el portafolio de estudios genómicos para nuestros pacientes

### Referencias

1. Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 31, 1023–1031 (2013). <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2696>
2. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129–2139 (2004). <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa040938>
3. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 369, 1023–1034 (2013). <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1305275>
4. Von Hoff DD, Stephenson JJ, Rosen P, et al. Pilot study using molecular profiling of patients' tumors to find potential targets and select treatments for their refractory cancers. *J. Clin. Oncol.* 28, 4877–4883 (2010). <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2009.26.5983>
5. Takeda M, Sakai K, Terashima M, et al. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing to therapeutic decision making in lung cancer. *Ann. Oncol.* 26, 2477–2482 (2015).
6. Kou T, Kanai M, Yamamoto Y, et al. Clinical sequencing using a next-generation sequencing-based multiplex gene assay in patients with advanced solid tumors. *Cancer Sci.* 108, 1440–1446 (2017). <http://dx.doi.org/10.1111/cas.13265>
7. Carr TH, McEwen R, Dougherty B, et al. Defining actionable mutations for oncology therapeutic development. *Nat. Rev. Cancer* 16, 319–329 (2016). <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.35>

## Artículo de revisión

# Inteligencia artificial en patología: perspectivas actuales

**Dr. Daniel Carvajal H.**

Unidad de Anatomía Patológica

Departamento de Laboratorio Clínico, Banco de Sangre y Anatomía Patológica

Clínica Alemana de Santiago, Facultad de Medicina Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

Contacto: dcarvajal@alemana.cl

### Resumen

En las últimas dos décadas, la capacidad de digitalizar láminas histológicas ha impactado la velocidad con se pueden compartir los datos con otros profesionales y el ámbito educacional. El aumento del poder computacional ha llevado al desarrollo de rutinas automatizadas de aprendizaje y detección. Estos métodos de inteligencia artificial tienen el potencial de mejorar el control de calidad, diagnóstico histológico y predicción de beneficio a tratamiento. Pueden enriquecerse además de información más allá de lo morfológico, al integrar datos genómicos al proceso. Es indudable que, durante los próximos 10 años, estos nuevos métodos objetivos permearán el funcionamiento del laboratorio de Anatomía Patológica a todo nivel, incrementando la eficiencia y los beneficios al paciente.

### Introducción

Durante las últimas dos décadas, la masificación de herramientas para digitalización de láminas histológicas ha impactado la práctica de la Anatomía Patológica. La capacidad de compartir imágenes con otros patólogos (telepatología), el mejoramiento del almacenamiento y el acceso a sets de datos educacionales (para residentes o conferencias)<sup>(1)</sup> han sido algunas de las aplicaciones más conocidas. Sin embargo, en los últimos años, el aumento del poder computacional y los volúmenes de datos han llevado al desarrollo de rutinas de inteligencia artificial aplicables a diferentes ámbitos de interés del patólogo. Estos métodos utilizan datos estructurados y no estructurados, así como distintas "capas" de análisis<sup>(2,3)</sup>, para determinar clasificadores presentes en los tejidos, los cuales son observables o no para el profesional. En el siguiente artículo, revisaremos

algunas de las áreas de interés donde la inteligencia artificial puede incrementar el rendimiento de las tareas en Anatomía Patológica.

### Control de calidad

La inteligencia artificial también puede asistir en el avance y control de la técnica histológica. Las diferencias en la tinción entre laboratorios constituyen una de las mayores fuentes de variabilidad en patología, y a su vez, son una de las barreras más importantes para la generalización de protocolos de análisis automatizados<sup>(2)</sup>. Esto puede lograrse a través de normalización del color, la cual puede variar el valor de un píxel en base a una distribución predeterminada. Otro recurso es el incremento de datos, que crea conjuntos de imágenes de diferentes colores, con el fin de aumentar la nitidez, brillo y contraste, así como también puede separar los colores de los diferentes componentes y normalizarlos individualmente.

Si bien, en términos generales, el funcionamiento del laboratorio de Anatomía Patológica ha permanecido fundamentalmente inalterado durante los últimos 30 años, la incorporación de plataformas automatizadas de alta velocidad para la adquisición de imágenes se ha convertido en un hecho cotidiano para los centros de mayor complejidad<sup>(4)</sup>. La creación de repositorios de imágenes para el entrenamiento continuo de patólogos, así como la capacidad de retroalimentación manual o automatizada con asistencia de inteligencia artificial, tiene el potencial de mejorar los resultados diagnósticos de los patólogos. Asimismo, la habilidad de controlar prospectiva y retrospectivamente el rendimiento de los profesionales tiene implicancias en la protección al paciente. Un ejemplo es la búsqueda de imágenes basada en contenido (CBIR, del inglés content-based image retrieval)<sup>(2)</sup>. CIBR cuantifica similitudes entre imágenes desde el punto de vista histopatológico y general, realizando un análisis profundo de texturas. Esta técnica ha logrado resultados certeros y puede asistir en la resolución de casos difíciles.

### Diagnóstico histopatológico

El advenimiento de escáneres digitales de lámina completa ha ayudado al desarrollo del área de la histomorfometría cuantitativa, en la cual se entrenan rutinas en la detección y cuantificación de características<sup>(5)</sup>. Un requisito para estas técnicas es la capacidad de identificar los llamados "primitivos histológicos" (núcleo, célula, mitosis, glándula, etc.). Existen dificultades para su implementación masiva. El desarrollo de tareas específicas requiere un desarrollo

prolongado. Para localizar y segmentar adecuadamente una región, se requiere conocer toda la variabilidad de forma, textura y color que pueden tomar, lo que termina siendo un proceso tedioso. Luego de finalizada la parte preliminar, es común que los resultados sean menos certeros en un nuevo set de datos. Finalmente, esto redundará en que son los desarrolladores los únicos que entienden el proceso de entrenamiento, lo cual dificulta la aprobación para su uso por entes reguladores<sup>(3,4)</sup>.

Sin embargo, en los últimos años se han logrado avances importantes. En el centro de este campo de estudio se encuentra la identificación y segmentación nuclear<sup>(1)</sup>. Los algoritmos de inteligencia artificial son capaces de definir mapas de probabilidad<sup>(6)</sup>, separando regiones en dos clases, nuclear y no nuclear. Otros<sup>(7)</sup> han enfocado el problema con tres aproximaciones, dándole a los contornos del núcleo la misma jerarquía. Como habíamos mencionado, trasladar los resultados a un set de validación, o incluso entre órganos, disminuye el rendimiento. Para evitar esto, se ha intentado definir un entrenamiento más transversal para estas rutinas de aprendizaje, a través de la generación de imágenes sintéticas<sup>(8)</sup>, las cuales combinan zonas de imágenes de diferentes orígenes anatómicos, así como también con áreas totalmente artificiales.

Otra área que se ha beneficiado del análisis computacional automatizado es la detección y gradación tumoral. Estas tareas representan un orden mayor a la simple detección de primitivos histológicos, ya que involucran una integración multiparamétrica (número y forma de núcleos, mitosis, evaluación de contornos tumorales, etc.).

Janowczyk et al<sup>(3)</sup> obtuvieron una precisión de sobre el 75% de reconocimiento de cáncer invasor de mama utilizando una infraestructura abierta, la cual fue aplicable también a clasificación de linfoma (precisión del 97%) y la identificación de unidades más simples como núcleos (83%), epitelio (84%), túbulos (83%), linfocitos (90%) y mitosis (53%).

Nir et al<sup>(9)</sup> realizaron un estudio en gradación de cáncer de próstata utilizando parches de imágenes obtenidos de micromatrices de tejido evaluadas por patólogos, considerando además la variabilidad de estos. Su rutina logró superar el 95% de precisión, sensibilidad y especificidad para diferenciar tejido benigno del maligno, y sobrepasó el 85% al definir cánceres de bajo a los de alto grado. Sin embargo, el algoritmo no sobrepasó el 60% de concordancia con múltiples observadores humanos.

Nearchou et al <sup>(10)</sup>, utilizando la plataforma propietaria HALO Next Generation Image Analysis Software de Indica Labs, lograron desarrollar una estratificación de riesgo basada en sobrevida en láminas de pacientes con cáncer de colon, a través de la cuantificación automatizada de linfocitos T, brotes tumorales y su relación espacial. Esta fue superior en términos pronósticos a la evaluación de infiltración tumoral de la Clasificación TNM. En cáncer de mama, y utilizando la sobrevida a 10 años como indicador, Turkki et al <sup>(11)</sup> desarrollaron un puntaje digital de riesgo, que identificó a tejidos de pacientes con mayor grado tumoral, mayor tamaño, compromiso de linfonodos y menor expresión de progesterona, todos marcadores de peor pronóstico. La precisión del modelo generado fue comparable a la realizada por expertos.

### Predicción de beneficio a tratamiento

Las rutinas de inteligencia artificial pueden utilizar no sólo información de imágenes de láminas tradicionales teñidas con hematoxilina y eosina. Una extensión lógica es el análisis de marcadores de inmunohistoquímica, una técnica basada en detección de proteínas de interés con anticuerpos específicos. El análisis de algunos de estos blancos tiene un rol en la predicción del beneficio a algunos tratamientos específicos. En el caso del cáncer de mama, Tewary et al <sup>(12)</sup> utilizaron imágenes de 50 casos escaneados a alta resolución, con detección de receptor de estrógeno y progesterona, y un portafolio de rutinas neurales artificiales. La cuantificación de la tinción de manera automatizada alcanzó una correlación superior al 90% con la evaluación de expertos, estándar actual para la decisión de tratamiento de bloqueo hormonal. Khameneh et al <sup>(13)</sup> utilizaron análisis automatizado de secciones completas teñidas para HER2, marcador utilizado para la terapia dirigida trastuzumab, y rutinas de segmentación de membrana celular. Luego del entrenamiento, lograron un área bajo la curva de 99% para la detección de pixeles asociados a membrana y un 87% para definición de categoría de intensidad designada por patólogo.

Los datos morfométricos pueden ser interrogados más allá de la información puramente visual. La inestabilidad microsatelital es una alteración genética presente en algunos tipos tumorales, que los predispone a tener hipermutabilidad y está asociada a respuesta a tratamiento con inmunoterapia <sup>(14)</sup>, una clase nueva de drogas antineoplásicas que actúan activando la inmunidad antitumoral. Kather et al <sup>(15)</sup> utilizaron láminas digitales de repositorios internacionales con anotación de

alteraciones moleculares y análisis de inteligencia artificial no supervisados. La rutina computacional fue capaz de distinguir eficientemente entre imágenes de tumores con y sin inestabilidad microsatelital a través de varios tipos histológicos: cáncer de colon, cáncer de estómago y cáncer de endometrio.

Oncotype DX es un estudio genómico predictivo que puede determinar el beneficio de tratamiento con quimioterapia en mujeres con cánceres de mama en etapa temprana, que expresen receptores de estrógeno y no tengan compromiso ganglionar <sup>(16)</sup>. Whitney et al <sup>(17)</sup> realizaron un análisis histomorfométrico de núcleos en 178 casos que cumplían criterios para la indicación de Oncotype DX. Utilizaron imágenes de gran aumento y resolución, así como modelos sucesivos de aprendizaje automatizado para dilucidar segmentación nuclear, sobreposición, regiones tumorales y estromales en distintas áreas de tumor, logrando identificar 216 características arquitecturales y de forma. Finalmente, el algoritmo fue capaz de discriminar entre casos extremos (bajo grado nuclear bajo puntaje Oncotype DX vs alto grado y alto puntaje) con un área bajo la curva de 0.83, así como casos con un puntaje bajo vs intermedio y alto con una certeza del 84%.

El cáncer de pulmón tiene una serie de alteraciones genéticas que lo hacen susceptible a tratamiento dirigido. Coudray et al <sup>(18)</sup> utilizaron 1.634 casos del repositorio de imágenes de The Cancer Genome Atlas y aplicaron la arquitectura de inteligencia artificial GoogleNet. La rutina pudo distinguir entre parches tumorales y no tumorales con una precisión superior al 99% y entre adenocarcinomas y carcinomas escamosos con un área bajo la curva de 0.95. Cuando se correlacionó la información genómica de los casos y se consideraron adenocarcinomas con frecuencia alélica mayor al 10%, los algoritmos fueron capaces de identificar los casos con mutaciones del gen EGFR, que brindan sensibilidad para drogas bloqueadoras, con un área bajo la curva promedio de 0.83.

### Conclusión

La capacidad de digitalizar láminas histológicas y el aumento del poder computacional traen consigo un cambio del paradigma de funcionamiento del laboratorio de Anatomía Patológica. La inteligencia artificial puede mejorar los procesos, el control de calidad y el entrenamiento de los patólogos. Los algoritmos de aprendizaje automatizado constituyen una herramienta que puede apoyar a los profesionales en términos diagnósticos y en el tamizaje de

casos para análisis molecular. La progresiva introducción de estos recursos en el trabajo de rutina tiene el potencial de eliminar tareas redundantes y asistir en una mejor atención para nuestros pacientes.

### Referencias

1. Niazi MKK, Parwani AV, Gurcan MN. Digital pathology and artificial intelligence. *Lancet Oncol.* 2019;20(5):e253-e61.
2. Komura D, Ishikawa S. Machine learning approaches for pathologic diagnosis. *Virchows Arch.* 2019;475(2):131-8.
3. Janowczyk A, Madabhushi A. Deep learning for digital pathology image analysis: A comprehensive tutorial with selected use cases. *J Pathol Inform.* 2016;7:29.
4. Colling R, Pitman H, Oien K, et al. Artificial intelligence in digital pathology: a roadmap to routine use in clinical practice. *J Pathol.* 2019.
5. Madabhushi A, Lee G. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Med Image Anal.* 2016;33:170-5.
6. Song Y, Zhang L, Chen S, et al. Accurate Segmentation of Cervical Cytoplasm and Nuclei Based on Multiscale Convolutional Network and Graph Partitioning. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2015;62(10):2421-33.
7. Kumar N, Verma R, Sharma S, et al. A Dataset and a Technique for Generalized Nuclear Segmentation for Computational Pathology. *IEEE Trans Med Imaging.* 2017;36(7):1550-60.
8. Mahmood F, Borders D, Chen R, et al. Deep Adversarial Training for Multi-Organ Nuclei Segmentation in Histopathology Images. *IEEE Trans Med Imaging.* 2019.
9. Nir G, Karimi D, Goldenberg SL, et al. Comparison of Artificial Intelligence Techniques to Evaluate Performance of a Classifier for Automatic Grading of Prostate Cancer From Digitized Histopathologic Images. *JAMA Netw Open.* 2019;2(3):e190442.
10. Nearchou IP, Lillard K, Gavriel CG, et al. Automated Analysis of Lymphocytic Infiltration, Tumor Budding, and Their Spatial Relationship Improves Prognostic Accuracy in Colorectal Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(4):609-20.
11. Turkki R, Bychkov D, Lundin M, et al. Breast cancer outcome prediction with tumour tissue images and machine learning. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;177(1):41-52.
12. Tewary S, Arun I, Ahmed R, et al. AutoIHC-scoring: a machine learning framework for automated Allred scoring of molecular expression in ER- and PR-stained breast cancer tissue. *J Microsc.* 2017;268(2):172-85.
13. Khameneh FD, Razavi S, Kamasak M. Automated segmentation of cell membranes to evaluate HER2 status in whole slide images using a modified deep learning network. *Comput Biol Med.* 2019;110:164-74.
14. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2019;25(13):3753-8.
15. Kather JN, Pearson AT, Halama N, et al. Deep learning can predict microsatellite instability directly from histology in gastrointestinal cancer. *Nat Med.* 2019;25(7):1054-6.
16. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(2):111-21.
17. Whitney J, Corredor G, Janowczyk A, et al. Quantitative nuclear histomorphometry predicts oncotype DX risk categories for early stage ER+ breast cancer. *BMC Cancer.* 2018;18(1):610.
18. Coudray N, Ocampo PS, Sakellaropoulos T, et al. Classification and mutation prediction from non-small cell lung cancer histopathology images using deep learning. *Nat Med.* 2018;24(10):1559-67.

## Artículo de Revisión

# Evaluación del diagnóstico cito-histológico en screening para cáncer cérvico-uterino de mujeres con HPV-HR positivo: una experiencia institucional

**Dra. Leonor Adriana Castiblanco<sup>1</sup>, Dr. Francisco Pérez<sup>1</sup>, TM Carmen Ferone<sup>1</sup>,  
TM Angel Vergara<sup>1</sup>, Dra. Yumay Pires<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Unidad de Anatomía Patológica

Departamento de Laboratorio Clínico, Banco de Sangre y Anatomía Patológica

Clínica Alemana de Santiago, Facultad de Medicina Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

Contacto: acastiblanco@alemana.cl

### Abreviaciones:

AIS: adenocarcinoma in situ.

ASC-US: células escamosas atípicas de significado incierto.

CaCu: cáncer cérvico-uterino.

HPV: virus papiloma humano.

HPV-HR: HPV de alto riesgo oncogénico.

HPV-HR+: muestras HPV-HR positivo.

LAG: lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

LBG: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.

### Resumen

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres en el mundo y la primera en Chile en mujeres de 20-44 años. El virus papiloma humano (HPV) de alto riesgo oncogénico (HR) es el agente etiológico en el 99,7% de las lesiones de alto grado y CaCu. Nuestro objetivo fue escribir los resultados del estudio molecular de HPV-HR en nuestra institución y evaluar la correlación de las muestras positivas (HPV-HR+) con el diagnóstico citológico e histológico.

Se analizaron retrospectivamente los casos HPV-HR+ de nuestra institución entre los años 2014-2016 realizados en la plataforma COBAS (Roche). Se identificaron los genotipos 16, 18 y otros HPV-HR. Se realizó correlación con los casos en que la biopsia estaba disponible.

Se evaluaron 104 pacientes mujeres con HPV-HR+. La prevalencia fue 62% para otros HPV-HR, 34% para genotipo 16 y 4% para genotipo 18. El 13,5% de las mujeres con HPV-HR+ no tuvieron alteraciones citológicas, el 79,8% presentaron ASC-US/LBG y el 6,7% LAG/AIS. Noventa pacientes (86,5%) presentaron alteraciones clasificadas como ASC-US+.

El estudio para HPV-HR es una herramienta útil para el tamizaje de CaCu. Nuestra experiencia fortalece la recomendación de realizar Co-test a mujeres  $\geq 30$  años.

## Introducción

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo, 270.000 mujeres mueren al año por este cáncer y el virus papiloma humano (HPV) es el agente etiológico en el 99,7% de los tumores<sup>(1-2)</sup>. En Chile, es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres entre 20-44 años. Cada año se diagnostican 1279 casos nuevos y 587 mujeres mueren por este tipo de cáncer<sup>(3-4)</sup>. Las infecciones persistentes por HPV de alto riesgo oncogénico (HPV-HR), son responsables del desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE-HG) y del CaCu. HPV 16 y el 18 son responsables del 71% de los CaCu invasores, y sumados el 31, 33, 35, 45, 52 y 58 causan el 91% de los carcinomas escamosos. Además, el 16, 18 y 45 causan el 94% de los adenocarcinomas cervicales<sup>(5-8)</sup>.

La evidencia muestra que los tests moleculares para HPV-HR (HPV test) en muestras cervicales y/o vaginales son mucho más sensibles y efectivos en pesquisar mujeres con mayor riesgo de desarrollar lesiones cervicales precancerosas<sup>(9)</sup>.

Además, el uso de HPV test en conjunto con la citología (Co-test), en mujeres de 30 años y más, es una estrategia de tamizaje que tiene un menor índice de falsos negativos que una prueba citológica sola<sup>10</sup>.

El objetivo del presente trabajo es describir los resultados del test molecular de HPV-HR realizados en nuestra institución en un periodo de 3 años y evaluar la correlación de las muestras HPV-HR positivas (HPV-HR+) con el diagnóstico citológico e histológico.

## Materiales y métodos

Se evaluaron retrospectivamente todos los casos con test HPV-HR+ realizados entre los años 2014 a 2016 en nuestra institución. Las muestras citológicas fueron procesadas con técnica automatizada ThinPrep y categorizadas de acuerdo al sistema Bethesda 2014. La determinación de HPV-HR se realizó en el laboratorio de Diagnóstico Molecular y Biomarcadores de la Unidad de Anatomía Patológica de Clínica Alemana, utilizando la técnica de PCR COBAS (Roche). Esta permite identificar los genotipos 16 y 18 (16+ y 18+), además de otros 12 genotipos de alto riesgo (otros HPV-HR+). Para la correlación diagnóstica se seleccionaron los casos HPV-HR+ que tenían evaluación histológica.

## Resultados

Se evaluó un total de 104 pacientes mujeres con test HPV-HR+, con una edad promedio de 36 años. El 82,7% (n=86)

de los casos fueron realizados como Co-Test, mientras que el 17,3% (n=18) correspondieron a test reflejo. El genotipo prevalente en la población de estudio fue otros HPV-HR (62%), seguido por el genotipo 16 (34%) y el genotipo 18 (4%). No se detectaron diferencias en la genotipificación respecto a la edad de las mujeres, como se observa en la Tabla 1.

**Tabla 1. Genotipificación de casos HPV-HR+**

Edad	16+	18+	Otros HPV-HR
<30 años	13 (33%)	2 (5%)	24 (62%)
≥30 años	31 (35%)	3 (3%)	56 (62%)
Todas las edades	44 (34%)	5 (4%)	80 (62%)

El 13,5% de las mujeres con HPV-HR+ no tuvieron alteraciones citológicas, el 79,8% presentaron alteraciones menores (ASC-US/LBG) y el 6,7% alteraciones mayores (LAG/AIS). Noventa pacientes (86,5%) presentaron alteraciones clasificadas como ASC-US+, como se detalla en la Tabla 2.

**Tabla 2. Categorización de alteraciones citológicas en casos HPV-HR+**

Blancos terapéuticos	N	%
Negativo	14	13,5
ASC-US	35	33,7
LBG	48	46,1
LAG	4	3,8
AIS	3	2,9
Total	104	100
ASC-US+	90	86,5

**ASC-US: Células escamosas atípicas de significado incierto; LBG: Lesión de bajo grado (NIE1/HPV); LAG: Lesión de alto grado (NIE2+); AIS: Adenocarcinoma in situ.**

De las mujeres sin alteraciones citológicas, el 22,2% (2 de 9) de las ≥30 años evidenciaron una lesión de alto grado en la biopsia, a diferencia de las <30 años las cuales presentaron solo lesiones de bajo grado (5 de 5), Tabla 3.

No se detectaron adenocarcinomas in situ en mujeres sin alteraciones citológicas, independientemente de su edad. La citología tuvo un 81% de exactitud diagnóstica y una sensibilidad de 86%.



**Tabla 3.** Correlación de diagnóstico cito-histológico de casos HPV-HR+

		Diagnóstico histológico								Total
		Negativo		LBG		LAG		AIS		
Diagnóstico citológico	Negativo	0	0	5	7	0	2	0	0	14
	ASC-US	0	4	8	19	2	2	0	0	35
	LBG	0	1	12	32	2	1	0	0	48
	LAG	0	1	0	0	1	2	0	0	4
	AIS	0	0	0	0	0	1	0	2	3
Edad (años)		<30 años	≥30 años	<30 años	≥30 años	<30 años	≥30 años	<30 años	≥30 años	
Total		6		83		13		2		104

### Discusión

En Chile, los estudios de prevalencia de HPV han demostrado que los virus más frecuentemente encontrados en citologías cervico-vaginales (n=3691 mujeres) de un centro de atención primaria y de un hospital de referencia son variables de un 10 a 67% de muestras positivas para HPV-HR+, dentro de los cuales los subtipos más prevalentes fueron el 16, 66, 59, 31 y 58.<sup>5</sup> En las muestras de nuestras pacientes, un 45,4% (208 de 458) resultaron HPV-HR+, y los subtipos más frecuentemente encontrados fueron los que pertenecen al grupo de otros HPV-HR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) dentro de los cuales encontramos los subtipos más prevalentes en la población chilena, seguidos por el HPV-16.

Según estudios internacionales la prevalencia de infección por HPV en mujeres con citología negativa se estima en un 10-12%<sup>(8,12-13)</sup>. En nuestra revisión de casos encontramos una prevalencia similar de 13,5% para las citologías negativas HPV-HR+. La asociación de un resultado positivo para HPV-HR 16 en una mujer con citología negativa tiene un 10% de posibilidad de tener una LAG histológica y este riesgo se eleva a un 30% si la citología simultánea es anormal<sup>(13-14)</sup>. En los casos que tenían citología negativa y que en el estudio histológico había una LAG, el resultado de la prueba fue HPV-16+ o HPV-18+. Esto se condice con la recomendación de enviar a colposcopia a las mujeres cuyo resultado de HPV-HR sea positivo para HPV-16 y/o HPV-18 por el mayor riesgo de CaCu.

La realización del estudio de HPV-HR en pacientes con citología ASC-US como un test reflejo también ha demostrado ser útil, porque permite estratificar el riesgo

que una mujer tiene de desarrollar una LAG. En las mujeres con resultado positivo para HPV-16/HPV-18 el riesgo es mucho mayor (24,4%), que si es positivo para otros HPV-HR (14 %) y es bajo cuando HPV-HR es negativo (0,8%)<sup>(13)</sup>. En los casos ASC-US de nuestra revisión el 11,4% tuvieron una LAG en la biopsia y el HPV reflex dio como resultados HPV16/HPV18+. Los casos ASC-US que tuvieron una LBG en la biopsia eran positivos para el grupo otros HPV-HR.

La mayoría de los casos corresponde a Co-test, consideramos que esto se debe a que se siguen las recomendaciones de la Sociedad Americana del Cáncer y del Colegio Americano de Gineco-obstetras de hacer Co-test a las mujeres de 30 hasta 65 años. Si bien esta prueba de tamizaje es más costosa, mejora la especificidad del estudio molecular y en una fase inicial permite familiarizar al médico y a las pacientes con este.

En los casos revisados, el Co-test mejoró la sensibilidad de la prueba citológica en pacientes ≥30 años ya que permitió identificar un 22,2% de mujeres que siendo negativas a la citología tenía una LAG en la biopsia. Esto constituye una herramienta útil para el tamizaje de CaCu. Nuestra experiencia fortalece la recomendación de realizar Co-test a mujeres ≥30 años en los centros donde se pueda contar con el test molecular.

La sensibilidad de la citología varía entre 30 y 87% y su especificidad entre 86 a 100%<sup>(15-16)</sup>. En la tabla de contingencia para la correlación citohistológica en nuestro servicio la sensibilidad de una evaluación citológica es de 86%, superior a la reportada en otros centros del país<sup>(16)</sup>.

### Referencias

1. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:244–265.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(9):690-8.
3. Guías Clínicas AUGE Cáncer Cérvico Uterino. Ministerio de Salud (Minsal) 2015. Disponible en <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/GPC-CaCU.pdf>
4. Ministerio de Salud (Minsal). Mortalidad por causas 2000-2011. Disponible en: <http://www.deis.cl/defunciones-y-mortalidad-por-causas/>
5. Vergara N, Espinoza G, Balanda M, et al. Prevalence of Human Papillomavirus infection among Chilean women from 2012 to 2016. *J Med Virol.* 2017 Sep;89(9):1646-1653.
6. IARC Working Group. Human Papillomaviruses: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2007:90.
7. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17–27.
8. De Sanjose S, Quint WGV, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010; 11: pp. 1048-1056.
9. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, et al. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: A population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncology* 2011;12(7):663-672.
10. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, et al. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2011; 103(5):368-383.
11. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005;366:991-98.
12. Ogembo RK, Gona P N, Seymour AJ, et al. Prevalence of human Papillomavirus genotypes among African women with normal cervical cytology and neoplasia: A systematic review and meta-analysis. *PloSone*, 2015;10(4):1-22.
13. Wright Jr TC, Stoler MH, Behrens CM, et al. The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206:46.e1-46.
14. Wright Jr TC, Stoler MH, Sharma A, et al. Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology negative results. *Am J Clin Pathol.* 2011;136:578-586.
15. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, et al. Accuracy of the papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: A systematic review. *Ann Intern Med* 2000; 132 (10): 810-9.
16. Terrazas S, Ibáñez C, Lagos M, et al. Human papillomavirus testing in cervical cancer screening at a public health service of Santiago, Chile. *Rev Med Chil.* 2015; 143(1):56-62.

## Artículo de Revisión

# “Análisis real” y objetivo de la expresión de PD-L1 por inmunohistoquímica en muestras de biopsias transbronquiales y EBUS-TBNA en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en Clínica Alemana.

<sup>1</sup>Dra. Yumay Pires, <sup>1</sup>BQ. Viviana Ahumada, MSc, <sup>1</sup>Dra. Macarena Rodríguez, <sup>1</sup>Dra. Marcela Schultz, <sup>1</sup>Dr. Daniel Carvajal-Hausdorf.

<sup>1</sup>Unidad de Anatomía Patológica

Departamento de Laboratorio Clínico, Banco de Sangre y Anatomía Patológica

Clínica Alemana de Santiago, Facultad de Medicina Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

**Contacto:** ypires@alemana.cl.

## Abreviaciones

PD-L1: programmed death ligand 1.

EBUS-TBNA: biopsia por aspiración con aguja fina guiada por ecografía endobronquial.

NSCLC: cáncer de pulmón de células no pequeñas.

## Resumen

Como parte del diagnóstico y etapificación del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) es frecuente la utilización de pequeñas muestras de biopsia, obtenidas por aspiración con aguja fina guiada por ecografía endobronquial (EBUS-TBNA). Recientemente se ha visto que algunos de estos pacientes son susceptibles de tratamiento con anticuerpos monoclonales contra de PD-1 o PD-L1, previa determinación de su expresión en el tumor por inmunohistoquímica.

Sin embargo, el rendimiento de la tinción inmunohistoquímica contra PD-L1 no ha sido estudiado en profundidad en biopsias obtenidas por EBUS-TBNA.

En nuestro trabajo, estudiamos la relación y concordancia del puntaje de expresión inmunohistoquímica del anticuerpo monoclonal contra PD-L1 (E1L3N) XP Rabbit en biopsias transbronquiales y EBUS-TBNA de linfonodos positivos mediante análisis convencional por anatómo-patólogo y un método objetivo cuantitativo en una serie de pacientes con NSCLC.

## Introducción

Como parte del diagnóstico y etapificación del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) es frecuente la utilización de pequeñas muestras de biopsia, obtenidas por aspiración con aguja fina guiada por ecografía endobronquial (EBUS-TBNA).<sup>1, 2, 3</sup>

A su vez, el tratamiento de los pacientes con NSCLC en etapa avanzada ha tenido progresos significativos en las últimas décadas con la aparición de terapias dirigidas contra mutaciones específicas de las células tumorales y más recientemente con la inmunoterapia, como anticuerpos monoclonales contra PD-1 o PD-L1.

Recientemente, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó dos anticuerpos monoclonales IgG4 de segunda línea contra PD-1 para el tratamiento de NSCLC en etapa avanzada. <sup>4</sup> Pembrolizumab mostró un 45.2% de respuesta en los pacientes con tumores con expresión de PD-L1 mayor al 50%, observándose menor respuesta en aquellos tumores con niveles inferiores de tinción. <sup>5,6</sup>

En forma similar, los pacientes con tumores con expresión de PD-L1, aunque con diferentes puntos de corte y tratados con Nivolumab, tenían mayor respuesta objetiva y reducciones del volumen tumoral. <sup>7,8</sup>

Uno de los desafíos más importantes del uso de inhibidores de PD-L1 radica en la capacidad de identificar a los pacientes adecuados, para lo cual se analiza la expresión de PD-L1 en las células tumorales con técnicas de inmunohistoquímica,<sup>9</sup> siendo EBUS-TBNA un método útil para la obtención de muestras pequeñas donde realizar estas determinaciones. <sup>10,11</sup>

A pesar de estos hallazgos, el valor predictivo de PD-L1 como biomarcador ha sido cuestionado debido a observaciones de respuesta o beneficio en pacientes sin expresión de este anticuerpo. <sup>12,13,14</sup> Las posibles explicaciones para esta observación podrían ser que la muestra de tejido negativa para PD-L1 corresponde a una zona diferente a otras áreas positivas no testeadas <sup>15,16</sup> o bien que los pacientes pueden responder a inhibidores de "checkpoint" independiente de la expresión de sus tumores a anticuerpos contra PD-L1.<sup>15</sup>

Se han reportado discordancias entre diferentes métodos de medición de la expresión de PD-L1 evaluada en áreas similares del mismo tumor, lo cual podría estar relacionado

con heterogeneidad tumoral o deberse a variabilidad en los anticuerpos o en las mediciones realizadas.<sup>16</sup>

Se ha comparado la heterogeneidad en la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 empleando distintos métodos de medición y su variabilidad en relación con el muestreo y con la lectura hecha por anatómo-patólogos en muestras quirúrgicas de NSCLC.<sup>17</sup>

Sin embargo, el rendimiento de la tinción inmunohistoquímica contra PD-L1 no ha sido estudiado en profundidad en biopsias obtenidas por EBUS-TBNA, así como tampoco la comparación en estas muestras con su medición por métodos cuantitativos, tal como se ha analizado en la expresión de HER2 en cáncer de mama. <sup>18</sup>

En nuestro trabajo, estudiamos la relación y concordancia del puntaje de expresión inmunohistoquímica del anticuerpo monoclonal contra PD-L1 (E1L3N) XP Rabbit en biopsias transbronquiales y EBUS-TBNA de linfonodos positivos mediante análisis convencional por anatómo-patólogo y un método objetivo cuantitativo en una serie de pacientes con NSCLC.

### Material y métodos

Se seleccionaron 24 pacientes con NSCLC diagnosticados en Clínica Alemana entre 2009 y 2017, en etapa avanzada, fallecidos y sin tratamiento previo. Las muestras de tumor fueron obtenidas por biopsia transbronquial y EBUS-TBNA, y contaron con al menos 100 células neoplásicas: Las características clínico-patológicas de los pacientes se representan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Características clínico-patológicas de los casos analizados, incluyendo 48 biopsias de 24 pacientes. SCC: carcinoma de células escamosas. NSCLC: carcinoma de células no pequeñas del pulmón. NOS: no especificado.

		N	%
Edad años	<70	11	0,0
	≥70	13	54,2
Sexo	Femenino	12	50,0
	Masculino	12	50,0
Histología	Adenocarcinoma	19	79,2
	SCC	4	16,7
	NSCLC NOS	1	4,2
EstadíoTNM	IIIA	2	8,3
	IV	20	83,3
	Desconocido	2	8,3

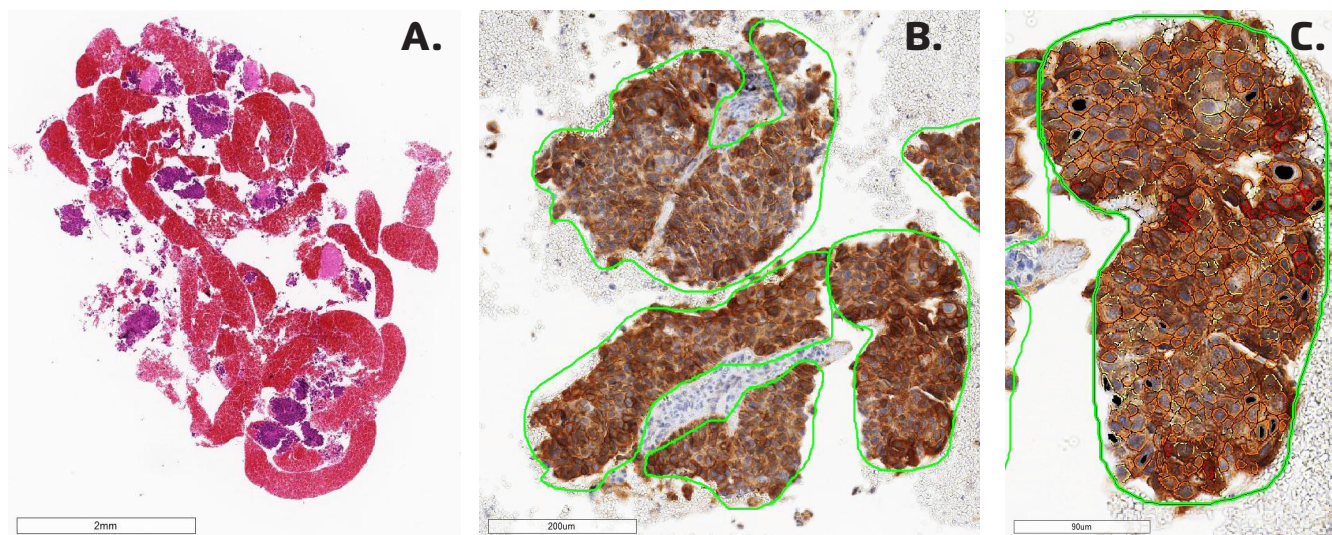
Se analizaron 48 preparaciones correspondientes a cortes de tejido fijado en formaldehído al 10% tamponado y embebidos en parafina. Los cortes histológicos fueron de 4  $\mu$ m de espesor y teñidos mediante anticuerpo anti-PD-L1 (E1L3N®) XP® Rabbit mAb (Cell Signaling Technology) en sistema automatizado Benchmark ULTRA de Ventana (Roche) para ambos tipos de muestras. Todas las preparaciones fueron evaluadas por dos patólogos (P1 y P2) y escaneadas usando Aperio® AT2 scanner (Leica). Ambos patólogos asignaron un puntaje en cada muestra en forma independiente usando una escala de 5 niveles en base a las guías usuales de interpretación de PD-L1 en NSCLC para indicar el porcentaje de tinción de membrana sin considerar la intensidad o la extensión de expresión completa o parcial (tabla 2).

**Tabla 2.** Puntaje de acuerdo con la expresión de PD-L1.

CATEGORÍA	EXPRESION DE PD-L1 (% CELULAS TUMORALES)
0	0
1	<1
2	1-10
3	10-50
4	>50

Para el análisis digital, los grupos de células tumorales fueron seleccionados desde las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina por un operador entrenado y estas áreas fueron analizadas usando algoritmos aprobados por la FDA para el recuento de células con tinción de membrana para HER-2 (figura 1).

**Figura 1.** Etapas en el análisis cuantitativo del valor predictivo de PDL1 en cáncer de pulmón. **A.** Escaneo de las preparaciones teñidas con H-E e inmunohistoquímica (IHQ) usando Aperio. **B.** Un operador entrenado selecciona las áreas con tumor en preparaciones teñidas con IHQ obtenidas por biopsia transbronquial y EBUS. Se aplica un algoritmo para membrana (HER2, aprobado por FDA).



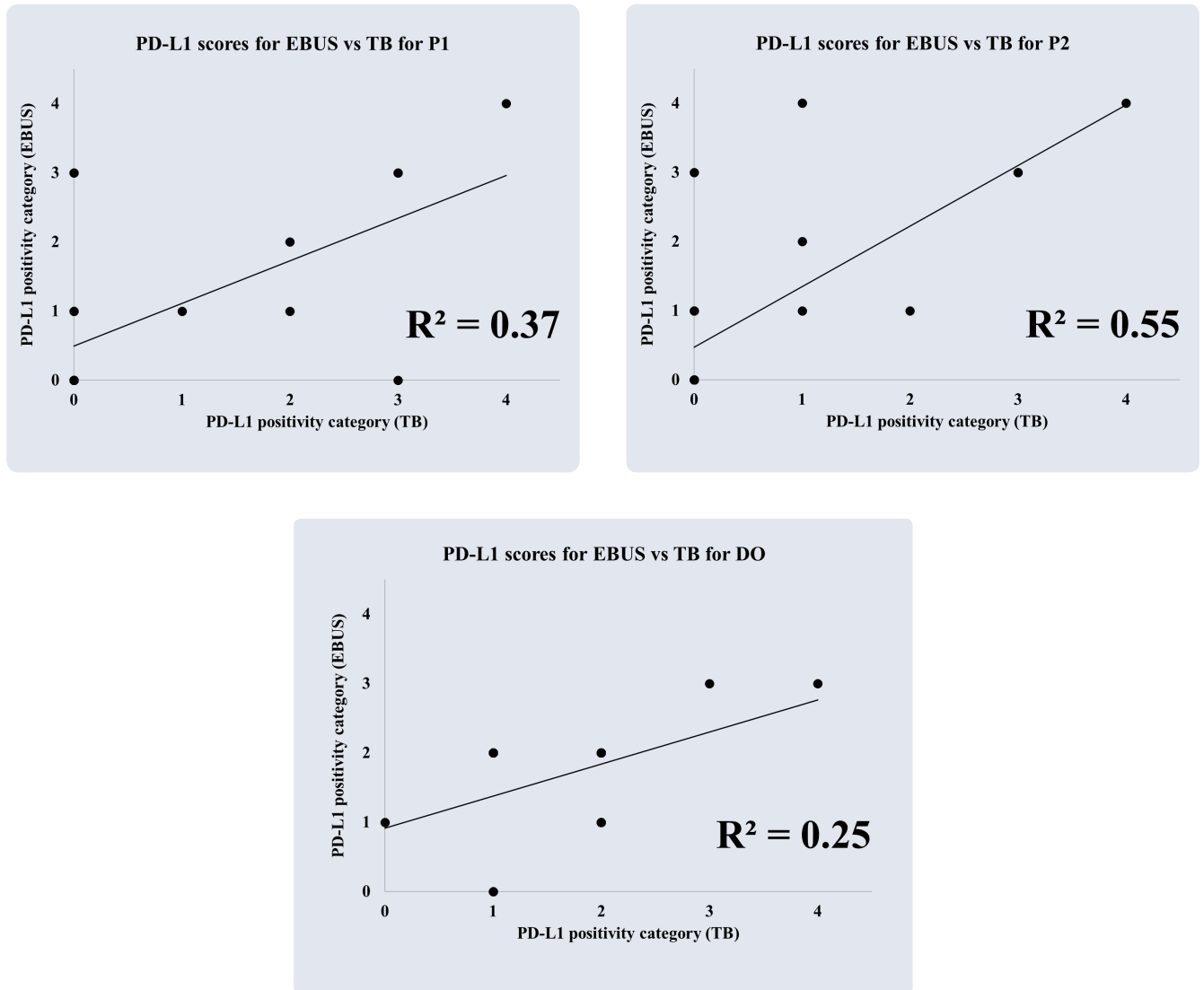
Correlacionamos el puntaje asignado en biopsias transbronquiales y en EBUS-TBNA usando coeficientes de regresión lineal ( $R^2$ ) y analizamos su concordancia entre ambos patólogos y el operador digital (DO) usando correlación intraclase (ICC). Todos los tests fueron pareados.

### Resultados

P1 and P2 rechazaron 2 y 3 muestras obtenidas por EBUS por ser insuficientes de acuerdo con los criterios de inclusión definidos, respectivamente. Un caso fue

excluido del análisis digital por falta de grupos de células neoplásicas (rango de células tumorales detectadas: 380-9475 en muestras transbronquiales y 280-47237 en EBUS-TBNA). Observamos una correlación positiva leve a moderada entre el puntaje para PD-L1 asignado en las muestras de biopsias transbronquiales y por EBUS-TBNA. Existió concordancia elevada entre patólogos, sin embargo el acuerdo fue sólo moderado entre el puntaje asignado por patólogos y el operador digital (figura 2 y tabla 3).

**Figura 2.** Relación entre el score de PD-L1 para biopsias transbronquiales (TB) y EBUS asignado por 2 patólogos y un operador digital (A-C). R<sup>2</sup>: coeficiente de regresión lineal.

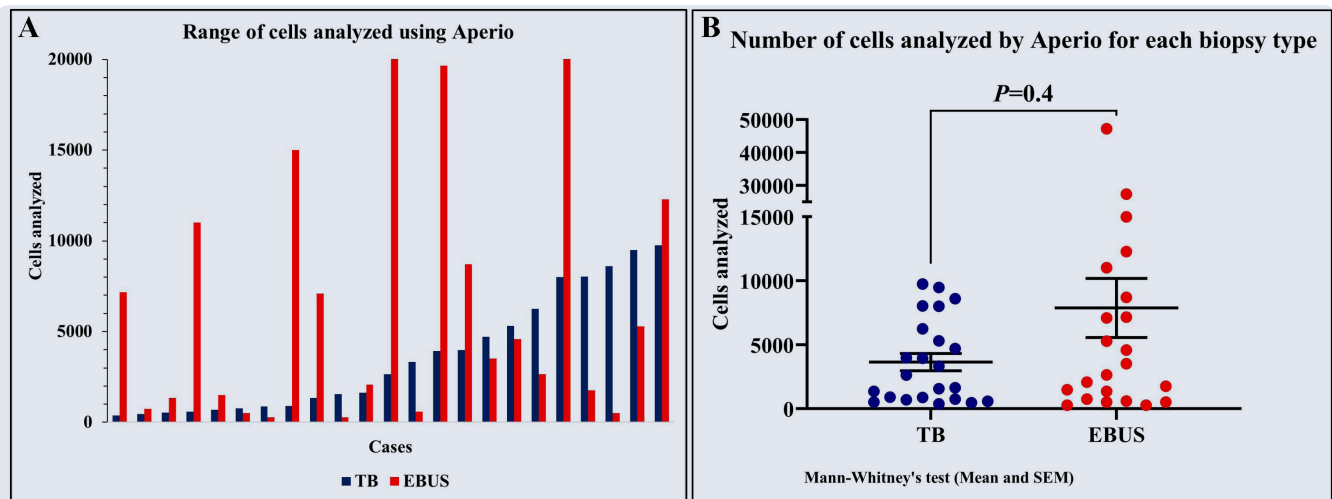


**Tabla 3.** Análisis de concordancia (correlación intraclase) para 3 observadores en biopsias transbronquiales (TB) y EBUS.

	Correlación intraclase	95%Intervalo de confianza
P1 vs P1 vs P2 para TB	0,9627	0,9627
P1 vs P2 para EBUS	0,9879	0,9879
P1 vs D0 para TB	0,6433	0,6433
P2 vs D0 para TB	0,616	0,616
P1 vs D0 para EBUS	0,5374	0,5374
P2 vs D0 para EBUS	0,4891	0,4891

A su vez el análisis digital no mostró diferencias significativas entre el número de células neoplásicas presentes en las muestras de biopsias transbronquiales y en las obtenidas por EBUS-TBNA (figura 3).

**Figura 3.** A. Distribución del número de células analizado por algoritmo automatizado. B. Comparación del total de células analizado usando análisis objetivo para biopsias transbronquiales y EBUS.



## Conclusiones

En nuestro trabajo definimos un flujo de análisis cuantitativo automatizado de tinción inmunohistoquímica contra PD-L1 en biopsias transbronquiales y obtenidas por EBUS-TBNA en NSCLC y comparamos su rendimiento con el método tradicional semicuantitativo llevado a cabo por patólogos.

Destacamos dentro de nuestras observaciones la elevada concordancia entre patólogos en el score asignado y la ausencia de diferencias significativas entre el número de células neoplásicas evaluables presentes en las biopsias transbronquiales y en las obtenidas por EBUS-TBNA, lo que sugiere que las muestras pequeñas también son adecuadas para el estudio de la expresión de marcadores predictivos de inmunoterapia. Sin embargo, dada la presencia de correlación sólo leve a moderada en los puntajes obtenidos entre ellas indica que podrían aportar diferente información.

Finalmente, la concordancia moderada entre el operador digital y los patólogos podría estar relacionada con la limitación en el reconocimiento del tejido tumoral seleccionado por el operador y en particular por la expresión del anticuerpo en la membrana de macrófagos además de su presencia en las células neoplásicas, no existiendo aún la posibilidad de entrenamiento de los softwares disponibles para hacer esta diferencia.

Esto indica que aún se requiere mejorar los métodos de reconocimiento para el análisis con métodos cuantitativos automatizados antes de ser empleados en la estimación de expresión de marcadores predictivos como PD-L1, probablemente no sólo en muestras pequeñas.

## Referencias

1. Navani N, Nankivell M, Lawrence DR, Lock S, Makker H, Baldwin DR, Stephens RJ, Parmar MK, Spiro SG, Morris S, et al. Lung cancer diagnosis and staging with endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration compared with conventional approaches: an open-label, pragmatic, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2015 Apr; 3(4):282-9.
2. Mc Lean AEB, Barnes DJ, Troy LK. Diagnosing Lung Cancer: The Complexities of Obtaining a Tissue Diagnosis in the Era of Minimally Invasive and Personalised Medicine. *J Clin Med.* 2018 Jun 29;7(7).
3. VanderLaan PA, Wang HH, Majid A, Folch E. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA): an overview and update for the cytopathologist. *Cancer Cytopathol.* 2014 Aug;122(8):561-76.
4. Teixidó C, Karachaliou N, González-Cao M, Morales-Espinosa D, Rosell R. Assays for predicting and monitoring responses to lung cancer immunotherapy. *Cancer Biol Med.* 2015 Jun; 12(2):87-95.
5. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;372:2018-28.
6. Reck M et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016 Nov 10;375(19):1823-1833.
7. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373:1627-39.

8. Rizvi NA, Mazieres J, Planchard D, et al. Activity and safety of Nivolumab, an anti-programmed death-protein 1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* 2015;16:257–65.
9. Ilie M, Hofman V, Dietel M, et al. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch.* 2016 May;468(5):511-25.
10. Sakakibara R, Inamura K, Tambo Y et al. EBUS-TBNA as a Promising Method for the Evaluation of Tumor PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2017 Sep;18(5):527-534.
11. Fernandez-Bussy S, Pires Y, Labarca G et al. PD-L1 Expression in a Non-Small Cell Lung Cancer Specimen Obtained by EBUS-TBNA. *Arch Bronconeumol.* 2018 May;54(5):290-292.
12. Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG et al. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *J Thorac Oncol.* 2015;10:985–9.
13. Mansfield AS, Murphy SJ, Peikert T et al. Heterogeneity of programmed cell death-ligand 1 expression in multifocal lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2015
14. Sheng J, Fang W, Yu J et al. Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2016;6:20090.
15. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373:123–35
16. McLaughlin J, Han G, Schalper KA et al. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of programmed death-ligand 1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2016;2:46–54
17. Rehman JA, Han G, Carvajal-Hausdorf DE et al. Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer. *Mod Pathol.* 2017 Mar;30(3):340-349.
18. Carvajal-Hausdorf DE, Schalper KA, Puztai L et al. Measurement of Domain-Specific HER2 (ERBB2) Expression May Classify Benefit From Trastuzumab in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015 May 19;107(8).





## Artículo de Revisión

# Correlación cito-histológica de la punción con aguja fina en lesiones de glándula salival

### **Dra. Jeannie Slater Morales**

Unidad de Anatomía Patológica

Departamento de Laboratorio Clínico, Banco de Sangre y Anatomía Patológica

Clínica Alemana de Santiago, Facultad de Medicina Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

### **Dra. Carolina Whittle Pinto**

Departamento de Imágenes

Clínica Alemana de Santiago, Facultad de Medicina Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

### **Francisco Pérez Blanco, PhD (c)**

Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Biomarcadores

Unidad de Anatomía Patológica, Departamento de Laboratorio Clínico, Banco de Sangre y Anatomía Patológica

Clínica Alemana de Santiago, Facultad de Medicina Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

Contacto: [jslater@alemana.cl](mailto:jslater@alemana.cl)

### **Abreviaciones**

PAF-US: Punción aspirativa por aguja fina guiada por ultrasonografía

MSRSGC: Sistema de Milán para el Informe de Citopatología de Glándula Salival

OMS: Organización Mundial para la Salud

### **Resumen**

**Objetivos.** Categorizar resultados de las punciones por aguja fina de glándula salival de acuerdo a la Clasificación de Milán para el Informe Citológico de Lesiones de Glándula Salival (MSRSGC) y correlacionar los hallazgos con el diagnóstico histopatológico.

**Método.** Se realizó un estudio retrospectivo de 114 punciones de glándula salival obtenidas entre los años 2010-2016; 66 casos fueron correlacionados con biopsia quirúrgica.

**Resultados.** Un total de 112 casos fueron adecuados para examen. La sensibilidad calculada de la punción fue de un 70%, con una especificidad de 100%.

**Conclusión.** La PAF es un procedimiento diagnóstico de gran utilidad en el diagnóstico de malignidad de tumores de glándula salival, que permite establecer el tratamiento más adecuado e individualizado para cada paciente.

### **Introducción**

Los tumores de glándula salival constituyen aproximadamente el 3% de los tumores de cabeza y cuello. La mayor parte de ellos son benignos (80%). El diagnóstico definitivo de un tumor debe ser realizado en el examen histopatológico de la lesión. La punción aspirativa por aguja fina guiada por ultrasonografía (PAF-US) es un procedimiento reconocido para la aproximación diagnóstica de lesiones de glándula salival, es útil para diferenciar lesiones no neoplásicas de neoplásicas, y permite además aproximarse a diagnósticos específicos de las lesiones benignas y malignas más comunes. Sin embargo, la interpretación de los hallazgos puede ser un desafío debido a la diversidad de tumores de glándula salival, la heterogeneidad de un

tumor y la sobreposición de características morfológicas entre distintos tipos tumorales. A esto se suman nuevas entidades reconocidas en la Clasificación de Tumores de Cabeza y Cuello de la OMS<sup>(1)</sup>. Usualmente el diagnóstico de lesiones de glándula salival de muestras obtenidas por PAF era descriptivo.

El Sistema de Milán para el Informe de Citopatología de Glándula Salival (MSRSGC), recientemente publicado<sup>(2-3)</sup>, tiene como objetivo estandarizar la terminología para el informe y mejorar la comunicación entre clínicos y patólogos. El objetivo del presente trabajo es describir los resultados de PAF-US realizados en nuestra institución, reclasificarlos de acuerdo con los criterios propuestos por la Clasificación de Milán y correlacionar los hallazgos con el diagnóstico histopatológico en biopsia quirúrgica.

## Materiales y métodos

Ciento catorce (114) PAF-US, obtenidas de los registros de Anatomía Patológica de Clínica Alemana, fueron retrospectivamente evaluadas (2010-2016). Las muestras fueron obtenidas por radiólogos, utilizando una aguja 19G aplicando presión negativa hasta la formación de un coágulo. En ninguno de los casos se realizó evaluación rápida intraprocedimiento. El material aspirado fue fijado en formaldehído al 10% e incluido en parafina. Con el material

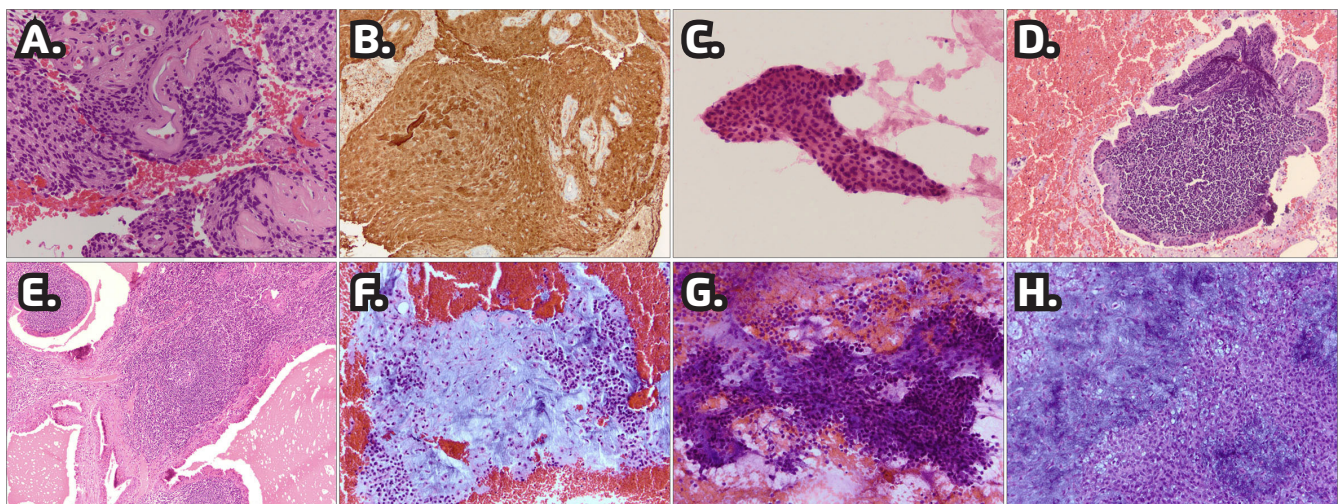
restante de la punción, se realizaron tres extendidos citológicos en promedio. Las láminas histológicas y citológicas fueron teñidas con H&E para su evaluación y categorización diagnóstica. En 66 casos estuvo disponible material de biopsia para la correlación citohistológica.

Para el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, los casos sospechosos y malignos fueron considerados positivos, y los casos negativos y neoplasia benignas como negativos.

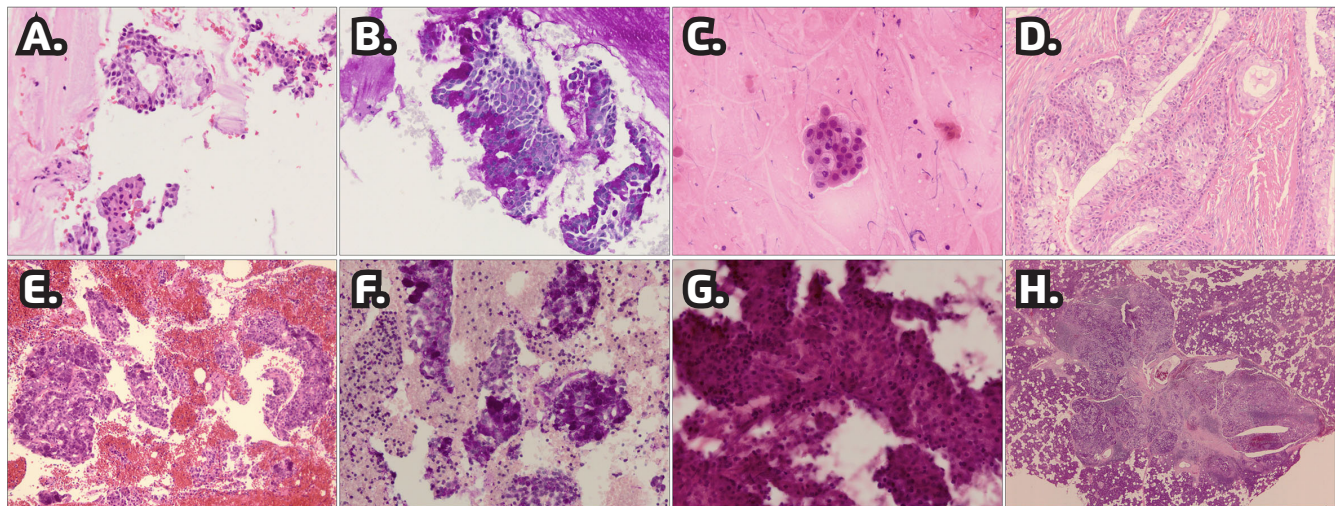
## Resultados

Un total de 114 muestras obtenidas por aspiración con aguja fueron revisadas. La edad promedio de los pacientes fue 53 años (rango 8 – 85 años), 54 eran hombres y 60 mujeres. 96 (84%) punciones correspondieron a nódulos sólidos, 14 (12%) a lesiones quísticas y 4 (4%) a lesiones sólido-quísticas. 106 (93%) lesiones fueron parotídeas y 8 (7%) submaxilares. El diagnóstico de cada punción fue reclasificado de acuerdo a los Criterios de Milán<sup>(2-3-4)</sup>, resultando 5 (4,3%) casos no diagnósticos, 20 (17,5%) casos negativos para neoplasia, 4 (3,5%) atípicos, 66 (57,8%) casos neoplásicos benignos (Figura 1), 9 (7,8%) neoplásicos de potencial maligno incierto, y 10 (8,7%) neoplásicos malignos (Figura 2). No se clasificaron lesiones como sospechosas de malignidad (Tabla 1).

**Figura 1.** Categoría IVA de Milán: Schwannoma. **1A.** HE, 20x. Coágulo. Neoplasia fusocelular. Se observa hialización perivascular. **1B.** 20x Tinción Inmunohistoquímica para S-100. Se observa positividad difusa. Categoría IVA de Milán: Tumor de Warthin. **1C.** HE, 20x. Extendido citológico con lámina de células oncócicas. **1D.** HE, 20x. Coágulo con fragmento de lesión con estroma rico en linfocitos revestido por una bicapa epitelial de células oncócicas. **1E.** HE, 20x. Biopsia quirúrgica: Tumor de Warthin. Categoría IVA de Milán: Adenoma Pleomorfo. **1F.** HE, 20x. Coágulos con fragmento de lesión neoplásica con abundante estroma mixoide, en partes fibrilar en el que se disponen láminas de células epiteloides y fusiformes. **1G.** HE, 20x. Extendido citológico con grupo tridimensional de células fusiformes entremezcladas con matriz fibrilar y mixoidea. **1H.** HE, 20x. Biopsia quirúrgica: Adenoma Pleomorfo, con estroma mixoide.



**Figura 2.** Panel superior, Categoría VI de Milán: Carcinoma Mucoepidermoide. **2A.** HE, 40x. Coágulo con grupos de células epiteliales intermedias y escamosas con leve atipia citológica y células mucosas. **2B.** PAS, 40x. Tinción positiva en células mucosas. **2C.** HE, 40x. Extendido citológico con grupos de células intermedias y mucosas, con leve atipia. **2D.** HE, 20x. Biopsia quirúrgica: Carcinoma mucoepidermoide de bajo grado. Panel inferior, Categoría VI de Milán: Carcinoma de células acinares. **2E.** HE, 20x. Coágulo. Nidos sólidos de células epiteliales con citoplasma densamente granular, basófilo, núcleos redondeados con leve atipia. **2F.** PAS, 20x. Tinción positiva en gránulos basófilos. **2G.** HE, 40x. Extendido citológico con grupos de células neoplásicas con leve sobreposición y mínima atipia. **2H.** HE, 10x. Biopsia quirúrgica: Carcinoma de células acinares.



**Tabla 1.** Clasificación de PAF-US basado en MSRSGC. MSRSGC: Sistema Milán para en reporte de Citología de Glándula Salival, AUS: atipia de significado indeterminado, SUMP: Neoplasia de potencial maligno incierto, SM: Sospechoso de malignidad.

MSRSGC	Nº de PAF, %	Nº biopsias,%	Nº malignos ROM,%
I: No diagnóstico	5 (4,3)	2 (3)	1 (50%)
II: No neoplásico	20 (17,5)	4 (6)	0 (0)
III: AUS	4 (3,5)	3 (4,5)	1 (33)
IVA: neoplasia benigna	66 (57,8)	43 (65,1)	1 (2,3)
IVB: SUMP	9 (7,8)	7 (10,6)	2 (28,5)
V: SM	0 (0)	0	0 (0)
VI: Maligno	10 (8,7)	7 (10,6)	7 (100)
Total	114 (100)	66 (57,8)	19 (28,7)

En 66 casos se contó con el material de biopsia. 51 (77%) casos corresponden a neoplasias benignas, 8 (12%) a neoplasias malignas. Todas las lesiones diagnosticadas como neoplasias malignas por PAF-US fueron confirmadas como tales en la biopsia quirúrgica. No se encontraron neoplasias malignas en las biopsias quirúrgicas de las lesiones informadas como no neoplásicas en la PAF-US. Una de las muestras clasificada como no satisfactoria en la PAF-US fue diagnosticada como carcinoma adenoide quístico en la biopsia quirúrgica. Hubo un caso falso negativo categorizado como neoplásico benigno, que en

la biopsia quirúrgica correspondió a un Carcinoma NOS de Bajo Grado. En el grupo no neoplásico hubo dos lesiones tumorales benignas, ambas corresponden a un tumor de Warthin.

La sensibilidad calculada de la PAF-US fue de un 70%, con una especificidad de 100%, considerando al Grupo IV en una sola categoría diagnóstica. El valor predictivo positivo fue 100%, y el valor predictivo negativo fue de 94% (Tabla 2). Sólo se registró una complicación derivada del procedimiento de punción.

**Tabla 2.** Rendimiento de la Punción Aspirativa por Aguja Fina para la Detección de Neoplasias Malignas. SUMP: Neoplasia de potencial maligno incierto, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo.

Evaluación de rendimiento diagnóstico	Neoplasia Benigna + SUMP
Sensibilidad	70%
Especificidad	100%
VPP	100%
VPN	94.1%

## Discusión

La PAF-US constituye un método mínimamente invasivo, ampliamente aceptado como primera aproximación diagnóstica a las lesiones de glándula salival, que entrega información útil para el manejo clínico de los pacientes. Sin embargo, la interpretación de los hallazgos morfológicos puede ser un desafío debido a la diversa morfología de las lesiones neoplásicas de la glándula salival. El objetivo de MSRSGC es entregar un diagnóstico estandarizado con énfasis en el riesgo de malignidad. El riesgo de malignidad para cada categoría estimada por los autores de MSRSGC<sup>(4)</sup> es de 25% para no diagnóstico, 10% para lesiones no neoplásicas, 20% para atipia de significado indeterminado, menos del 5% para neoplasia benignas, 35% para neoplasias

de potencial maligno incierto, 60% para sospechosos de neoplasia maligna y 90% para neoplasias malignas. No obstante, recientes publicaciones muestran rangos más amplios para las distintas categorías. En este estudio, el riesgo de malignidad para la categoría no neoplásica y neoplásica benigna fue de 0 y 2,3%. Se encontraron tres falsos negativos (Tabla 3), que en biopsia quirúrgica correspondieron a carcinomas de bajo grado. Dos de ellos se clasificaron como neoplasia de potencial maligno incierto y uno como neoplasia benigna. La neoplasia más común fue el Adenoma Pleomorfo (48,4%). El riesgo de malignidad de la categoría maligna fue de 100%, lo que es más alto que lo propuesto por MSRSGC. No hubo falsos positivos en esta serie de casos.

**Tabla 3.** Falsos negativos en las Categorías diagnósticas Benigna y Neoplasia de potencial maligno incierto. PAF: Punción aspirativa por aguja fina, SUMP: Neoplasia de potencial maligno incierto, AUS: atipia de significado indeterminado, MALT: tejido linfoide asociado a mucosa.

Sexo	Edad	Tipo de lesión	Localización	Diagnóstico PAF	Biopsia
F	69	sólida	parótida	SUMP	Adenocarcinoma de bajo grado
F	55	sólida	parótida	Neoplasia benigna	Adenocarcinoma de bajo Grado
F	48	sólida	submaxilar	AUS	Linfoma MALT

La categoría atipia de significado indeterminado, corresponde a un grupo heterogéneo de lesiones que varía desde lesiones benignas a malignas. En nuestra serie, de los 3 casos diagnosticados como atípicos, uno en la biopsia quirúrgica correspondió a un Linfoma no Hodgkin de bajo Grado (MALT) y los dos restantes correspondieron a quistes linfoepiteliales. En otras series publicadas en esta categoría, el diagnóstico histológico más frecuente es linfoma. Nuestros casos atípicos<sup>(5)</sup> dan cuenta del 3,5% de los diagnósticos y el riesgo de malignidad fue de 33%. Nuestra técnica de procesamiento de la muestra, entrega resultados que son concordantes con los reportados en la

literatura en cuanto a especificidad y sensibilidad (100% y 70%, respectivamente), además de presentar un alto grado de concordancia diagnóstica para las lesiones benignas y malignas<sup>(6-7-8)</sup>. Los resultados de esta revisión permiten planificar con seguridad el mejor abordaje terapéutico para los pacientes, ya que el riesgo de malignidad de las lesiones diagnosticadas como benignas permiten plantear seguimiento clínico o cirugía, reservar la biopsia intraoperatoria<sup>(9-10)</sup> para los casos atípicos, neoplasias de potencial maligno incierto, y neoplasias malignas en las que sea necesario evaluar condición de bordes quirúrgicos. Adicionalmente, es posible anticipar el estudio de neoplasias

linfoides con técnicas como citometría de flujo. Una ventaja comparativa encontrada fue la menor proporción de muestras no satisfactorias (4,3%), en comparación con lo reportado en la literatura.

## Referencias

1. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th Edition. International Agency for Research on Cancer, Lyon 2017.
2. Wang H, Fundakowski C, Khurana J, et al. Fine-Needle Aspiration Biopsy of Salivary Gland Lesions. *Arch Pathol Lab Med.* 2015 Dec; 139: 1491-1497.
3. The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology, American Society of Cytopathology. Springer, 2018.
4. Rossi ED, Baloch Z, Puztaszeri M. The Milan system for reporting salivary gland cytopathology (MSRSGC): an ASC-IAC sponsored system for reporting salivary gland fine -needle aspiration. *Journal of the American Society of Cytopathology.* 2018; 7 11-118.
5. Wu HH, Alruwaili F, Zeng B et al. Application of the Milan System for reporting Salivary Gland Cytopathology. *Am J Clin Pathol.* Jun 2019;151:613-621.
6. Fundakowski C, Castaño J, Abouyared M, et al. The role of indetermined fine needle aspiration biopsy in clinical decision-making for parotid masses. *Laryngoscope.* 2014; 124 (3):678-681.
7. Schmidt RL, Hall BJ, Wilson AR, et al. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of fine- needle aspiration cytology for parotid gland lesions. *Am J Clin Pathol.* 2011;136: 45-49.
8. Carrie C, Jethwa AR, Khariwala SS, et al. Specificity and Posttest Probability of Parotid Fine-Needle Aspiration: A Systematic Review and Meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2016 Jan; 154 (1): 9-23.
9. Schmidt RL, Hunt JP, Hall BJ. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of frozen section for parotid gland lesions. *Am J Clin Pathol.* 2011;136:729-738.
10. Olsen KD, Moore EJ, Lewis JE. Frozen Section Pathology for Decision making in parotid surgery, *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013; 139(12):1275-1278.

## Normas Editoriales

### CONTACTO CIENTIFICO

#### I. PREPARACION DE UN ARTICULO

Los autores deben preparar manuscritos de acuerdo con los requerimientos definidos por el Comité Internacional de Editores de Revistas Biomédicas (ICMJE), que pueden ser consultados en Ann Intern Med. 1997;126:36-47 o [www.icmje.org](http://www.icmje.org). Los reportes de ensayos controlados y randomizados deben cumplir con la normativa de inscripción y diseño correspondiente, que puede ser consultado en Ann Intern Med. 2001;134:657-662.

El manuscrito debe estar escrito en letra Times New Roman, tamaño 12, a doble espacio y debe ordenarse de la siguiente manera (1) página del título (2) resumen, (3) lista alfabética de abreviaciones usadas al menos tres veces en el cuerpo del manuscrito y en resumen, figuras y tablas, (4) texto con encabezados apropiados y conclusiones, (5) agradecimientos, (6) referencias, (7) figuras (8) leyendas de las figuras (con lista alfabética de abreviaciones), y (9) tablas (con lista alfabética de abreviaciones).

El texto del manuscrito debe ser enumerado en forma consecutiva, incluyendo el nombre del primer autor y el texto debe contenerse en un archivo procesable por Word. Las tablas pueden ser hechas con el mismo programa Word, y ubicarlas al final del manuscrito. Los esquemas, gráficos y algoritmos pueden ser hechos y enviados en Word, PowerPoint o Adobe Illustrator. Las figuras deben ser guardadas como formato jpg, gif, o tiff a un mínimo de 300 dpi y no deben insertarse en el texto del manuscrito, sino que deben guardarse como archivo separado.

#### **Página del título**

**Título:** Formular un título que refleje el contenido del artículo.

**Autores:** Incluir apellidos y nombre, grado académico, departamento e institución a la que pertenece.

**Financiamiento y conflictos de interés:** indicar si existió financiamiento y ayuda material para la investigación o trabajo descrito en el manuscrito (ej. número de Grant, agencia financiante, a quiénes).

Reimpresiones y correspondencia: incluir nombres, dirección, e-mail del autor a quien se dirigirán estos requerimientos.

#### **Resumen o Abstract**

Abstract de 200 palabras y un resumen en términos sencillos ("plain language summary") de 50 palabras que describa el objetivo del estudio y su resultado principal.

Se debe organizar en un formato estructurado, con los siguientes encabezados: Objetivo, Pacientes y métodos, Resultados y Conclusión.

--Asegurar que la información en cada sección del resumen, está contenida en la correspondiente sección del texto.

--En la sección "Pacientes y métodos" del resumen y del texto, incluir las fechas completas que abarcó el estudio.

--Incluir el número de registro de Ensayo clínico, al final del resumen, si es el caso.

#### **Texto**

Los artículos originales deben considerar un máximo total de 2000 palabras, la introducción un máximo de 250 palabras y la discusión de 500.

No debe ser superior a 2000 palabras en el resto de los artículos.

En la introducción mencionar los antecedentes disponibles respecto del tema de estudio, establecer el objetivo de la investigación o revisión y plantear la hipótesis de trabajo.

--Abreviar un término sólo si es utilizado al menos tres veces en el texto y definirlo la primera vez que se menciona.

En la sección de pacientes (o materiales) y métodos describir las características del grupo de estudio o del caso clínico, los criterios de inclusión/exclusión, los equipos y/o fármacos utilizados, la probación del comité de ética local.

si corresponde, el consentimiento informado de los participantes y el tipo de análisis estadístico.

--Expresar medidas en Unidades convencionales, entregando el factor de conversión a Unidades del Sistema Internacional.

--Entregar valores exactos de  $p$ , incluso si no son significativos. Redondear valores de  $p$  a dos dígitos, si los primeros dos números después del decimal son ceros, entonces redondear a tres números. El menor valor de  $p$  a reportar es  $p < 0.001$  y el mayor  $p > 0.99$ .

--Usar nombres genéricos para fármacos y equipos. Si piensa que es importante usar un nombre de producto, indique manufactura y lugar donde fue producido, entre paréntesis.

--Los símbolos genéticos aprobados, descripciones y equivalencias pueden encontrarse en [www.genenames.org](http://www.genenames.org).

--Para mutaciones genéticas, ver sitio web HGVS ([www.hgvs.org](http://www.hgvs.org) o <http://www.hgvs.org/rec.html>).

En la sección de resultados, describir los principales hallazgos de forma lógica, con especial mención a los datos relevantes que pueden estar contenidos en tablas o gráficos. Evite duplicar la información en tablas y gráficos.

En la sección de discusión, analizar los resultados en relación a la información previamente publicada y sus limitaciones, destacando los aspectos importantes del estudio que puedan concluirse en atención al diseño del estudio.

De acuerdo a la modalidad del manuscrito, el texto debe contener diferentes secciones:

--En los trabajos originales, debe incluir las secciones de: Introducción, Pacientes y métodos, Resultados y Discusión.

--En los casos clínicos, debe incluir las secciones de: Introducción, Descripción del caso y Discusión.

--En las revisiones, debe incluir las secciones de: Introducción y Desarrollo del tema.

## Agradecimientos

El autor debe asegurar que se ha obtenido permiso de quienes se agradecerá.

## Referencias

Los autores son responsables de la certeza de sus referencias y de su completa cita en el texto. No incluir más de 35 referencias, priorizando aquellas más relevantes. La cita de referencias, en el texto, figuras y tablas deben ser consecutivas como aparecen en el manuscrito, utilizando número superíndice.

En la lista de referencias, incluir apellidos e iniciales del nombre de todos los autores (si son más de 6, enumerar tres y agregar "et al"), el título, fuente (las abreviaciones de revistas están contenidas en el index medicus), año, volumen, número y rango de páginas.

--Para el estilo apropiado de referencias, consultar: American Medical Association Manual of Style: A Guide for Authors and Editors, 10th ed. New York, NY; Oxford University Press; 2007:39-79.

### --Ejemplos.

Revistas (Impresas)

1. Rainier S, Thomas D, Tokarz D, et al. Myofibrillogenesis regulator 1 gene mutations cause paroxysmal dystonic choreoathetosis. *Arch Neurol*. 2004;61(7):1025-1029.

### Revistas (Online)

2. Duchin JS. Can preparedness for biologic terrorism save us from pertussis? *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004;158(2):106-107. Available at <http://archpedi.ama-assn.org/cgi/content/full/158/2/106>. Accessed June 1, 2004.

3. Kitajima TS, Kawashima SA, Watanabe Y. The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature*. 2004;427(6974):510-517. doi:10.1038/nature02312.

### Capítulos

4. Bithell TC. Hereditary coagulation disorders. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Vol 2. 9th ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger; 1993:1422-1472.

### Libros

5. Guyton AC. *Textbook of Medical Physiology*. 8th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Co; 1991:255-262.

### Web

6. International Society for Infectious Diseases. ProMED-mail Web site. [www.promedmail.org](http://www.promedmail.org). Accessed April 29, 2004.

En caso de citar comunicaciones personales (orales o escritas) y datos no publicados previamente, citarlos entre paréntesis en el texto e incluir fecha. No anotar en las referencias y asegurar que se ha obtenido el permiso necesario. Evitarlos, si es posible.

## Tablas

Numerar las tablas en forma consecutiva, en el orden de cita en el texto. Escribir a doble espacio, cada tabla en una página separada. Designar un título para cada tabla y definir todas las abreviaciones usadas en la tabla, en una nota al pie.

- Usar letras minúsculas superíndice (a-z) para las notas al pie de la tabla.
- No enviar tablas como imágenes.

## Figuras

Se deben citar todas las figuras en el texto y numerarlas en el orden de aparición. En la leyenda de la figura, realizar la descripción correspondiente, en hoja aparte. Incluir

definiciones de cualquier abreviación que aparezca en la figura, permisos y cita apropiada.

- Usar símbolos superíndice (\*, #, †) para las notas al pie de la figura.
- Para microfotografías, especificar tinción y magnificación original.
- Para cualquier figura con un paciente reconocible, debe contar con el consentimiento del paciente.
- Las figuras obtenidas de una fuente sin derechos de autor requieren permiso de la fuente de publicación, o bien ocultar facciones que permitan su reconocimiento.

## Permisos

El uso de gráficos, tablas y figuras previamente publicados no está permitido, excepto cuando existe permiso formal para ello del autor original o de la fuente de publicación. La falta en la entrega de los permisos apropiados retrasará la publicación o necesitará la omisión de una figura o tabla en la cual no se ha recibido el permiso.

## II. Secciones y Contenidos

Sección	Abstract	Nº palabras	Ref.	Figuras y tablas
Alerta	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Buenas Prácticas Clínicas	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Casos Clínicos	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Campañas	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Controversias	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Cursos y Congresos	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Editorial	-----			
Ética Médica	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Estado del Arte	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Farmacología	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Guías y Protocolos	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Investigación	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Lectura Crítica	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Links - Videos	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Medicina Traslacional	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Noticias	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Perlas	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Publicaciones CAS-UDD Estructurado	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Quiz	-----	200		
Tips para publicar	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Temas	250 palabras	2000	35	Máximo 3
Trabajos originales	200 + 50 plain language summary	2750	50	Máximo 3



### III. Revision y Aceptación

#### Envío de revisiones

Reenvíe su artículo seguido con "R1" en caso de ser primera revisión o "R2" en caso de segundo análisis. Adjunte un breve comentario respondiendo a los alcances presentados por los revisores, una copia del texto con control de cambios y una copia con formato definitivo.

Recibirá un e-mail confirmando la recepción de los archivos corregidos.

#### Aceptación

Si su artículo es aceptado para publicación, éste debe ser editado en base a las normas dictadas en American Medical

Association Manual of Style: A Guide for Authors and Editors, 10th ed. New York, NY; Oxford University Press; 2007:39-79). El autor principal recibirá una copia diagramada en formato pdf para su visto bueno previo a publicación.

#### IV. Monografías

El último número de cada volumen estará destinado a un tema monográfico que incluirá Editorial, Introducción y al menos 6 artículos originales o de referencia, más un capítulo de conclusiones.

#### V. Conflictos de Interés

Potenciales conflictos de interés de los autores deben ser explícitos en el documento enviado para publicación.

