

Capacidad discriminativa del software ImageJ para el cálculo del índice de proliferación celular en linfoma B difuso de células grandes.

Pablo Alejandro Reyes Cárdenas

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de Especialista en Patología

Director

Jorge Andrés García Vera

MD Patólogo especialista en hematopatología.

Universidad industrial de Santander

Facultad de salud

Escuela de medicina

Especialización en patología

Bucaramanga

2022

Tabla de contenido

Introducción	9
1. Objetivos.	13
1.1 Objetivo General:	13
1.2 Objetivos Específicos:	13
2 .Estado del arte.....	14
2.1 Tejidos linfoides normales.....	14
2.2 Tejidos linfoides primarios.	14
2.2.1 Médula ósea.	14
2.2.2 Timo.....	16
2.3 Tejidos linfoides periféricos.	16
2.3.1 Ganglios linfáticos.	16
2.3.2 Área cortical.....	17
2.3.3 Bazo	20
2.4 Fisiología e inmunología de los linfocitos.	21
2.5 Proceso de diferenciación de células B.....	23
2.5.1 Linaje y diferenciación de células B.....	23
2.5.2 Precursores B.	23
2.6 Linfoma: generalidades.....	26
2.6.1 Etiopatogenia.	27

2.7 Linfoma B difuso de células grandes.....	31
2.7.1 Presentación clínica.	33
2.7.2 Hallazgos histopatológicos.	34
2.7.3 Inmunofenotipo.....	34
2.8 Actividad biológica de la proteína KI67.....	35
2.8.1 Inmunohistoquímica para KI67 y su utilidad clínica.....	36
2.9 Immunoratio: plugin para análisis de imágenes en patología.....	39
3 Diseño metodológico.	41
3.1 Diseño del estudio.....	41
3.2 Población.	41
3.3 Tamaño de la muestra.	41
3.3.1 Criterios de inclusión.....	42
3.3.2 Criterios de exclusión.	43
3.3.3 Definición de caso.....	43
4. Procedimientos para recolección de datos.	44
4.1 Control de calidad de datos.....	45
5. Evaluación crítica del protocolo.	47
5.1 Ventajas del diseño.	47
5.2 Consideraciones éticas.	47
6. Resultados.....	50

6.1 Captura y análisis de imágenes.	50
6.2 Variabilidad de índice de proliferación celular, conteo manual vs ImageJ.	53
6.3 Variabilidad de índice de proliferación celular, conteo manual vs patólogos 1 y 2.	54
6.4 Variabilidad de índice de proliferación celular entre patólogos.	56
6.5 Variabilidad de índice de proliferación según año de procesamiento de lámina de inmunohistoquímica.	57
7. Discusión.	60
8. Cronograma.....	64
9. Resultados esperados y potenciales beneficiarios.....	65
10. Presupuesto	66
11. Formato de recolección de datos.....	68
11.1 Instructivo	68
Bibliografía.	70

Lista de tablas.

Tabla 1. Numero de casos año en relación con la diferencia en el índice de proliferación entre ImageJ (immunoratio) y conteo manual de células.	57
Tabla 2. Número de casos año en relación con la diferencia en el índice de proliferación entre patólogo 1 y conteo manual de células.	57
Tabla 3. Número de casos año en relación con la diferencia en el índice de proliferación entre patólogo 2 y conteo manual de células.	58
Tabla 4. Número de casos en cada grupo de análisis (Diferencia <5%, Diferencia entre 5-10%, Diferencia >10%) según los métodos evaluados.	60

Listas Gráficos

Gráfico 1. Numero de casos por año incluidos en el estudio.....	50
Gráfico 2. Variabilidad en el índice de proliferación calculado por ImageJ vs el calculado por conteo manual.	53
Gráfico 3. Variabilidad del índice de proliferación celular calculado por patólogo 1 vs conteo manual.....	54
Gráfico 4. Variabilidad en el índice de proliferación calculado por patólogo 2 vs el calculado por conteo manual.	55
Gráfico 5. Diferencia entre el índice de proliferación calculado por ambos patólogos.....	56

Listas Imágenes

Imagen 1. Conteo manual de células mediante ImageJ con plugin cell counter	50
Imagen 2. Resultado de análisis digital de imagen usando ImageJ y su plugin Immunoratio.	51
Imagen 3. Página de configuración de variables plugin immunoratio.....	61

Resumen

Título: Capacidad discriminativa del software ImageJ para el cálculo del índice de proliferación celular en linfoma B difuso de células grandes*.

Autor: Pablo Alejandro Reyes Cárdenas, MD**.

Palabras clave: Linfoma B difuso de células grandes; antígeno KI67; análisis de imagen asistido por computadora; Immunoratio.

descripción:

El Ki67 es una proteína nuclear que refleja el índice de proliferación celular (IPC), se relaciona con el grado y pronóstico de diferentes neoplasias linfoproliferativas. Su cuantificación se efectúa mediante observación por patólogo, dependiente de experiencia intra e interobservador, o mediante conteo manual de células (CMC), método dispendioso. El análisis de imágenes digital (AID) es una herramienta que permitiría su cuantificación rápida y objetiva, sin embargo, ha sido poco usada en el campo de la hematopatología.

Objetivos: Determinar la utilidad del AID para el cálculo de IPC mediante inmunohistoquímica Ki67 en 128 casos de linfoma B difuso de células grandes (DLBCL-NOS)

Materiales y métodos: Estudio observacional analítico de corte transversal en el periodo de enero 2016 a marzo 2019, con datos de 18 casos de DLBCL-NOS con informe de IPC calculado de forma visual mediante tinción de inmunohistoquímica Ki67 en el departamento de patología del Hospital Universitario de Santander y el laboratorio de patología Isabel Bolívar.

Se realizó CMC y AID con software Image J a fotografías obtenidas de 5 campos representativos de cada caso, indicados por hematopatólogo experto, para el cálculo de IPC medido por Ki67

Se comparó el IPC obtenido por: análisis digital de imágenes, informe de patología (análisis visual) y conteo manual de células.

* Trabajo de grado para optar por el título de Especialista en Patología.

** Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Departamento de Patología. Director: Jorge Andrés García Vera, M.D.

Abstract

Title: Discriminative capacity of ImageJ software to calculate the cell proliferation index in diffuse large B-cell lymphoma*.

Author: Pablo Alejandro Reyes Cárdenas, MD**.

Keywords: Diffuse large B-cell lymphoma; KI67 antigen; computer assisted image analysis; Immunity.

Description:

Ki67 is a nuclear protein that reflects the cell proliferation index (CPI), is related to the grade and prognosis of different lymphoproliferative neoplasms. Its quantification is carried out by observation by a pathologist, dependent on intra- and inter-observer experience, or by manual cell counting (CMC), a costly method. Digital image analysis (DAI) is a tool that would allow rapid and objective quantification, however, it has been little used in the field of hematopathology.

Objectives: To determine the usefulness of AID for the calculation of IPC by Ki67 immunohistochemistry in 128 cases of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL-NOS).

Materials and methods: Cross-sectional analytical observational study in the period from January 2016 to March 2019, with data from 18 cases of DLBCL-NOS with IPC report calculated visually by Ki67 immunohistochemical staining in the pathology department of the University Hospital. of Santander and the pathology laboratory Isabel Bolívar.

CMC and AID were performed with Image J software on photographs obtained from 5 representative fields of each case, indicated by an expert hematopathologist, for the calculation of IPC measured by Ki67

The CPI obtained by: digital image analysis, pathology report (visual analysis) and manual cell count were compared.

* Thesis to opt for the Title of *Specialist in Pathology*.

** Facultad de Salud, School of Medicine, Department of Pathology. Director: Jorge Andrés García Vera, M.D.

Introducción

En los órganos linfoides primarios y secundarios se lleva a cabo la diferenciación y capacitación de las células linfoides (células B, Linfocitos T y células NK), involucradas directamente en los procesos de inmunidad celular y humoral(1). Estos procesos son complejos e involucran la expresión de numerosos factores reguladores, factores de transcripción, receptores de membrana, así como de la secreción de quimioquinas, que favorecen la interacción entre los distintos tipos de linfocitos y otras células, a través de receptores de membrana específicos, siendo modificadas por distintos factores genéticos, inflamatorios y ambientales, que pueden desencadenar una variedad de procesos patológicos(2), dentro de los cuales, las neoplasias linfoproliferativas han generado gran interés por su morbilidad, mortalidad, distribución etaria (que va desde niños hasta adultos mayores) y alto impacto económico que conlleva su manejo. En la población adulta, los linfomas de estirpe B son las neoplasias linfoproliferativas más comunes y abarcan un grupo heterogéneo de entidades con diferencias clínicas, genéticas, morfológicas e inmunofenotípicas, las cuales permiten su clasificación histopatológica(3). Desde un punto de vista clínico los linfomas se han clasificado históricamente como linfomas de Hodgkin y linfomas no Hodgkin, sin embargo, esta es una clasificación simplificada, que no refleja el espectro completo de estas entidades.

El linfoma B difuso de células grandes es el subtipo más común de linfoma (30-40% de todos los casos de linfomas no Hodgkin)(4,5), caracterizándose por su comportamiento biológico agresivo y sus altas tasas de recurrencia. Su abordaje diagnóstico requiere de un equipo multidisciplinario, así como una adecuada correlación clínica, histopatológica,

imagenológica e inmunofenotípica, por inmunohistoquímica y/o citometría de flujo, así como con pruebas moleculares, en casos seleccionados(6).

Para el abordaje de los linfomas en particular, el análisis histopatológico y la tipificación mediante la técnica de inmunohistoquímica se consideran parte fundamental del diagnóstico y clasificación, debido a que permite la evaluación de la arquitectura, morfología celular y expresión inmunológica de ciertos marcadores nucleares que no pueden evaluarse adecuadamente con otros métodos como la citometría de flujo. Se incluye por tanto de manera rutinaria dentro del panel diagnóstico de las neoplasias linfoproliferativas un marcador de activación y proliferación celular, el Ki-67(7), un marcador nuclear tipo proteína no histona, expresada en todas las fases del ciclo celular excepto en G0, que tiene la ventaja de poder ser detectada con facilidad mediante inmunohistoquímica(8,9). Esta propiedad permite que sea utilizado en el cálculo del índice de proliferación en distintas neoplasias incluyendo linfomas, permitiendo medir la velocidad con la que una célula transformada copia su ADN y se divide en dos, parámetro relacionado con el comportamiento biológico y pronóstico(9).

El índice de proliferación celular es una medida indispensable en el estudio de la patología oncológica, por tanto, es necesario que su cálculo sea reproducible y preciso. Los métodos actuales para su estimación son: La determinación del porcentaje aproximado de positividad mediante la visualización directa por parte de un patólogo experto (la más usada) y el conteo individual de células positivas y negativas para el cálculo del porcentaje de positividad(10,11). El primer método, a pesar de ser el más usado, tiene una mayor variabilidad inter observador y su aproximación al valor real depende de la experiencia del patólogo, por lo que existe el riesgo de obtener resultados imprecisos, con las implicaciones en el diagnóstico

que esto pueda generar. El segundo método es más objetivo y se considera el estándar de oro, sin embargo, consume gran cantidad de tiempo al requerir la visualización de múltiples campos de alto poder y posterior conteo manual de células(12).

Ante la evidente importancia del índice de proliferación en la clasificación y pronóstico de diferentes neoplasias y la falta de un método rápido y objetivo, el presente trabajo propone determinar la capacidad de discriminación de un método que cumpla con estas dos características mediante la aplicación Image J, un software libre basado en Java desarrollado por el National institute of health de código libre(13), con su plugin Immunoratio desarrollado por Jorma Isola and Vilppu Tuominen en el Institute of Biomedical Technology, University of Tampere también de código libre(14).

1. Objetivos.

1.1 Objetivo General:

- Determinar la capacidad discriminativa del plugin Immunoratio para calcular el índice de proliferación con el método de inmunohistoquímica KI67 en comparación con el método de visualización directa y el estándar de oro el conteo manual de células.

1.2 Objetivos Específicos:

- Comparar del IPC calculado mediante análisis digital de imágenes con Immunoratio y el IPC determinado por el Gold estándar: conteo manual.
- Comparar del IPC calculado mediante análisis digital de imágenes con Immunoratio y el IPC determinado por el análisis visual de un patólogo experto.
- Determinar la aplicabilidad del método.
- Establecer las ventajas y desventajas que pueda tener el análisis digital de imágenes con Immunoratio para el cálculo de IPC.

2. Estado del arte.

2.1 Tejidos linfoides normales.

De acuerdo con el proceso de diferenciación de células linfoides y las interacciones funcionales que ellas presentan dividimos los tejidos linfoides en 2 compartimentos mayores: **tejidos linfoides primarios** – o centrales- tales como médula ósea y timo, y **tejidos linfoides secundarios** como lo son ganglios linfáticos, bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)[1]. Cada compartimiento tiene microambientes muy organizados con poblaciones celulares, estructuras vasculares y componentes estromales específicos; esta variedad y conformación citoarquitectural permite, entre otras cosas, la maduración y diferenciación de los linfocitos en sus diferentes etapas [2].

Los **tejidos linfoides primarios** comprenden la médula ósea y el timo, estos órganos contienen precursores linfoides, donde realizan el proceso inicial de diferenciación independiente de antígenos desde células inmaduras a su etapa de madurez [1]. Por su parte el **tejido linfoide secundario** comprende ganglios linfáticos, bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)[1], sitios donde las células linfoides maduras se exponen a antígenos y desarrollan diferentes tipos de respuestas inmunes[3].

2.2 Tejidos linfoides primarios.

2.2.1 Médula ósea.

La médula ósea es el órgano hematopoyético por excelencia donde se renuevan poblaciones de células madre, incluyendo precursores mieloides y precursores linfoides[1].

Hablando específicamente del proceso de maduración de linfocitos, los linfocitos B continúan su proceso de diferenciación en médula ósea, mientras que los linfocitos T migran tempranamente al timo donde terminaran su proceso de diferenciación[1]. La médula ósea también es un repositorio de las células plasmáticas que regresan a ella luego de generarse en los tejidos periféricos[4].

Durante la diferenciación los linfocitos atraviesan cambios genéticos lo que conlleva a la expresión de diferentes receptores de membrana nuclear y celular. Los estadios tempranos de diferenciación de las células B puede ser reconocida por la expresión del marcador pan-B CD19, junto con el CD34 y posteriormente el CD10. Estos precursores tempranos expresan la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TDT), junto a RAG1 y RAG2 las cuales tienen un papel en el reordenamiento de genes de inmunoglobulinas[5]. El CD19 se expresa durante todo el proceso de diferenciación del linfocito B, mientras que en la médula ósea se pierden el CD34 y posteriormente el CD10, al mismo tiempo que empiezan a expresar CD20 lo cual coincide con el reordenamiento del gen de inmunoglobulinas y su expresión proteica en la membrana celular. En cuanto a los linfocitos T aún no se han logrado definir con exactitud los cambios iniciales en expresión genética que definen qué precursores sufrirán diferenciación a células T[5]

Los precursores linfoides B en médula ósea reciben el nombre de hematogonias, estas células bajo el microscopio tienen núcleos de forma redonda, cromatina dispersa y nucleolo ocasional y pueden confundirse con células neoplásicas, principalmente en médula ósea regenerativa(18).

2.2.2 Timo.

El timo, es un órgano linfoide localizado en mediastino anterior, y en él ocurre la maduración y selección de los precursores T a partir de los pro-timocitos que provienen de la médula ósea, para llegar a linfocitos “vírgenes”, células con capacidad de responder a antígenos [1]. El timo tiene un rol crítico en el desarrollo de las células T en las primeras etapas de la vida, y a pesar de sufrir degeneración conforme la edad avanza su función persiste durante el resto de la vida (19).

El timo se divide en dos compartimientos, el epitelio tímico central y el espacio perivascular. El epitelio tímico a su vez se divide en corteza y médula, cada una de ellas tiene epitelio característico y células accesorias específicas con el fin de proveer el ambiente para la maduración de las células T(20).

2.3 Tejidos linfoides periféricos.

2.3.1 Ganglios linfáticos.

Los ganglios linfáticos son parte del sistema linfático, forman compleja red que permite el control y manejo de sustancias ajenas al organismo(21). Los ganglios linfáticos se encuentran través del todo el cuerpo lo que permite maximizar la captura de antígenos y diferentes sustancias que influyen en la respuesta inmunitaria.

Los ganglios linfáticos poseen una cápsula fibrosa que se prolonga al interior del parénquima formando trabéculas que permiten la organización de las poblaciones celulares, tejido vascular y componentes estromales. El ganglio linfático presenta 3 áreas, corteza,

paracorteza y médula. En la corteza predominan los linfocitos B, los cuales se agregan formando folículos linfoides; en la paracorteza predominan los linfocitos T y células presentadoras de antígenos; en la región medular encontramos los cordones medulares que contienen células plasmáticas, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, y algunos mastocitos(3).

2.3.2 Área cortical.

El folículo linfoide primario está compuesto por agregados de células B vírgenes (Naive) sostenidas por una red de células dendríticas foliculares. Estas células B maduras expresan además de marcadores de linaje, IgM e IgD de superficie, moléculas que permiten su identificación inmunofenotípica por métodos rutinarios de inmunohistoquímica. La estimulación antigénica de estas células promueve la formación del folículo linfoide secundario el cual se compone por una zona marginal, zona del manto y centro germinativo[1].

El manto se compone por linfocitos B vírgenes de pequeño tamaño, que fueron desplazados a la periferia cuando inició la activación y proliferación en el centro germinal(22). El centro germinal es un compartimento especializado en el cual ocurren dos procesos importantes: la respuesta inmune de las células T a antígenos y la proliferación de células B activadas por antígenos[1]. El proceso de proliferación B se lleva a cabo gracias al microambiente del centro germinal que selecciona clones de células B estimuladas por un antígeno, con capacidad de producir anticuerpos de alta afinidad antigénica[1]. Las células que sobreviven este proceso se convertirán en células B de memoria, que pueden migrar a tejidos periféricos o alojarse en la zona marginal o en células plasmáticas efectoras[5].

El centro germinal contiene centroblastos, de tamaño mediano a grande con 1 a 3 nucleolos de localización periférica, centrocitos de menor tamaño con cromatina condensada y membrana nuclear irregular, así como células dendríticas foliculares, las cuales poseen moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, CD21 y CD35) que atraen a los linfocitos B y T facilitando la presentación de antígenos[5].

El centro germinal se encuentra polarizado y consta de dos áreas, un área oscura de mayor replicación, compuesta principalmente por centroblastos, centrocitos y macrófagos que fagocitan restos nucleares apoptóticos llamados macrófagos con cuerpos tingibles y un área más clara con menor actividad mitótica compuesta principalmente por centrocitos.

Los centrocitos y centroblastos expresan antígenos de linaje B como el CD19, CD20, CD22 y CD79, marcadores de centro germinales como BCL6 y CD10, la expresión del ki67 es variable y da a los centros germinales un aspecto de polarización(7). Es de resaltar que los centroblastos carecen de inmunoglobulinas en su superficie o las expresan en concentraciones muy bajas, esto se debe a que en ellos los genes de inmunoglobulinas atraviesan un proceso de sobremutación(23).

El BCL6 es un factor de transcripción esencial necesario para la estructuración del centro germinal además es un factor importante en la respuesta inmune dependiente de células T, este se expresa en las células B de los centros germinales, pero no en las células B vírgenes, células B del manto, células B de memoria ni plasmocitos(23,24). El CD10 es una proteína de membrana, se expresa en precursores linfoides pre-B en la médula ósea, pero se pierde en las células B vírgenes y vuelve a expresarse en las células B activadas de los centros germinales. El BCL2 es una molécula antiapoptótica constitutiva en linfocitos B vírgenes y células B de

memoria(24) y no se expresa en el centro germinal lo que permite la apoptosis de los linfocitos B que no logran una respuesta específica a antígenos.

Los centros germinales cuentan también con poblaciones de linfocitos T ayudadores foliculares que tienen un rol importante en la regulación del proceso de diferenciación de las células B en el centro germinal, estas células expresan entre otras moléculas CD4, PD-1 y CD57(25).

2.3.2.1 Paracorteza. La paracorteza es el área localizada entre los folículos linfoides, contiene linfocitos T y células dendríticas interdigitantes, células especializadas en presentar antígenos e inmunoblastos. La estructura y organización de la paracorteza depende en gran medida de la producción de quimioquinas por parte de las células estromales que allí se encuentran, producción llevada a cabo por las células reticulares, fibroblastos y células endoteliales de las vénulas de endotelio alto(2).

Las vénulas de endotelio alto presentes en la paracorteza permiten el ingreso de las células B y T desde la sangre periférica. Estas células endoteliales expresan moléculas llamadas adesinas las cuales son moléculas de adhesión que permiten que los linfocitos circulantes adherirse a ellas para el proceso de migración, entre estas moléculas encontramos la E-Selectina, P-Selectina, VCAM-1, ICAM-1 e ICAM-2(26). Mediante la interacción con la L-Selectina y α β -Integrinas las adesinas permiten la trans migración de los linfocitos. La expresión de las adesinas es constitutiva únicamente en las células endoteliales de vénulas altas de los ganglios linfáticos para reclutar linfocitos, en vénulas de otros tejidos su expresión está condicionada a un estímulo proinflamatorio(27).

2.3.3 Bazo

El bazo es un órgano ubicado en el hipocondrio izquierdo el cual ejerce funciones de cribado de elementos sanguíneos defectuosos y eliminación de patógenos transportados en la sangre. Estas funciones se relacionan con sus dos compartimientos morfológicos, la pulpa blanca y la pulpa roja. La pulpa blanca tiene una organización histológica similar a la de los nódulos linfoides, en ella se encuentran centros germinativos y folículos linfoides, con células T en las áreas periarteriolas(28). La pulpa roja contiene células presentadoras de antígenos particularmente linfocitos T gamma y delta, y también células plasmáticas. Una característica distintiva del bazo es poseer zona marginal prominente, en la cual encontramos linfocitos con citoplasma pálido acompañados por macrófagos que rodean las zonas con células T y B(28,29).

2.3.3.1 Pulpa blanca. Las células T y B de los compartimientos del bazo son reclutados y fijados a ellos por diferentes quimioquinas producidas por células estromales y dendríticas. Las células T se organizan alrededor de las arteriolas mientras que las células B se organizan en folículos que pueden encontrarse junto a las capas de linfocitos T o directamente unidas a las arteriolas sin capa de células T(29).

La zona marginal es un área distintiva de la pulpa blanca. Las células B en esta área tienen núcleos que recuerdan a los centrocitos por su forma irregular, pero se distinguen por su citoplasma pálido y abundante. Estas células expresan CD21 e IgM, y a diferencia de las células del manto la expresión de IgD es negativa o si está presente es débil(20).

2.3.3.2 Pulpa roja. Esta área del bazo se compone de senos y cordones. Los senos forman una red cubierta por capas de endotelio y rodeado por fibras de matriz extracelular las cuales pueden resaltarse con la tinción especial de ácido periódico de Schiff (PAS)(2). Los capilares abren hacia los cordones, y las células sanguíneas que no pueden atravesar a través de los sinusoides son destruidos por los macrófagos residentes en los cordones. La sangre en los sinusoides fluye hacia el sistema venoso. Las células de los sinusoides expresan marcadores endoteliales como el factor VIII, y también para otros marcadores como CD8(28).

Cabe mencionar que la pulpa roja contiene además células plasmáticas las cuales mediante quimioquinas que regulan el posicionamiento de ellas mismas y de otras células de la pulpa roja.

2.4 Fisiología e inmunología de los linfocitos.

Los linfocitos son una población heterogénea de células con características morfológicas e inmunológicas que las diferencian del resto de leucocitos. Los linfocitos maduros se pueden clasificar en varios tipos y subtipos en base a los órganos donde se desarrollan y las funciones que ejercen[3]. Las dos clases mayores son los linfocitos T, B y células NK. Los linfocitos T se desarrollan en el timo y de ahí migran a la sangre y a otros órganos linfoides, son responsables de las reacciones citotóxicas y las respuestas de hipersensibilidad retardada, también producen citoquinas que regulan la respuesta inmune y ayudan a las células B. Los linfocitos B pueden capturar, interiorizar y presentar antígenos a las células T y son precursoras de las células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas y pueden diferenciarse a células B de memoria[1]. Por su parte, las células NK son iniciadoras

de la inmunidad contra agentes infecciosos y células transformadas que tienen expresión anormal de antígenos(27).

Las células B y T son totalmente indistinguibles mediante microscopía de luz e incluso electrónica, las células NK tienden a ser más grandes con gránulos en su citoplasma de mayor tamaño. Las células B pueden madurar a plasmocitos que pueden diferenciarse con más facilidad en el microscopio. Por esta dificultad en la distinción visual de los linfocitos se han desarrollado técnicas de inmunohistoquímica que ayudan a definir las distintas subpoblaciones en base a su inmunofenotipo(26).

Las primeras descripciones de los linfocitos datan de 1774, y la primera descripción de las células plasmáticas se dio en 1875(26). A mediados del siglo 20, la conciencia sobre la existencia del sistema inmune se desarrolló en base a dos conceptos principales, la inmunidad humoral y la inmunidad celular, en ese tiempo el descubrimiento y descripción del timo y la bolsa de Fabricius en las aves (que dio su nombre a los linfocitos B provenientes de dicho órgano) llevó a la diferenciación de subtipos de linfocitos; este concepto fue reforzado por el hecho de que bebés con ausencia congénita del timo carecían de inmunidad celular mientras que la inmunidad humoral se conservaba, de igual forma se describieron casos en que niños perdían la producción de anticuerpos y conservaban la inmunidad celular, estos casos llevaron a la comprensión de que existen dos labores diferentes en la inmunidad. Finalmente, el desarrollo de los anticuerpos monoclonales, citometría de flujo y técnicas de biología molecular llevaron al conocimiento actual de la respuesta inmune y sus anormalidades.

2.5 Proceso de diferenciación de células B.

Tanto las células B como las T tienen dos fases de diferenciación, una dependiente de antígenos e independiente de antígenos. La diferenciación que no depende de antígenos ocurre primordialmente en órganos linfoides primarios timo y médula ósea, este proceso tiene como resultado la producción de células B y T ingenuas (Naive) que son capaces de responder a sólo a antígenos extraños ignorando antígenos propios(26).

Las primeras fases de la diferenciación independiente a antígenos comprenden células madre y linfoblastos. Sus descendientes las células T y B ingenuas tienen en su superficie receptores únicos que les permiten interactuar con diferentes antígenos, estos receptores son el receptor de antígenos de células T y las inmunoglobulinas de superficie para las células B(2).

2.5.1 Linaje y diferenciación de células B.

2.5.2 Precursores B.

Los precursores B se desarrollan de células madre hematopoyéticas y hacen su proceso de diferenciación en la médula ósea para después migrar como linfocitos B ingenuos a los tejidos linfoides periféricos. Las células B inician su producción en el feto en el hígado, la médula ósea y el bazo, en la edad adulta el único órgano que continua esta función es la médula ósea. Durante su diferenciación los linfocitos B producen una gran variedad de receptores de inmunoglobulinas gracias a la capacidad de recombinación de los genes de inmunoglobulinas y los diferentes dominios que codifican como lo son los de variabilidad, diversidad y unión, cuya combinación produce la cadena pesada variable que se unirá a una región constante(30).

En las etapas iniciales las células B carecen de inmunoglobulinas y son recibidas el nombre de células B progenitoras o células pro-B(30). Estas células inicialmente expresan CD45, CD 2, CD34 y desoxinucleotidil transferasa terminal (TDT), CD38, y el factor PAX 5 que causa la expresión de CD19. En las siguientes fases de la diferenciación se expresa CD10, CD38, CD34, CD79a, y persiste la expresión de TDT y las células ahora reciben el nombre de células pre-B I(31), en este punto se inicia el rearrreglo y recombinación del gen de inmunoglobulina (Ig) específicamente en el locus de la cadena pesada y también es un punto crítico dado que pueden ocurrir las aberraciones cromosómicas que portan muchos linfomas. El locus de cadena pesada está presente en segmentos que codifican para las regiones Variable (V), Diversidad (D), Unión (joining J) y constante (C), la recombinación del gen de inmunoglobulinas se inicia por las proteínas activadoras de recombinasa RAG1 y RAG2; las cuales pueden ligarse y romper el DNA en secuencias específicas de llamadas secuencias señalizadoras de recombinación (RSSs)(32).

Las secuencias RSSs se encuentran rodeando los segmentos de los genes V, D y J. durante la recombinación los genes J y D son juntados y este segmento DJ es unido al V formando el segmento VDJ. El TDT el cual también se expresa en la célula preB-I y se encarga de catalizar la unión aleatoria adicional de los nucleótidos de unión. Después de este proceso el segmento VDJ queda en la proximidad a la región C μ y crea el gen que codifica para la cadena pesada cuya síntesis da origen a la cadena intracitoplasmática μ o IgM, y a partir de este suceso inicia la fase preB-II(31).

Durante la fase pre-B II las células ganan expresión de CD20 y pierden expresión de CD34 y TDT. En este punto se debe resaltar el receptor células pre-B o pre-BCR, si este

complejo es compatible con el microambiente de la médula ósea, los dominios ITAMs de la Ig α (CD79a) e Ig β (CD79b) se fosforilan y esto rescata la célula de la apoptosis, este rescate depende de que la célula genere una célula genere Ig μ funcional, dado que la célula que no logra esto, es destruida(18). Finalmente, la unión de segmentos V y el segmento J formando el complejo VJ el cual a su vez se une a la cadena Ig μ lo que activa la traducción de proteínas kappa y lambda lo que lleva a la formación de una molécula IgM completa con lo cual ya puede llamarse célula B inmadura(32).

Antes de completar su maduración atravesarán un proceso de selección, aquellos que completen ese proceso exitosamente son seleccionados positivamente y entonces sus genes RAG serán silenciados y reciben estímulos que garantizan su supervivencia pudiendo continuar en el proceso de maduración. Un paso vital en el proceso de selección es la modificación del BCR (B Cell Receptor) que al reconocer autoantígenos sufrirá modificaciones por reactivación de los genes RAG lo que lleva a recombinación de las cadenas V-J lo que finalmente generará un BCR que no pueda reaccionar a antígenos propios y así la célula pueda progresar en su proceso de maduración. Sin embargo, si este rearrreglo no ocurre de forma adecuada y el receptor BCR persiste reaccionando a antígenos propios la célula será negativamente seleccionada y se estimulará su apoptosis. Las células que lograron atravesar el proceso de selección con un BCR adecuado abandonarán la médula ósea y completarán su maduración en los órganos linfoides secundarios.

Células B maduros.

Las células B maduras son clasificadas en subgrupos por su localización anatómica en los órganos linfoides periféricos, estos son células B foliculares marginales y células B1. Los

linfocitos B foliculares son el grupo que contiene la mayoría de las células B maduras y se encuentran en los folículos linfoides de los ganglios linfáticos y el bazo. Estas células estimulan la respuesta de los linfocitos T lo cual ocurre en dos sitios, en los centros germinales y en áreas extrafoliculares. En las áreas extrafoliculares las células B pueden ser activadas por linfocitos T ayudadores lo que las llevará a diferenciarse en plasmablastos que secretan anticuerpos. Otra opción es que las células B migren de vuelta a los folículos y allí nuevamente por estimulación de linfocitos T ayudadores proliferan y forman los centros germinales donde se llamarán centroblastos[2], los cuales expresan CD10 y Bcl-6 y se ubican en la zona oscura del folículo, después migran al área clara donde interactúan mediante CD23 y CD40L con células dendríticas foliculares y linfocitos T ayudadores.

Las células B maduras con alta afinidad a los antígenos que le son presentados en el centro germinal van a diferenciarse en células plasmáticas o en células B de memoria ambas con expresión de CD27[3], [23]. Las células plasmáticas van de regreso a la médula ósea y tendrán un perfil inmunohistoquímico distintivo que incluye CD19, CD27, CD45, CD38, CD138 y producción intracitoplasmática de inmunoglobulinas.(33)

2.6 Linfoma: generalidades.

Las neoplasias linfoproliferativas de células maduras son un grupo de gran interés en el campo de la oncología, virtualmente todas son consideradas malignas, sin embargo, dependiendo de la entidad, muestran un amplio rango de comportamientos desde relativamente indolentes a altamente agresivos, pueden ocurrir en todas las edades, con subtipos específicos que afectan más determinados grupos etarios(22).

Algunas de estas neoplasias comprometen predominantemente médula ósea y sangre periférica, conocidas como leucemias, mientras que otras pueden generar masas en ganglios linfáticos o tejidos extraganglionares, recibiendo el nombre de linfomas(3). Aquellas que se originan de las células plasmáticas, pueden causar síntomas relacionados a la producción parcial o completa de inmunoglobulinas monoclonales con efectos locales y sistémicos. Todas las neoplasias linfoides tienen la habilidad potencial de propagarse a otros tejidos especialmente a hígado, bazo, médula ósea y sangre periférica(34).

Históricamente, desde el punto de vista práctico, se reconocen dos grupos de linfomas: linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin, ambos con origen común en tejidos linfoides, sin embargo, el linfoma de Hodgkin se caracteriza por su comportamiento clínico relativamente indolente, compromiso ganglionar, morfología de las células neoplásicas, fenotipo y diferencias en su tratamiento(35).

La organización mundial de la salud en la última edición de clasificación de tumores de tejidos linfoides y hematopoyéticos clasifica las neoplasias primeramente de acuerdo con su linaje, mieloide, linfoide, histiocito/dendrítico y una postula una contraparte normal, esta contraparte normal se define en base al inmunofenotipo de la neoplasia, dado el avance de la patología molecular, la actual clasificación también toma en cuenta diferentes anormalidades genéticas(7).

2.6.1 Etiopatogenia.

Los linfomas B originados en células maduras, son un grupo heterogéneo, con numerosos fenotipos descritos, cada uno con características únicas en su historia natural,

pronóstico y abordaje terapéutico, por lo que establecer el subtipo específico es indispensable en el abordaje inicial de cualquier caso(7,36).

Una de las pruebas diagnósticas más importantes y de elección en un paciente con sospecha de linfoma es la biopsia del tejido afectado. Otros métodos pueden ser requeridos cuando los sitios afectados por la neoplasia son de difícil acceso, en estos casos se pueden usar biopsia por aguja fina guiada por imágenes, acompañado por citometría de flujo, sin embargo, la aspiración por aguja fina por sí sola no se recomienda como el único método de establecer el diagnóstico inicial de linfoma(35,37), esto debido a que la tipificación de linfomas requiere examinar la arquitectura y el inmunofenotipo de la neoplasia.

Aproximadamente 90% de los linfomas son de linaje B, es decir poseen antígenos de superficie CD o rearrreglos de genes de inmunoglobulinas propios de células B(38,39), los casos restantes son linfomas de células T o NK(38). Esta gran diversidad observada es resultado de la complejidad del sistema inmune; su amplia distribución en los distintos sistemas con sitios altamente especializados como las mucosas en el caso de MALT; sus diferentes linajes T, B y NK; su complejo proceso de maduración; la variedad en la expresión de genes y su capacidad de mutar; y los efectos de mutaciones en varios genes codificantes para inmunoglobulinas o del TCR(4,40).

2.6.1.1 Factores ambientales. Se han reportado profesiones con mayor incidencia de linfomas tales como granjeros, jardineros, pintores, trabajadores de la madera, lavanderías, barberos y peluqueros, posiblemente secundario a la exposición a solventes orgánicos, especialmente a tricloroetileno, un solvente usado en varias industrias(5,41). El incremento en la incidencia en trabajadores de la agricultura puede ser atribuida a exposición a una variedad de agentes, incluyendo herbicidas organoclorados, organofosforados y fenoxiácidos(5,42). Sin embargo, la evidencia indica que la exposición moderada a herbicidas por adultos que usan dichos productos en o alrededor de sus hogares no parece incrementar el riesgo de linfoma(43).

Las tinturas para el cabello se han asociado con un aumento moderado de riesgo de linfoma folicular en mujeres(44). Además, un metaanálisis ha demostrado una relación directa entre fumar y la presentación de linfomas no Hodgkin, con un incremento de riesgo de linfoma no Hodgkin en fumadores pesados de larga data(4). Un índice de masa corporal por encima de 30-35 kg/m² se asocian con un riesgo aumentado de linfoma y pobre respuesta al tratamiento(45).

2.6.1.2 Agentes infecciosos.

2.6.1.2.1 Virus I de leucemia/linfoma de células T humano. El virus I de leucemia/linfoma de células T humano (HTLV-1) es un virus RNA, aislado en casos de linfoma/leucemia de células T del adulto (ATLL), se trata de un retrovirus cuya infección del material genético provoca que las células linfoides se tornen malignas. Determinantes del huésped afectan la transformación de linfocitos por el HTLV-1, y puede haber factores genéticos asociados(46). Los datos obtenidos en Japón, adicionales a los del caribe, suroeste

de estado unidos, sur América, y África, indican clúster de ATLL en regiones donde HTLV-1 es prevalente(47,48).

2.6.1.2.2 Virus de Epstein Barr.

Existen varios procesos linfoproliferativos asociados a la infección por virus de Epstein Barr, el cual es un virus oncogénico con alto potencial de linfomagénesis; un ejemplo es el linfoma extranodal de células T/NK, neoplasia agresiva con una fuerte asociación a este virus, que requiere, para su diagnóstico, la identificación del virus por técnicas especiales(49)

2.6.1.2.3 Virus humano del herpes 8. El herpes virus humano tipo 8 se ha asociado históricamente con sarcoma de Kaposi, sin embargo, existen procesos linfoproliferativos relacionados directamente con este virus, siendo la enfermedad de Castleman, el linfoma de efusión primario y el linfoma B difuso de células grandes HHV-8 positivo, las entidades más frecuentemente relacionadas (50,51).

2.6.1.2.4 Virus de hepatitis B y C. Los virus de la hepatitis B y C también se han implicado en la génesis de enfermedades linfoproliferativas. Se ha encontrado que la seropositividad para virus de hepatitis B es significativamente mayor en pacientes diagnosticados con linfoma B difuso de células grandes y linfoma B folicular. Estudios en Taiwán en donde hay alta prevalencia de infección de virus de hepatitis B encontraron que esta se asocia a alta prevalencia de linfoma difuso de células B grandes. Por otro lado, la infección por virus de hepatitis C es mayor en pacientes con linfomas de células B, y se han descrito asociaciones con linfoma B difuso de células grandes, linfoma B de la zona marginal y linfoma linfoplasmacítico(52).

2.6.1.2.5 Helicobacter pylori. Es bien reconocida la asociación del *Helicobacter pylori* con linfomas B gástricos de la zona marginal del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), generalmente precedidos por un proceso inflamatorio crónico como respuesta de la mucosa gástrica a la infección. La relación del *H pylori* con la génesis del linfoma del MALT es tal que el tratamiento temprano con antibióticos para erradicar la infección puede llevar a regresión del linfoma en un porcentaje considerable de los pacientes (53).

2.6.1.3 Autoinmunidad. Varias condiciones autoinmunes pueden contribuir a la formación de linfomas, esto debido a la estimulación inmune crónica que favorece la proliferación de células B aumentando la probabilidad de desarrollar mutaciones con potencial oncogénico. Las patologías más asociadas con linfomas son el Lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide y el síndrome de Sjögren, con riesgo relativo de 18.8 para Sjögren, 7.4 para Lupus y 3.9 para artritis reumatoide(54).

2.7 Linfoma B difuso de células grandes.

La última clasificación de la OMS reconoce al linfoma B difuso de células grandes (DLBCL) como una categoría heterogénea de donde se pueden diferenciar varias entidades clínicamente relevantes (7,36) tales como.

- DLBCL no especificado.
- Variantes morfológicas.
 - Centroblastico.
 - Inmunoblastico

- Anaplásico.
- Otras variantes.
- Subtipos moleculares.
 - Similares al centro germinal.
 - Tipo de células B activadas.
- Otros linfomas de células B grande.
 - Linfoma B de células grandes rico en células T/histiocitos.
 - DLBCL primario del sistema nervioso central.
 - DLBCL primario cutáneo.
 - Linfoma de B células grandes con rearreglo de IRF-4.
 - Linfoma B de células grandes primario de mediastino (tímico).
 - Linfoma B de células grandes intravascular.
 - DLBCL asociado a inflamación crónica.
 - Granulomatosis linfomatoide.
 - Linfoma B de células grandes ALK⁺.
 - Linfoma plasmablastico.

- DLCBL positivo para HHV-8.
- Linfoma de efusión primario.
- Linfoma B de alto grado.
- Linfoma B de alto grado con reordenamientos del MYC y BCL2 y/o BCL6.
- Linfoma B de alto grado no especificado (NOS).

En su conjunto todos los subtipos se caracterizan por proliferación de células B neoplásicas de tamaño intermedio a grande con núcleo de tamaño similar al de un histiocito o dos veces el tamaño del núcleo de un linfocito pequeño(55). Las neoplasias que cumplan con estos criterios y no puedan ser clasificadas dentro de los subtipos definidos se llamaran DLBCL no específicas (NOS)(38,56).

El DLBCL es el tipo más común de linfoma no Hodgkin correspondiendo al 31% de ellos(40). No existe un factor de riesgo único que determine el desarrollo de DLBCL, sin embargo, como se ha expuesto anteriormente puede asociarse a diferentes factores de riesgo (7,40)

2.7.1 Presentación clínica.

La presentación clínica en los pacientes con DLBCL suele asociarse a la formación de masas por infiltración de ganglios linfáticos, presentación más común, o tejidos extra ganglionares; el 40% debutan con compromiso extra ganglionar y el 70% tendrán este tipo de compromiso durante el curso de su enfermedad(38,57). El DLBCL puede originarse en casi cualquier órgano, incluso sistema nervioso central, piel y hueso, los sitios extra ganglionares

más comunes son el tracto gastrointestinal y el anillo de Waldeyer(58). Es de resaltar que los linfomas que se originan en piel y sistema nervioso central tienen características clínicas y biológicas distintivas y en base a ello son subtipos específicos.

2.7.2 Hallazgos histopatológicos.

Los ganglios linfáticos y tejidos comprometidos por DLBCL usualmente muestran pérdida de su arquitectura debido a infiltración por células linfoides de tamaño intermedio a grande con morfología similar a centroblastos, inmunoblastos o células con características intermedias(7,59). Los centroblastos tienen núcleos ovalados vesiculares, nucleolo pequeño adherido a la membrana nuclear y escaso citoplasma eosinófilo. Los inmunoblastos tienen núcleo redondo a oval, vesicular y nucléolo único central con citoplasma escaso y basófilo. En ocasiones los centroblastos adoptan una forma plasmocitoide con núcleo excéntrico y Golgi paranuclear(59). Los linfomas pueden no tener estas características clásicas mostrando un fenotipo híbrido entre centroblasto e inmunoblasto con un núcleo grande y tamaño células intermedio, citoplasma voluminoso claro(22).

La morfología del DLBCL no especificado es diverso y puede dividirse en variantes comunes y raras, es por esto por lo que el diagnóstico requiere de estudios auxiliares antes de diagnosticar un DLBCL, especialmente para excluir otras condiciones como leucemias, linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto(7,55).

2.7.3 Inmunofenotipo.

Las células neoplásicas del DLBCL usualmente tienen expresión de CD45 y marcadores pan-B como CD19, CD20, CD22, CD79a, y PAX5. Sin embargo, se debe recalcar

que la expresión de CD20 está ausente en el 60% de linfomas de pacientes previamente tratados con rituximab (anticuerpo recombinante anti CD20)(60). En 50-75% hay expresión citoplasmática IgM e IgG, además de expresión en membrana de IgA, sin embargo, esta expresión no se correlaciona con la presencia de marcadores de células plasmáticas como el CD138, el cual es raro en células CD20 positivas(7,60).

La expresión de CD10 ocurre en 20-40% de los casos(61). La expresión de CD10 resulta útil para identificar los subtipos de DLBCL con perfil de células B centro germinales y también es común en casos con translocación 14;18. La expresión de BCL-6 es muy variable dado que sus criterios de positividad en tinción de inmunohistoquímica son muy variados siendo de aproximadamente 60% en diferentes estudios, de igual forma la expresión de MYC es variada con rangos del 10-60% en promedio 40%(62). En cuanto a la proteína BCL2, 50% de los casos aproximadamente la expresan y ello suele ser más común en tumores ganglionares (62,63) y se asocia a translocación o amplificación de BCL2(61,62). El CD5 tiene una expresión baja entre el 5-10% de los casos con DLBCL y aun se discute si su expresión de novó puede considerarse una entidad clínico-patológica diferente, con un comportamiento más agresivo(60). la tinción de KI67 en DLBCL usualmente muestra índices de proliferación alto, sin embargo, se han descrito rangos variables que oscilan entre el 20% al 95-100%(8,63,64).

2.8 Actividad biológica de la proteína KI67.

El nombre Ki67 hace referencia a un anticuerpo que se desarrolló para la marcación inmunohistoquímica de linfomas no Hodgkin en ratones, recibió su nombre por la ciudad donde se desarrolló y el número de clon que fue usado es decir la ciudad de Kiel y el clon 67. Ki67 es una proteína no histona presente en todas las fases activas del ciclo celular desde G1 a M, pero

ausente en la fase G0, es por ello por lo que el KI67 es un marcador que determina las fracciones proliferantes de una población celular(10). En años recientes Ki67 se ha convertido en el centro de investigaciones dado su potencial como predictor, marcador pronóstico y más aún como diana terapéutica en diferentes neoplasias como son los carcinomas de pulmón, vejiga, mama, cérvix y linfomas(65,66).

La proteína Ki67 es de localización perinuclear en la fase G1, en interfase se ubica en los componentes fibrilares del núcleo, estas distintas localizaciones crean un patrón de tinción difuso en la inmunohistoquímica lo que indica una estrecha relación con la cromatina(8). Tanto así que durante la condensación de los cromosomas el ki67 se acompaña de otras proteínas nucleolares como la fibrilarina, nucleolina y nucleoplasmina(8,9).

Una cualidad de KI67 es ubicar componentes nucleolares en los cromosomas mitóticos y con ello ayudar en la segregación de los nucleolos entre las células hijas(9). Se especula que la función de KI67 es servir como un tipo de surfactante el cual permite la movilidad de los cromosomas y sus interacciones con el huso mitótico previniendo que el cromosoma colapse(67). Otros estudios evidencian el rol de KI67 en la transcripción de cromosomas, específicamente durante la formación de los ribosomas(64).

2.8.1 Inmunohistoquímica para KI67 y su utilidad clínica.

La marcación inmunohistoquímica por Ki67 y el porcentaje de células positivas se usa para el cálculo del índice de proliferación el cual es de ayuda para determinar el pronóstico de diferentes neoplasias como gliomas, cáncer de mama y neoplasias linfoproliferativas. En estas

últimas su significado pronóstico ha sido conflictivo con reportes que indican que un índice de proliferación alto entre 60-80% o mayor se asocia a pobre pronóstico(68).

En la práctica clínica el reporte del índice de proliferación tiene mucho valor, por ejemplo, en el caso del cáncer de mama el índice de proliferación por KI67 tiene un rol protagónico al establecer puntos de corte para clasificar dichos carcinomas como luminal A y luminal B dependiendo de índice de proliferación menor a 14% y mayor a 14% respectivamente(69), lo que se traduce en conducta terapéuticas diferentes.

Otro ejemplo del valor del índice de proliferación por KI67 se da en el abordaje de tumores del sistema nervioso central, el caso específico de los gliomas en los cuales la OMS propone valores menores a 4% orientando a astrocitomas, 5-10% para astrocitomas anaplásicos, mientras que los valores promedio para glioblastomas son de 15-20%(70). Además, el ki67 en los linfomas del manto es un único factor pronóstico confiable, tanto así que se usa para definir un abordaje más agresivo con un punto de corte del >30% para pacientes de alto riesgo(71).

Específicamente en los linfomas, la utilidad del KI67 es servir en conjunto con otros marcadores inmunofenotípicos como ayuda para la clasificación de los diferentes subtipos de linfomas, La última clasificación de la OMS para neoplasias linfoproliferativas junto con numerosos textos y artículos académicos enfatizan en la importancia de realizar una comparación del inmunofenotipo por inmunohistoquímica de los distintos linfomas tomando en cuenta también el índice de proliferación por KI67(6,7,63–65).

En el caso del DLBCL varios estudios han mostrado la importancia del KI67 como un factor pronóstico para tener en cuenta, la expresión de KI67 se correlaciona con peor pronóstico

y pobre supervivencia lo que lo convierte en un marcador pronóstico valioso(62). En años recientes con el advenimiento de la terapia con rituximab el KI67 ha ganado aún más utilidad, dado que se ha demostrado una asociación entre índice de proliferación elevado y el fracaso terapéutico del rituximab(6).

A pesar de la importancia de este marcador, no existe un método estándar para el cálculo del índice de proliferación, varios estudios han demostrado variabilidad inter e intraobservador para la interpretación del índice de proliferación por KI67(11).

Actualmente la metodología aceptada consiste en el abordaje visual del patólogo mediante el conteo de células positivas para la tinción de ki67 o el cálculo visual de estas. El conteo de células se realiza en puntos calientes que son las áreas con mayor tinción para ki67 en comparación a las áreas que las rodean, sin embargo, esto conlleva variabilidad inter e intraobservador. El grupo de investigación internacional para abordar el índice de proliferación por ki67 (*un grupo que desde el 2009 ha buscado: crear lineamientos para el análisis de ki67, desarrollar métodos de puntaje estándar para dicho índice, desarrollar protocolos para graduación automática y proveer una plataforma que informe a la comunidad la investigación más reciente en el ki67 así como las prácticas clínicas que lo involucren*)(72) creó el protocolo de graduación para ki67, el cual se basa en la visualización directa de la lámina por parte del patólogo en campos de alto poder mediante el conteo de núcleos de células tumorales y anotar cuántos de ellos son positivos en la tinción de ki67 y con ello calcular el índice de proliferación mediante una sencilla ecuación que compara las células positivas, las negativas y el total para expresar un porcentaje de índice de proliferación(72).

Varios grupos han abordado la variabilidad interobservador en el cálculo del índice de proliferación, uno de estos estudios el realizado por Chung, Y. R. et al evaluó la variabilidad interobservador en el cálculo de índice de proliferación por ki67 en microarreglos de cáncer de mama concluyendo una alta variabilidad interobservador entre los 30 patólogos participantes(12). El grupo de Nielsen, L. A. G trabajó con índice de proliferación celular en 235 casos de gliomas de bajo y alto grado encontrando una marcada variabilidad entre los dos patólogos que calcularon el índice de proliferación(73). Un resultado similar al encontrado por Swarts, D. R. A et al en su estudio realizado en tumores carcinoides del pulmón estableciendo como grupos de estudio los puntos de corte de índice de proliferación para tumor carcinoide típico y atípico, este estudio reporto concordancia general entre los índices de proliferación calculados por sus 5 observadores para los 114 tumores evaluados a penas aceptable con un Kappa de 0.3(74).

2.9 Immunoratio: plugin para análisis de imágenes en patología.

Image J un software basado en java fue desarrollado por el National Institutes of health en 1997 con su última versión en 2016, se trata de un programa de procesamiento de imagen de dominio público, gracias a profesionales en distintos campos han desarrollado plugins con diferentes aplicaciones en distintos campos de la ciencia tan variados como la geología, la meteorología y la medicina (para dar algunos ejemplos)(13).

Esta facilidad para la creación de plugins permitió que en 2010 un grupo de investigadores de la universidad de Tampere en Finlandia desarrollara el plugin Immunoratio el cual permite el conteo de núcleos teñidos con diaminobenzidina (DAB) en láminas de histopatología y con ello calcular el promedio de áreas nucleares teñidas con DAB(14).

Inicialmente el plugin Immunoratio fue utilizado para la evaluación de receptores de estrógeno en láminas de pacientes diagnosticados con carcinoma ductal de mama encontrando resultados que permitieron establecer que el plugin arrojaba resultados equiparables al método de conteo manual de células y en algunos casos superándola(14).

3. Diseño metodológico.

3.1 Diseño del estudio.

El presente es un estudio observacional analítico de corte transversal que se realizará sobre láminas de histopatología de pacientes con diagnóstico ya establecido de linfoma B difuso de células grandes con tinción de inmunohistoquímica KI67, entre el 01 de enero de 2018 y el 31 de diciembre de 2020 en los laboratorios de patología del Hospital Universitario de Santander y Diagnostico especializado Isabel Bolívar Aguilera SAS.

3.2 Población.

Láminas de pacientes con diagnóstico de linfoma B difuso de células grandes realizado en unidades de estudio histopatológico de la zona metropolitana de Bucaramanga, (Hospital Universitario de Santander-Patología Y Diagnostico Especializado Isabel Bolívar Aguilera SAS) a las que se les realice índice de proliferación calculado por patólogo experto mediante inmunohistoquímica para ki67.

3.3 Tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra en este estudio observacional analítico de corte transversal se determinó en base a la epidemiología nacional para linfoma difuso de células B grandes reportada en el informe del Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X. (Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, SteliarovaFoucher E, Swaminathan

R, Ferlay J, editors (2014). Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X. IARC. Scientific Publication No. 164. Lyon: International Agency for Research on Cancer)

Número de casos por quinquenio en zona metropolitana de Bucaramanga 2003-2007:
311.

Casos año 2003: 62,2 en zona metropolitana de Bucaramanga (h:1.022.532)

Tasa 6.08 casos/100.000 h zona metropolitana de Bucaramanga

Total, población B/F 2003: 807.323

Casos año Bucaramanga Floridablanca 2003: 49.08

Total, población B/F 2019: 945.244

Casos año Bucaramanga Floridablanca 2019: 57.47

Total, casos + pérdidas 10%: 64 casos año

3.3.1 Criterios de inclusión

- Pacientes diagnosticados con linfoma B difuso de células grandes a los que se les realizó tinción de inmunohistoquímica para KI67 en el departamento de patología del Hospital Universitario de Santander y Diagnostico especializado Isabel Bolívar Aguilera SAS entre los años 2018 y 2020.

3.3.2 Criterios de exclusión.

- Muestras de pacientes con diagnóstico de un linfoma diferente al objeto de interés del estudio.
- Muestras anteriores al 2018.
- Muestras posteriores al 2020.
- Muestras con tinción de inmunohistoquímica realizada en laboratorios distintos a los laboratorios de patología del Hospital Universitario de Santander y Diagnostico Especializado Isabel Bolívar Aguilera S A S.
- Muestras de pacientes con diagnóstico de linfoma de interés y que cursó con embarazo concomitante.
- Muestras de pacientes que recibieron tratamiento previo a la toma de biopsia.

3.3.3 Definición de caso.

Pacientes con diagnóstico de linfoma B difuso de células grandes con cálculo de índice de proliferación celular mediante inmunohistoquímica para ki67.

4. Procedimientos para recolección de datos.

Se valorarán láminas de pacientes con diagnóstico de linfoma B difuso de células grandes con tinción para inmunohistoquímica Ki67 realizada usando la técnica manual.

Previo a la captura de las imágenes para el estudio se realizará una calibración con 5 imágenes de una lámina de linfoma B difuso de célula grande con inmunohistoquímica para ki67 seleccionada por patólogo especializado en hematopatología quien determinará 5 puntos calientes para la toma de imágenes y además realizará el conteo manual de células (gold estándar) para establecer con la mayor exactitud posible el índice de proliferación celular. Conociendo el IPC calculado mediante el gold estándar se procederá a modificar los valores de exposición, sensibilidad a blancos y negros y contraste de la cámara Olympus DP73, así como variables en el plugin Immunoratio como la intensidad de DAB, tonalidad cian y tamaño nuclear (en micras) modificando los anteriores valores hasta que el software arroje un resultado para las 5 imágenes igual al IPC obtenido por conteo manual de células por parte del patólogo especialista.

Luego de la anterior calibración todas las láminas serán valoradas por un patólogo especializado en hematopatología quien determinará puntos calientes (hotspots) en los cuales determinara el índice de proliferación, posterior a ello se realizarán 5 capturas de imagen usando microscopio Olympus de modelo Bx43 y cámara Olympus modelo DP73 conservando los valores obtenidos durante la calibración, estas imágenes serán rotuladas de acuerdo al número de cada caso usando el software CellSense de Olympus master ® y luego transferidas al disco duro de una laptop Lenovo ® Z40-70 con Procesador Core i5, 6 GB de RAM y GPU Nvidia Gforce ® 820M con el software ImageJ y su plugin Immunoratio instalados y

previamente calibrados para el procesamiento de imágenes. Sobre las 5 imágenes en el laptop Lenovo ® Z40 se procederá a calcular el índice de proliferación mediante el software Image J y su plugin Immunoratio, el cual unirá las 5 imágenes para su análisis y dará un resultado porcentual en base al conteo de píxeles de colores ocre y azul junto a la imagen de comprobación en las cuales se puede realizar el control visual de que núcleos fueron reconocidos como positivos y cuales como negativos.

A las 5 imágenes obtenidas de cada lamina se realizará conteo manual de núcleos positivos y negativos utilizando para ello el plugin cell counter del software ImageJ con el cual se cuantificará con exactitud el número de núcleos positivos, negativos y totales con lo cual mediante un cálculo porcentual se obtendrá el índice de proliferación.

Adicional a las evaluaciones por parte del especialista en hematopatología, software ImageJ, y conteo manual de células, se hará una evaluación adicional por parte de un patólogo experto quien determinará el índice de proliferación en base a la evaluación de la tinción de inmunohistoquímica para ki67 en 5 en las láminas en estudio.

Los resultados de las 4 lecturas se ingresarán a base de datos en el software Microsoft Excel la cual será analizada posteriormente mediante el software Stata.

4.1 Control de calidad de datos.

Para el control de calidad, se crearon manuales de procedimientos para entrenamiento en calidad de procesamiento de láminas. Se construyó un formato de recolección de datos que se digitará por duplicado de forma independiente por dos digitadores diferentes entrenados previamente en el manejo de la base de datos Excel, lo cual se comparará posteriormente para

búsqueda activa de posibles errores de digitación. Se realizará un chequeo de consistencia interna de los datos luego de lo cual se consideran como finales y se archivarán en medio magnético por duplicado.

Un supervisor de control de calidad de procesos tomará una muestra aleatoria del 10% de las encuestas recolectadas cada mes y se confirmara la información consignada en ellas contrastándola con las fuentes primarias y secundarias de las cuales se extraerá la información, encargándose también del reentrenamiento del personal cuando fuese necesario.

5. Evaluación crítica del protocolo.

5.1 Ventajas del diseño.

El estudio observacional analítico de corte transversal es ideal para estudiar enfermedades de larga duración como lo son las neoplasias linfoproliferativas, permitiendo establecer prevalencia de enfermedades en la población y su distribución, además de que son estudios de bajo costo monetario.

5.2 Consideraciones éticas.

Este protocolo de investigación clínica será adherente tanto en su diseño como en la ejecución a las regulaciones nacionales e internacionales existentes en cuanto a investigación biomédica, siguiendo los lineamientos de Buenas Prácticas Clínicas del Comité Internacional de Armonización y los principios éticos de la Declaración de Helsinki.

Según los criterios consignados en el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993 se considera que el presente protocolo de investigación clasifica como un estudio “sin riesgo” pues cumple los criterios establecidos: emplear un método de investigación retrospectivo y no realizar ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos. Así mismo a pesar de ser una investigación sin riesgo puede ser amparada por el párrafo primero del artículo 16 de la resolución 8430 de 1993 se obtendrá el consentimiento informado de cada paciente de manera verbal aplicando el instrumento adjunto en el párrafo 13 de este protocolo.

Con respecto a los principios éticos de investigación y lineamiento con las pautas establecidas por la OMS en 1991 se realizan las siguientes aclaraciones: 1) al no realizarse intervenciones en pacientes, modificar su práctica de atención clínica o de alguna manera intervenir en la evolución y los desenlaces (se analizan datos de pacientes que ya fueron atendidos), no existe espacio para posibles intervenciones de riesgo para el paciente (preservación del principio de beneficencia y no maleficencia en su elemento común de no exponer el paciente a riesgo); 2) el respeto de los participantes, en conexión además con la confidencialidad, son protegidos y asegurados también por este estudio pues no se recolecta información sensible de los pacientes que les pueda generar estigmatización, además de que la base de datos no incluye de ninguna forma identificadores personales (nombre, dirección de residencia, teléfono) con los cuales se pueda individualizar a quien corresponde cada registro; 3) el objetivo mismo del estudio no solamente asegura el respeto por el principio de justicia sino que busca su realización de manera activa teniendo en cuenta los lineamientos de la OMS mencionados: "...Deben diseñarse estudios para obtener conocimiento que beneficie a la clase de personas de las cuales los sujetos son representativos...", ya que la finalidad misma de este protocolo es obtener conocimiento y poder ofrecer a futuros pacientes la posibilidad de mejoramiento en las estrategias diagnósticas y terapéuticas a las cuales son sometidos.

Este protocolo se llevará a cabo acorde a lo dispuesto por la Ley 1581 del 2012 y el decreto 1377 del 2013 de la república de Colombia.

Por último, este trabajo será sometido para aprobación de los Comités de Ética de la Universidad Industrial de Santander y del Hospital Universitario de Santander

6. Resultados.

6.1 Captura y análisis de imágenes.

Se valoraron 128 casos de DLBCL y su correspondiente lamina inmunohistoquímica para ki67, de dichas laminas 43 fueron realizadas en el año 2020, 15 en el año 2019 y 70 en el año 2018 (grafico 1).

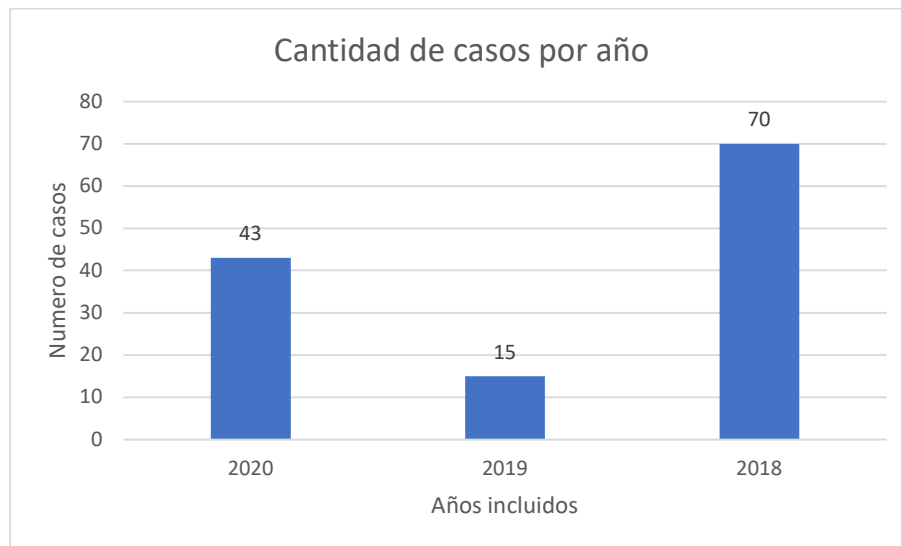


Gráfico 1. Número de casos por año incluidos en el estudio.

Del total de láminas incluidas se obtuvieron 640 fotografías (5 fotografías por cada caso) usando una cámara Olympus DP73, las imágenes fueron evaluadas por dos patólogos (patólogo 1 y patólogo 2) con experiencia en evaluación de índice de proliferación células por ki67; Se usó el software ImageJ con y el plugin cell counter para realizar conteo manual de células y determinar por regla de 3 el índice de proliferación celular por conteo manual de células (imagen 1) en las 5 imágenes de cada caso el cual se promedia para ser usado como

gold estándar para las comparar los métodos evaluados, adicionalmente, para corroborar la precisión del conteo celular manual, se realizó recuento de 12 imágenes (1 imagen por cada 5 casos) para comparar con el conteo inicial, obteniendo que no existió diferencia significativa entre el conteo original y el conteo de control.

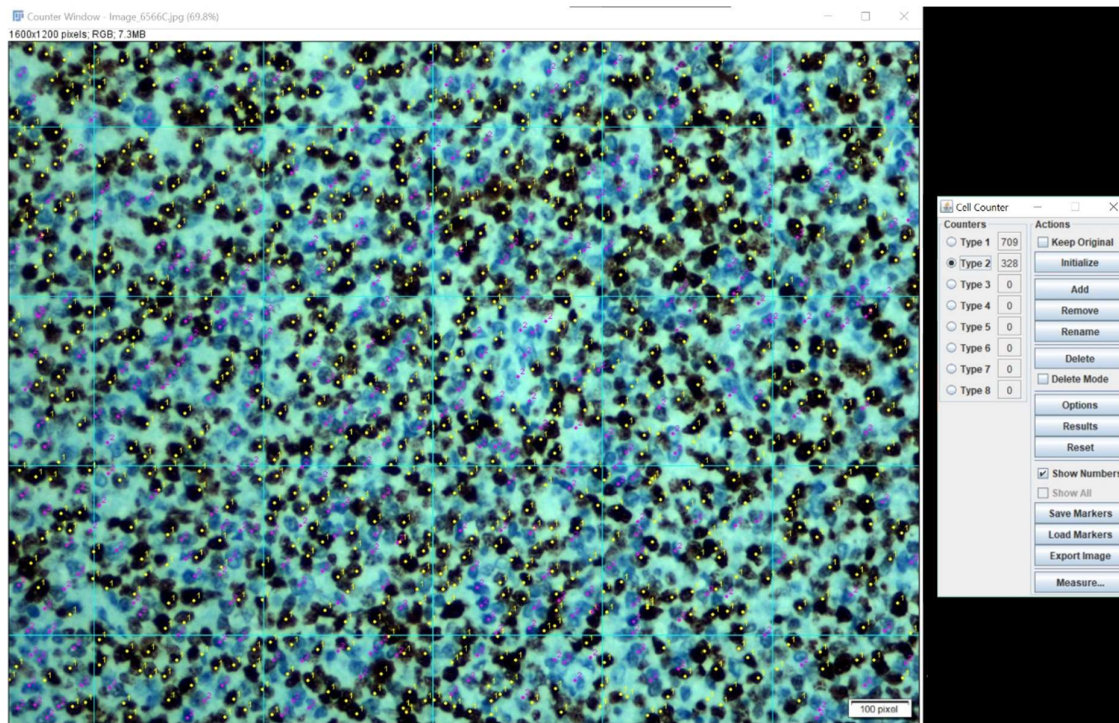


Imagen 1. Conteo manual de células mediante ImageJ con plugin cell counter.

Finalmente se usó el software objeto de este estudio ImageJ con su plugin Immunoratio para determinar el índice de proliferación celular obteniendo una única imagen que incluye las 5 imágenes analizadas, las áreas que el software determino como positivas y negativas, así como un cuadro de texto con el porcentaje de células positivas el cual corresponde al índice de proliferación celular (Imagen 2), al analizar el mismo grupo de imágenes usando ImageJ se obtuvo los mismos resultados siempre.

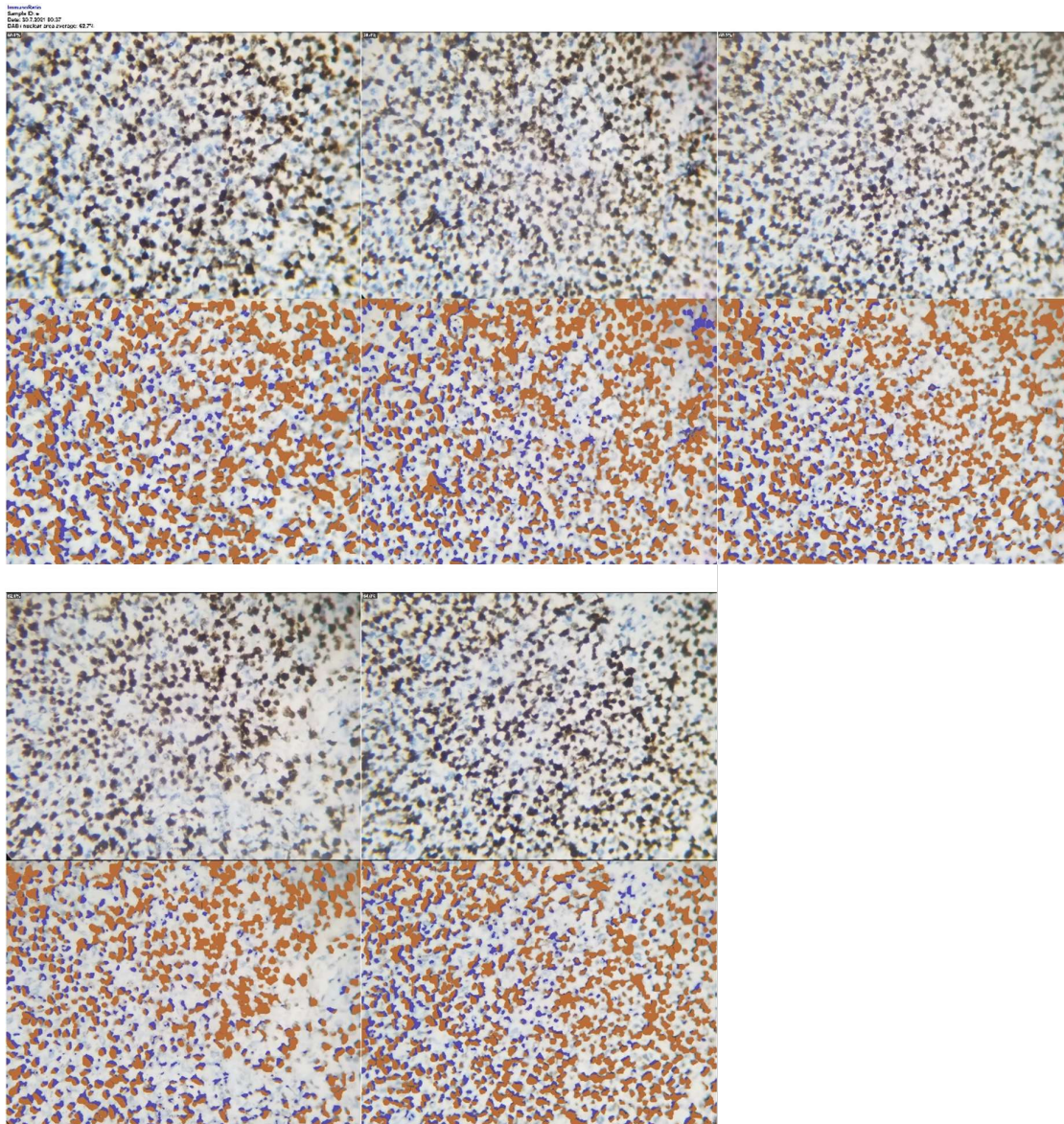


Imagen 2. Resultado de análisis digital de imagen usando ImageJ y su plugin Immunoratio.

Para el análisis de los datos obtenidos se dividieron los resultados en 3 grupos en base a la diferencia que existió entre el método evaluado y el conteo manual de células (gold estándar), grupo 1 diferencia menor al 5% entre los resultados de ambos métodos, grupo 2 diferencia entre el 5-10% y grupo 3 diferencia mayor al 10%. Además, se calculó el coeficiente de

correlación interclase que permite evaluar la concordancia general entre dos o más métodos u observaciones diferentes, basado en el modelo de análisis de la variancia (ANOVA) con medidas repetidas, con el cual se obtiene un resultado entre 0 y 1 siendo los valores más cercanos a 1 indicativos de mayor concordancia (0-0.5 concordancia pobre, 0.5-0.75 concordancia moderada, 0.75-0.9 concordancia buena, mayor a 0.9 concordancia excelente).

6.2 Variabilidad de índice de proliferación celular, conteo manual vs ImageJ.

Se encontró que, de los 128 casos evaluados, La variabilidad mínima entre ImageJ (Immunoratio) y conteo manual fue del 0.07% y la máxima fue del 44.68%, con variabilidad promedio del 14.56%.

En 34 casos (59% de los casos) existió una diferencia menor al 5% entre las medidas de índice de proliferación celular dado por ImageJ y el conteo manual de células; en 18 casos (14% de los casos) se encontró una diferencia de medidas entre el 5-10% en el índice de proliferación celular por ambos métodos. Finalmente, en 76 casos (27% de los casos) existió una diferencia mayor al 10% entre el índice de proliferación calculado por el software y el conteo manual. (Grafico 2). El coeficiente de correlación interclase entre el conteo manual y el ImageJ fue de 0.35.

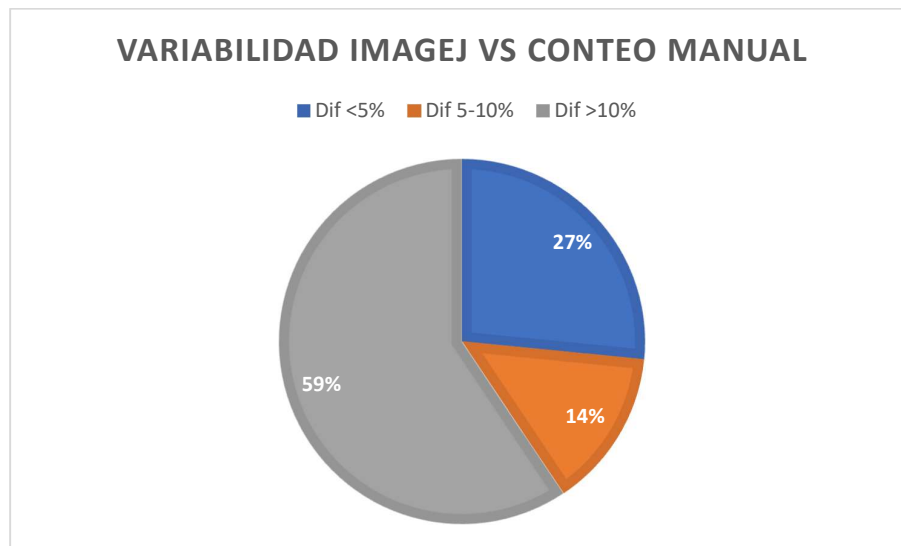


Gráfico 2. Variabilidad en el índice de proliferación calculado por ImageJ vs el calculado por conteo manual.

6.3 Variabilidad de índice de proliferación celular, conteo manual vs patólogos 1 y 2.

En cuanto a las valoraciones realizadas por los patólogos se encontró que:

Para el patólogo 1 la diferencia mínima entre el índice de proliferación calculado por conteo manual y patólogo fue de 0.17%, máxima de 71.88%, en promedio diferencia de 31.23%. Existió una diferencia menor del 5% entre el índice de proliferación calculado por el patólogo 1 y el conteo manual en 10 casos (8% de los casos), diferencia entre 5-10% en 7 casos (5% de los casos) y diferencia mayor al 10% en 111 casos (87% de los casos) (Gráfico 3). El coeficiente de correlación interclase es de 0.21.

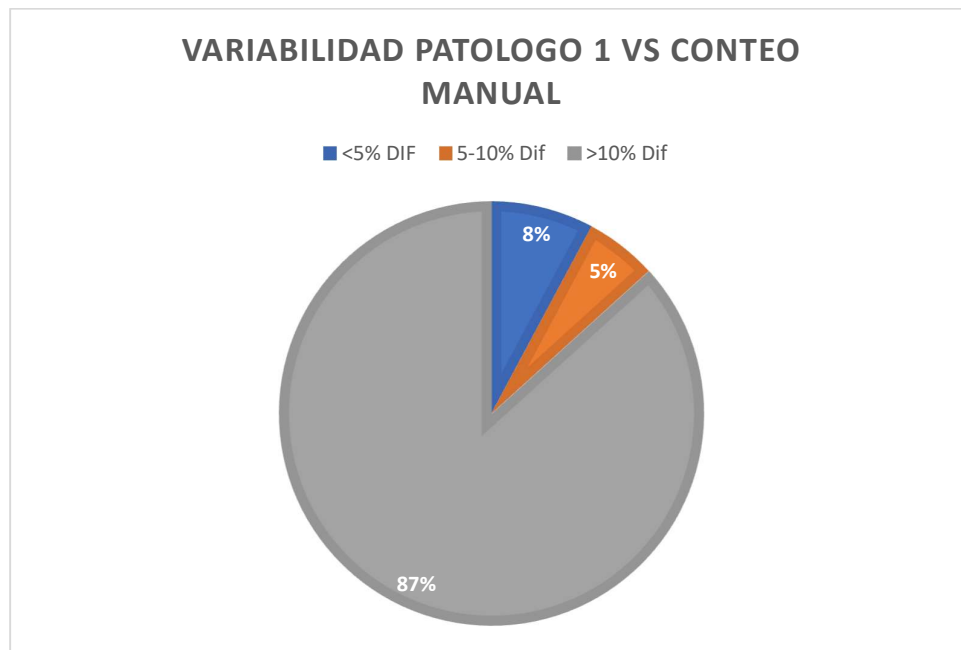


Gráfico 3. Variabilidad del índice de proliferación celular calculado por patólogo 1 vs conteo manual.

En cuanto a las valoraciones realizadas por el patólogo 2, la diferencia mínima en el cálculo del índice de proliferación en comparación a conteo manual fue de 0.08%, la máxima fue de 40.29%, con promedio 12.78% de diferencia. Además, una diferencia menor al 5% en comparación al conteo manual en 37 casos (29% de los casos), diferencia entre el 5-10% en 23 casos (18% de los casos) y una diferencia mayor al 10% en 68 casos (53% de los casos). (Grafico 4); con coeficiente de correlación interclase de 0.54.

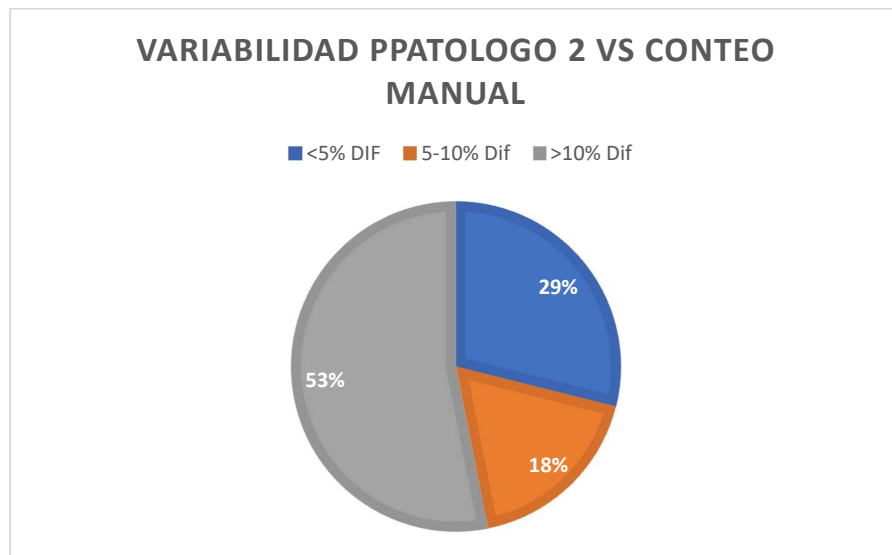


Gráfico 4. Variabilidad en el índice de proliferación calculado por patólogo 2 vs el calculado por conteo manual.

6.4 Variabilidad de índice de proliferación celular entre patólogos.

Al comparar las valoraciones realizadas por ambos patólogos encontramos que la diferencia mínima entre ambos patólogos fue del 1% con diferencia máxima del 74% y una diferencia promedio de 41.92%. Además, diferencia menor al 5% en el índice de proliferación calculado por cada uno en 1 caso (1% de los casos), una diferencia entre 5-10% en 7 casos (5% de los casos) y una diferencia mayor al 10% en los 120 casos restantes (94% de los casos). (Gráfico 5). El coeficiente de correlación interclase entre ambos patólogos fue de 0.13.

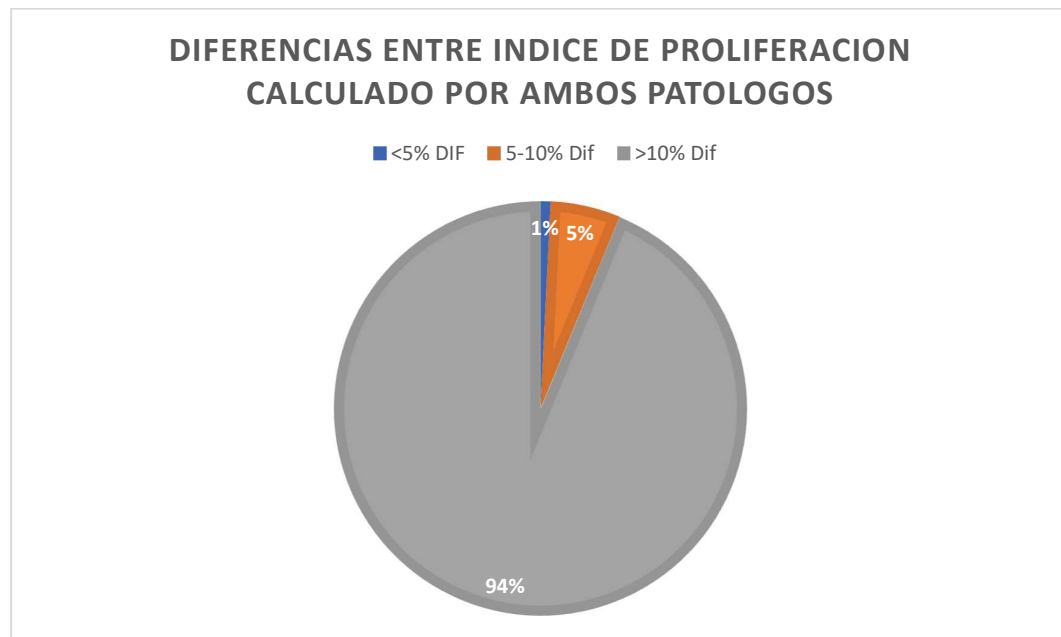


Gráfico 5. Diferencia entre el índice de proliferación calculado por ambos patólogos.

6.5 Variabilidad de índice de proliferación según año de procesamiento de lámina de inmunohistoquímica.

De los casos evaluados con ImageJ (immunoratio) que tuvieron diferencia menor al 5% con el conteo manual 34 son del año 2020 y ninguno proviene de 2019 o 2018, en cuanto a aquellos con diferencia entre 5-10% de ellos 9 son del año 2020 y 9 del año 2019 ninguno del año 2018, en el grupo final con diferencia mayor al 10%, 6 son del año 2019 y 70 del año 2018 (Tabla 1).

	Dif <5%	Dif 5-10%	Dif >10%
2020	34	9	0
2019	0	9	6
2018	0	0	70

Tabla 1. Número de casos año en relación con la diferencia en el índice de proliferación entre ImageJ (immunoratio) y conteo manual de células.

En cuanto a los casos de los patólogos 1 y 2. En relación con la diferencia entre el índice de proliferación celular calculado por patólogo 1 vs conteo manual, en el grupo de diferencia menor a 5%, 6 casos son del año 2020, 2 casos son del año 2019 y 2 del año 2018; en el grupo de diferencia entre 5-10%, 2 casos son del año 2020, 2 casos del año 2019 y 3 del año 2018; en el grupo de diferencia mayor al 10%, 35 casos son del año 2020, 11 casos del año 2019, y 65 casos del año 2018 (tabla 2.).

	Dif <5%	Dif 5-10%	Dif >10%
2020	6	2	35
2019	2	2	11
2018	2	3	65

Tabla 2. Número de casos año en relación con la diferencia en el índice de proliferación entre patólogo 1 y conteo manual de células.

En las valoraciones del patólogo 2 vs el conteo manual encontramos que: en el grupo de diferencia menor al 5% encontramos 5 casos del año 2021, 2 casos del año 2019 y 30 casos del año 2018; en el grupo de diferencia 5-10%, 11 de los casos son del año 2021, 2 casos son

del año 2019 y 10 casos del año 2018; finalmente en el grupo de diferencia mayor al 10%, 27 casos del año 2020, 11 casos del año 2019 y 30 casos del 2018 (tabla 3).

	Dif <5%	Dif 5-10%	Dif >10%
2020	5	11	27
2019	2	2	11
2018	30	10	30

Tabla 3. Número de casos año en relación con la diferencia en el índice de proliferación entre patólogo 2 y conteo manual de células.

Se calculo en coeficiente de correlación interclase comparando cada método con el gold estándar en dos grupos, casos anteriores al 2020 y casos del 2020 encontrando que, en el caso de ImageJ el coeficiente para casos anteriores al 2020 fue de 0.015, para los casos del 2020 fue del 0.87; para los patólogos participantes, el coeficiente calculado para patólogo 1 para los casos anteriores al 2020 fue 0.14, para los casos de 2020 fue de 0.57; el coeficiente calculado para el patólogo 2 en los casos anteriores a 2020 fue del 0.50 y para los casos del 2020 fue del 0.57.

7. Discusión.

ImageJ y su plugin immunoratio han sido comparados con métodos basados en visualización directa para el cálculo del índice de proliferación celular por ki67 en estudios realizados para evaluar la efectividad del software en cáncer de mama (64,65), tumores gliales (66), y tumores neuroendocrinos (67), sin embargo, no ha sido evaluado para valorar índice de proliferación celular en neoplasias linfoproliferativas como el linfoma B difuso de células grandes, en ese sentido, el presente trabajo da los primeros pasos en la investigación y futura aplicación de dicho software y similares en el campo de la hematopatología. El método de conteo manual ha sido usado como gold estándar de comparación cuando se ha querido evaluar un método de análisis digital de imagen (64,65), e incluso en estudios que buscan determinar la variabilidad interobservador (67).

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos concluir que el software ImageJ y su plugin immunoratio logra una capacidad discriminativa equiparable a la de patólogo 2 con valoraciones similares en los grupos de análisis de diferencia menor al 5%, diferencia entre 5-10% y diferencia mayor al 10%, sin embargo los coeficientes de correlación interclase de ambos métodos mostraron diferencia significativa siendo 0.35 para el software y 0.54 para el patólogo 2, lo cual muestra una concordancia mayor para el patólogo 2.

ImageJ mostro resultados más cercanos al gold estándar al compararse con patólogo 1 logrando mayor número de casos con medidas de índice de proliferación celular con diferencia menor al 5% vs el conteo celular manual (tabla 4). Esto es más evidente al analizar los coeficientes de correlación de clase de ambos métodos siendo 0.21 para el patólogo 1 y

0.35 para el software, con ello se demuestra que el software logra mejor correlación con el gold estándar que el patólogo 1.

Método	Diferencia <5%	Diferencia entre 5-10%	Diferencia >10%
Patólogo 1	10	7	111
Patólogo 2	37	23	68
ImageJ	34	18	76

Tabla 4. Número de casos en cada grupo de análisis (Diferencia <5%, Diferencia entre 5-10%, Diferencia >10%) según los métodos evaluados.

Los resultados de comparar las valoraciones realizadas por los dos patólogos entre sí demuestran una importante variabilidad interobservador evidente en el hecho de que solo hubo una diferencia menor al 5% en un único caso, en 7 casos los dos patólogos difieren en un 5-10%, y en 120 casos tuvieron una diferencia mayor al 10%. El coeficiente de correlación de clase entre las valoraciones de ambos patólogos fue de 0.13 indicando pobre concordancia entre ambos. Estos datos son similares a los encontrados por Chung, Y. R. et al, Nielsen, L. A. G et al(73) y Swarts, D. R. A et al(74), quienes han valorado este fenómeno en otras neoplasias.

Dentro de los resultados, es en extremo llamativo que los casos en los que ImageJ tuvo una diferencia menor al 5% en comparación con el gold estándar, todos ellos provienen de bloques procesados en el año 2020, mientras que aquellos con diferencia mayor al 10% son en su gran mayoría de bloques procesados en el año 2018, el coeficiente de correlación interclase también demostró correlación entre el año de procesamiento del caso y la valoración, encontrando que las valoraciones del software para los casos del año 2020

tuvieron un coeficiente de correlación de 0.87, a diferencia de los casos anteriores al 2020, los cuales mostraron un coeficiente de 0.015, esto puede sugerir que el año de realización de la inmunohistoquímica se correlaciona directamente con la capacidad discriminativa del software. Estos datos contrastan con los resultados de los patólogos del estudio en quienes se encontró una distribución más homogénea entre los años de procesamiento de los tejidos y los grupos de diferencias (Diferencia <5, Diferencia entre 5-10%, Diferencia >10%). Estos resultados obligan a plantear posibles causas de esta variación en la capacidad discriminativa del software, siendo posible que esto sea el resultado de una pérdida sutil en la intensidad de la tinción con el paso del tiempo en láminas realizadas por técnica manual de inmunohistoquímica, futuros estudios en este campo podrían evaluar láminas realizadas con técnica de inmunohistoquímica manual y automatizada de diferentes años de realización para corroborar esta hipótesis.

La implementación de la tecnología digital para análisis de imágenes usando ImageJ (immunoratio) requiere únicamente de un equipo de cómputo básico y tecnología de captura de imágenes (cámara digitales) equipos presentes en la gran mayoría de los laboratorios de patología modernos, sin embargo, después de las horas invertidas realizando el análisis de imágenes mediante immunoratio se debe señalar la necesidad de una configuración básica de variables, necesarias para su adecuado funcionamiento, lo cual requiere un entrenamiento básico en el plugin immunoratio para valorar las diferencias cromáticas en los píxeles de las imágenes y los valores que se deben establecer para el reconocimiento del tamaño nuclear, tanto de células positivas como negativas, además, previo al uso es necesario calibrar las variables para obtener un resultado en la medida de lo posible igual al de un conteo manual (imagen 3)

Sample identifier (optional):

☐ Define a region of interest (ROI) prior to analysis

▼ **Analysis settings**

Blankfield correction image (optional): **Using previously uploaded** [Upload new](#)

Image scale, pixels / μm : (0 = auto-detection)

Brown threshold adjustment: (-50 ... +50)

Blue threshold adjustment: (-50 ... +50)

Result correction equation: $y = 6.442E \times 10^{-5} x^3 + -0.0015 x^2 + 0.611 x + 0.4321$

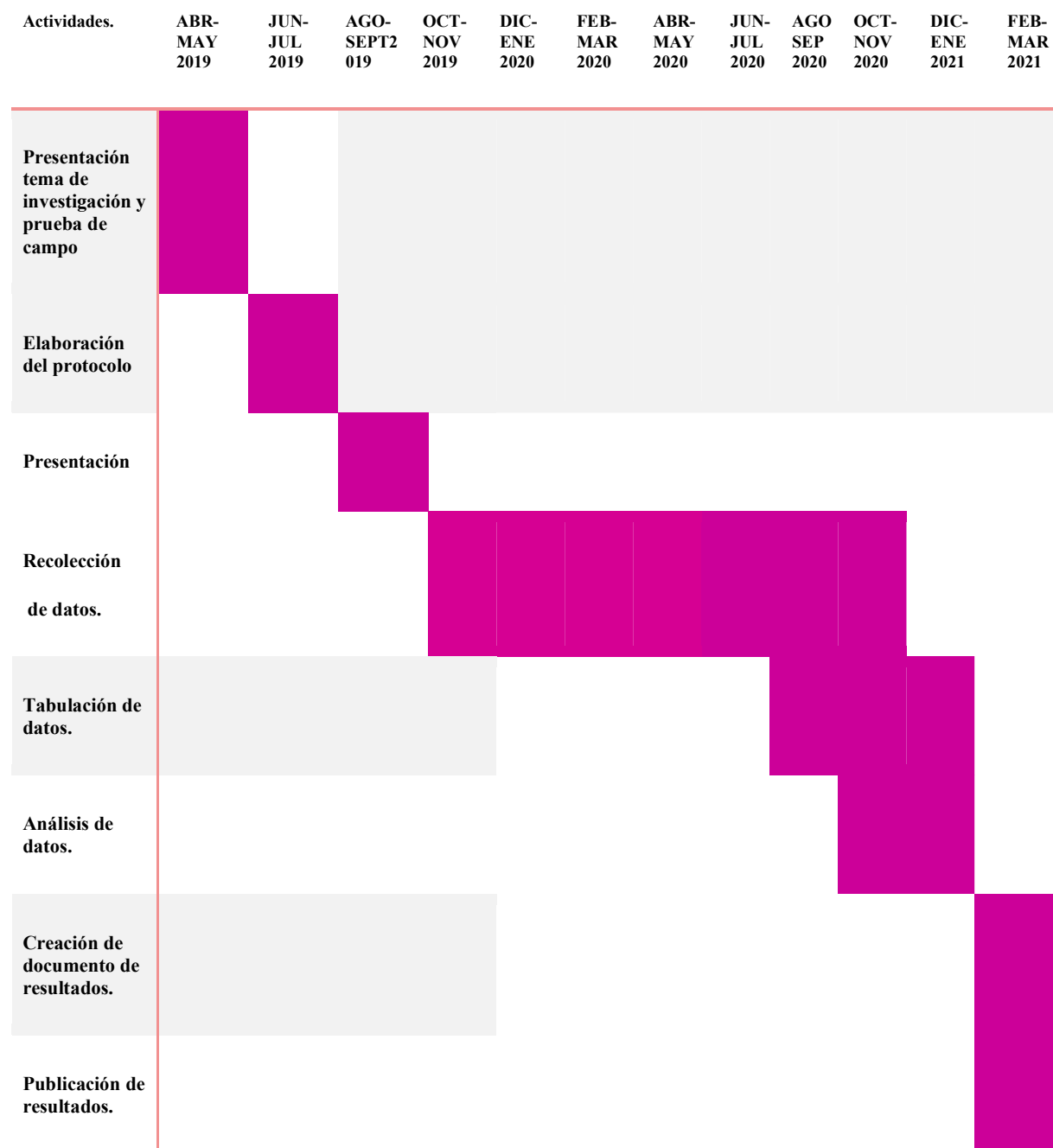
[Reset default values](#)

▼ **Results table**

Imagen 3. Página de configuración de variables plugin immunoratio.

En conclusión, ImageJ y su plugin immunoratio son una herramienta prometedora que logra una capacidad discriminativa equiparable a la de un patólogo, de fácil acceso dado su bajo costo de implementación es de bajo costo y facilidad de uso. Se debe resaltar que la evidencia plantea que la capacidad discriminativa del software se ve afectada por el tiempo transcurrido entre el procesamiento de la lámina de inmunohistoquímica y la medición, de tal manera que al utilizar el software en láminas de menos de 1 año de antigüedad la confiabilidad de la herramienta es excelente.

8. Cronograma



9. Resultados esperados y potenciales beneficiarios.

- Ponencia en el II Congreso Latinoamericano de Hematopatología

10. Presupuesto

Presupuesto global de la propuesta por fuentes de financiación.						
tem	RUBRO	UIS		OTRA(S) INSTITUCIÓN(ES)		TOTAL
		Especi e	Efecti vo	Es pecie	Ef ectivo	
	PERSO NAL	\$40'320.000	\$	\$	\$	\$
	LICEN CIA DE SOFTWARE	\$ 574.000	\$	\$	\$	\$
	PAPEL ERÍA Y ÚTILES DE ESCRITORIO	\$ 200.000	\$ 200.000	\$	\$	\$

	BIBLIOGRAFÍA	\$	\$2'400.000	\$	\$	\$
	SALIDAS DE CAMPO	\$ 0	\$	\$	\$	\$
0	PUBLICACIONES EN REVISTAS	\$ 1'000.000	\$	\$	\$	\$
1	DIVULGACIÓN Y SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS	\$ 1'800.000	\$	\$	\$	\$
3	OTROS	\$	\$	\$	\$	\$
TOTAL		\$60'094.000	\$2'600.000	\$	\$	\$62'694.000

11. Formato de recolección de datos.

No de caso: _____

Fecha de caso: _____

Fecha de lectura 1° patólogo: _____

Resultado de lectura 1° patólogo: _____

Fecha de lectura 2° patólogo: _____

Resultado de lectura 2° patólogo: _____

Fecha de lectura Image J: _____

Resultado de lectura Image J: _____

Fecha de conteo celular: _____

Resultado de conteo celular: _____

11.1 Instructivo

No de caso: consignar el numero interno del caso como aparece en la descripción microscópica.

Fecha del caso: Fecha en que se procesó la lámina de inmunohistoquímica.

Fecha de reporte: La fecha en la que se reportó el resultado.

Fecha de lectura 1° patólogo: fecha en que patólogo 1 realizo cálculo de IPC.

Resultado de lectura 1° patólogo: Resultado en porcentaje del cálculo de patólogo 1.

Fecha de lectura 1° patólogo: fecha en que patólogo 2 realizo cálculo de IPC.

Resultado de lectura 1° patólogo: Resultado en porcentaje del cálculo de patólogo 2.

Fecha de lectura Image J: Fecha en que se realiza cálculo de IPC con ImageJ.

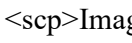
Resultado de lectura Image J: Resultado en porcentaje del cálculo de IPC con ImageJ.

Fecha de conteo celular: Fecha en que se realizó conteo celular.

Resultado de conteo celular: Resultado en porcentaje del cálculo de IPC por conteo celular.

Bibliografía.

1. William E. Paul. Fundamental immunology. Sixth. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
2. Elaine Jaffe, Daniel Arber, Elias Campo, Leticia Quintanilla-Martinez, Attilio Orazi. Hematopathology. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.
3. Taylor CR. Classification of lymphoma. Archives of pathology & laboratory medicine. 1978 Nov;102(11):549–54.
4. Skrabek P, Turner D, Seftel M. Epidemiology of Non-Hodgkin Lymphoma. Transfusion and Apheresis Science. 2013 Oct;49(2):133–8.
5. Alexander DD, Mink PJ, Adami H-O, Chang ET, Cole P, Mandel JS, et al. The non-Hodgkin lymphomas: A review of the epidemiologic literature. International Journal of Cancer. 2007;120(S12):1–39.
6. Salles G, de Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. Blood. 2011 Jun 30;117(26):7070–8.
7. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. Vol. 2. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.

8. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*. 2000 Mar;182(3):311–22.
9. Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, Müller-Reichert T, Neumann B, Poser I, et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*. 2016 Jul 14;535(7611):308–12.
10. Luo Y, Zhang X, Mo M, Tan Z, Huang L, Zhou H, et al. High Ki-67 Immunohistochemical Reactivity Correlates With Poor Prognosis in Bladder Carcinoma. *Medicine*. 2016 Apr;95(15):e3337.
11. Yamamoto S, Chishima T, Mastubara Y, Adachi S, Harada F, Toda Y, et al. Variability in Measuring the Ki-67 Labeling Index in Patients With Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. 2015 Feb;15(1):e35–9.
12. Chung YR, Jang MH, Park SY, Gong G, Jung W-H. Interobserver Variability of Ki-67 Measurement in Breast Cancer. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 2016 Mar 15;50(2):129–37.
13. Schroeder AB, Dobson ETA, Rueden CT, Tomancak P, Jug F, Eliceiri KW. The  ecosystem: Open-source software for image visualization, processing, and analysis. *Protein Science*. 2021 Jan 20;30(1):234–49.
14. Tuominen VJ, Ruotoistenmäki S, Viitanen A, Jumppanen M, Isola J. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Research*. 2010 Aug 27;12(4):R56.

15. van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry*. 2004 Jul;60B(1):1–13.
16. Delves PJ, Roitt IM. The Immune System. *New England Journal of Medicine*. 2000 Jul 13;343(2):108–17.
17. Delves PJ, Roitt IM. The Immune System. *New England Journal of Medicine*. 2000 Jul 6;343(1):37–49.
18. Longacre T, Foucar K, Crago S, Chen I, Griffith B, Dressler L, et al. Hematogones: a multiparameter analysis of bone marrow precursor cells. *Blood*. 1989 Feb 1;73(2):543–52.
19. Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, Patel DD, Hale LP. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annual review of immunology*. 2000;18:529–60.
20. Muller-Hermelink H-K. *The Human Thymus. Histopathology and Pathology*. Berlin: Springer; 1986.
21. Sminia T, Plesch BEC. An immunohistochemical study of cells with surface and cytoplasmic immunoglobulins in situ in Peyer's patches and lamina propria of rat small intestine. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*. 1982 Jan;40(1):181–9.

22. Vinay Kumar, Abul Abbas, Jon Aster. Robbins Basic Pathology. 10th ed. Vinay Kumar, Abul Abbas, Jon Aster, editors. Philadelphia: Elseiver; 2017.
23. Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunology Today*. 1994 Sep;15(9):406–11.
24. Munro JM, Freedman AS, Aster JC, Gribben JG, Lee NC, Rhynhart KK, et al. In vivo expression of the B7 costimulatory molecule by subsets of antigen-presenting cells and the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood*. 1994 Feb 1;83(3):793–8.
25. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting Edge: Direct Suppression of B Cells by CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*. 2005 Oct 1;175(7):4180–3.
26. Joseph Mendel Yoffey, Frederick Colin Courtice. Lymphatics, lymph and the lymphomyeloid complex. 1st ed. London: Academic Press; 1970.
27. von Andrian UH, Mackay CR. T-Cell Function and Migration — Two Sides of the Same Coin. *New England Journal of Medicine*. 2000 Oct 5;343(14):1020–34.
28. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*. 2005 Aug;5(8):606–16.
29. Steiniger B, Rüttinger L, Barth PJ. The Three-dimensional Structure of Human Splenic White Pulp Compartments. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2003 May 26;51(5):655–63.

30. Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch J v., Poplack DG, Waldmann TA, Leder P.
Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981 Nov 1;78(11):7096–100.
31. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2010;78B(S1):S47–60.
32. Kondo M, Scherer DC, Miyamoto T, King AG, Akashi K, Sugamura K, et al. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature*. 2000 Sep;407(6802):383–6.
33. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*. 2013 Feb 25;13(2):118–32.
34. Elaine Sarkin Jaffe. *Pathology and Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 3rd ed. Berlin: International Agency for Research on cancer; 2003.
35. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Sep 20;32(27):3059–67.
36. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, editors. Vol. 1. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.

37. Hehn ST, Grogan TM, Miller TP. Utility of Fine-Needle Aspiration As a Diagnostic Technique in Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2004 Aug 1;22(15):3046–52.
38. A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*. 1997 Jun 1;89(11):3909–18.
39. Arnaud L, Hervier B, Néel A, Hamidou MA, Kahn J-E, Wechsler B, et al. CNS involvement and treatment with interferon- α are independent prognostic factors in Erdheim-Chester disease: a multicenter survival analysis of 53 patients. *Blood*. 2011 Mar 10;117(10):2778–82.
40. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Journal of Clinical Oncology*. 1998 Aug;16(8):2780–95.
41. Blair A. Occupational exposures and non-Hodgkin lymphoma: where do we stand? *Occupational and Environmental Medicine*. 2006 Jan 1;63(1):1–3.
42. Chiu BC-H, Weisenburger DD. An Update of the Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clinical Lymphoma*. 2003 Dec;4(3):161–8.
43. Hartge P. Residential Herbicide Use and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2005 Apr 1;14(4):934–7.

44. Zhang Y, Sanjose SD, Bracci PM, Morton LM, Wang R, Brennan P, et al. Personal Use of Hair Dye and the Risk of Certain Subtypes of Non-Hodgkin Lymphoma. *American Journal of Epidemiology*. 2008 Mar 25;167(11):1321–31.
45. Willett E v., Morton LM, Hartge P, Becker N, Bernstein L, Boffetta P, et al. Non-Hodgkin lymphoma and obesity: A pooled analysis from the InterLymph Consortium. *International Journal of Cancer*. 2007 Dec 31;122(9):2062–70.
46. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980 Dec;77(12):7415–9.
47. Wong-Staal F, Gallo R. The family of human T-lymphotropic leukemia viruses: HTLV-I as the cause of adult T cell leukemia and HTLV-III as the cause of acquired immunodeficiency syndrome. *Blood*. 1985 Feb 1;65(2):253–63.
48. Snoda S. Relationship of HTLV-I-related adult T-cell leukemia and HTLV-I-associated myelopathy to distinct HLA haplotypes. *Jikken Igaku*. 1987;769.
49. Vockerodt M, Yap L-F, Shannon-Lowe C, Curley H, Wei W, Vrzalikova K, et al. The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *The Journal of Pathology*. 2015 Jan;235(2):312–22.
50. Carbone A, Cesarman E, Spina M, Gloghini A, Schulz TF. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood*. 2009 Feb 5;113(6):1213–24.

51. Henle W, Diehl V, Kohn G, zur Hausen H, Henle G. Herpes-Type Virus and Chromosome Marker in Normal Leukocytes after Growth with Irradiated Burkitt Cells. *Science*. 1967 Sep;157(3792):1064–5.
52. de Sanjose S, Benavente Y, Vajdic CM, Engels EA, Morton LM, Bracci PM, et al. Hepatitis C and Non-Hodgkin Lymphoma Among 4784 Cases and 6269 Controls From the International Lymphoma Epidemiology Consortium. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2008 Apr;6(4):451–8.
53. Stathis A, Chini C, Bertoni F, Proserpio I, Capella C, Mazzucchelli L, et al. Long-term outcome following *Helicobacter pylori* eradication in a retrospective study of 105 patients with localized gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Annals of Oncology*. 2009 Jun;20(6):1086–93.
54. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994 Sep 1;84(5):1361–92.
55. Xie Y, Pittaluga S, Jaffe ES. The Histological Classification of Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Seminars in Hematology*. 2015 Apr;52(2):57–66.
56. Kamel OW. Iatrogenic lymphoproliferative disorders in nontransplantation settings. *Seminars in diagnostic pathology*. 1997 Feb;14(1):27–34.
57. Freeman C, Berg JW, Cutler SJ. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer*. 1972 Jan;29(1):252–60.

58. HUI PK, FELLER AC, LENNERT K. High-grade non-Hodgkin's lymphoma of B-cell type. I. Histopathology. *Histopathology*. 1988 Feb;12(2):127–43.
59. Kennedy GA, Tey S-K, Cobcroft R, Marlton P, Cull G, Grimmett K, et al. Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review. *British Journal of Haematology*. 2002 Nov;119(2):412–6.
60. Harada S, Suzuki R, Uehira K, Yatabe Y, Kagami Y, Ogura M, et al. Molecular and immunological dissection of diffuse large B cell lymphoma: CD5+, and CD5– with CD10+ groups may constitute clinically relevant subtypes. *Leukemia*. 1999 Sep 9;13(9):1441–7.
61. Villuendas R, Piris MA, Orradre JL, Mollejo M, Rodriguez R, Morente M. Different bcl-2 protein expression in high-grade B-cell lymphomas derived from lymph node or mucosa-associated lymphoid tissue. *The American journal of pathology*. 1991 Nov;139(5):989–93.
62. Pătrașcu AM, Rotaru I, Olar L, Pătrașcu Ș, Ghiluși MC, NeamȚu SD, et al. The prognostic role of Bcl-2, Ki67, c-MYC and p53 in diffuse large B-cell lymphoma. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2017;58(3):837–43.
63. Weiss LM, Strickler JG, Medeiros LJ, Gerdes J, Stein H, Warnke RA. Proliferative rates of non-Hodgkin's lymphomas as assessed by Ki-67 antibody. *Human Pathology*. 1987 Nov;18(11):1155–9.

64. Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, Spier CM, Brazier RM, Banks PM, et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood*. 1994 Mar 15;83(6):1460–6.
65. He X, Chen Z, Fu T, Jin X, Yu T, Liang Y, et al. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer*. 2014 Dec 5;14(1):153.
66. Booth DG, Takagi M, Sanchez-Pulido L, Petfalski E, Vargiu G, Samejima K, et al. Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *eLife*. 2014 May 27;3.
67. Rahmanzadeh R, Hüttmann G, Gerdes J, Scholzen T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Proliferation*. 2007 Jun;40(3):422–30.
68. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006 Jun 7;295(21):2492.
69. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO classification of Tumours of the central nervous system. 4th ed. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.
70. Mittler MA, Walters BC, Stopa EG. Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *Journal of Neurosurgery*. 1996 Dec;85(6):1091–4.

71. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, et al.
Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *British Journal of Haematology*. 2005 Oct;131(1):29–38.
72. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al.
Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2011 Nov 16;103(22):1656–64.
73. Nielsen LAG, Bangsø JA, Lindahl KH, Dahlrot RH, Hjelmberg J v. B, Hansen S, et al.
Evaluation of the proliferation marker Ki-67 in gliomas: Interobserver variability and digital quantification. *Diagnostic Pathology*. 2018 Dec 9;13(1):38.
74. Swarts DRA, van Suylen R-J, den Bakker MA, van Oosterhout MFM, Thunnissen FBJM, Volante M, et al. Interobserver Variability for the WHO Classification of Pulmonary Carcinoids. *American Journal of Surgical Pathology*. 2014 Oct;38(10):1429–36.