

Libro Blanco

2021

de la

Anatomía Patológica en España



Libro Blanco

**2021**

de la

Anatomía Patológica en España



Libro Blanco

**2021**

de la

Anatomía Patológica en España

---

Recomendaciones de los Grupos de Trabajo  
para el  
Diagnóstico Anatomopatológico

Coordina:

Esther Roselló Sastre

1ª edición (1997)  
ISBN: 84-699-3297-7  
D.L.: MA-40/2009

Suplemento (1999)  
D.L.: NA-2.749/2009

2ª edición (2009)  
ISBN: 13:978-84-692-1562-3  
D.L.: 2.059/2009

Suplemento (2011)  
D.L.: 1.883/2011

3ª edición (2013)  
D.L.: M-14.463/2013

4ª edición (2015)  
D.L.: VI-319/2015

5ª edición (2017)  
URL: [www.seap.es/libros-blancos](http://www.seap.es/libros-blancos)  
ISBN: 978-84-697-3704-0

6ª edición (2019)  
URL: [www.seap.es/libros-blancos](http://www.seap.es/libros-blancos)  
ISBN: 978-84-091-2638-5  
D.L.: VI-520/2019

7ª edición (2021)  
URL: [www.seap.es/libros-blancos](http://www.seap.es/libros-blancos)  
ISBN: 978-84-09-30732-6

© Sociedad Española de Anatomía Patológica  
Jordi Temprana Salvador

## Junta Directiva de la Sociedad Española de Anatomía Patológica

Presidente: <b>Xavier Matias Guiu</b>	Vocal de Comité Científico: <b>Blanca González Farré</b>
Presidente electo: <b>Jose Luis Rodríguez Peralto</b>	Vocal de Programa del Control de Calidad: <b>Antonio Martínez Pozo</b>
Presidente anterior: <b>José Palacios Calvo</b>	Vocal de Comunicación y Proyección Social: <b>Jordi Temprana Salvador</b>
Tesorera: <b>Mar Iglesias Coma</b>	Vocal de Ejercicio Libre: <b>Agustín Acevedo</b>
Secretaria: <b>Belen Pérez Mies</b>	Vocal de Libro Blanco: <b>Esther Roselló Sastre</b>
Representante MIR: <b>Irene Carretero Barrio y Joan Lop Gros</b>	Vocal de Grupos de Trabajo: <b>Santiago Nieto Llanos</b>
Vocal de Docencia: <b>Aurelio Ariza Fernández</b>	Vocal Representante de Patólogos en Formación: <b>Irene Carretero Barrio y Joan Lop Gros</b>
Vocal de Formación Continuada: <b>Mª Carolina Martínez Ciarpaglini</b>	Vocal de Técnicos en Anatomía Patológica: <b>Virginia de Lucas López</b>
Sub-Vocales de Formación Continuada: <b>David Hardisson Hernández y Mª Carmen Gómez Mateo</b>	Vocal de Edición de Revista Española de Patología: <b>Miguel Angel Idoate Gastearena</b>

## Presidentes de las asociaciones territoriales de la S.E.A.P.

ANDALUCÍA <b>Luis Vicioso Recio</b>	CATALUÑA <b>Irmgard Costa Trchsel</b>
ARAGÓN <b>Mar García García</b>	EXTREMADURA <b>Mª Antonia Crespo Santos</b>
ASTURIAS <b>Ivan Fernandez Vega</b>	GALICIA <b>Mª del Carmen Penín Corderi</b>
BALEARES <b>Alexandra Gene Heym</b>	MADRID <b>Julián Sanz Ortega</b>
CANARIAS <b>Idaira Jael Expósito Afonso</b>	MURCIA <b>María Amparo Torroba Carón</b>
CANTABRIA <b>Teresa Azcarretazabal</b>	NAVARRA Y LA RIOJA <b>Irene Amat Villegas</b>
CASTILLA-LA MANCHA <b>Syonghyun Nam Cha</b>	PAÍS VASCO <b>Arantza Onaindia Pérez</b>
CASTILLA Y LEÓN <b>Rocío Martín López</b>	VALENCIA <b>Pascual Meseguer García</b>

## Coordinadores de los grupos de trabajo participantes en esta edición

### **Grupo de trabajo de Historia de la Patología**

Luis Alfaro  
(lalfaro@comv.es)

### **Grupo de trabajo de Patología Digital**

Marcial García Rojo  
(marcial@seis.es)

### **Grupo de trabajo de Inmunohistoquímica y Patología Molecular**

Fernando López-Ríos  
(fernandolopezriosmoreno@gmail.com)

### **Grupo de trabajo de Linfomas**

Santiago Montes Moreno  
(santiago.montes@scsalud.es)

### **Grupo de trabajo de Patología Digestiva**

Miriam Cuatrecasas  
(mquatrec@gmail.com)

### **Grupo de trabajo de Técnicos Superiores en Anatomía Patológica y Citología (TSAPyC)**

Virginia de Lucas López  
(virginia.lucas@fjd.es)

### **Grupo de trabajo de Gestión Aplicada y Calidad**

Antonio Martínez Lorente  
(amlorente@vinaloposalud.com)



# Índice

PRESENTACIÓN.....	11
<i>Xavier Matias-Guiu Guia</i>	
INTRODUCCIÓN.....	13
<i>Esther Roselló Sastre</i>	
1. GRUPO DE TRABAJO DE HISTORIA DE LA PATOLOGÍA DE LA SEAP .....	15
<i>Luis Alfaro</i>	
Orígenes y antecedentes de la Sociedad Española de Anatomía Patológica.....	17
2. GRUPO DE TRABAJO DE PATOLOGÍA DIGITAL DE LA SEAP .....	31
<i>Marcial García Rojo</i>	
Aplicaciones de <i>deep learning</i> , un método de inteligencia artificial, en anatomía patológica .....	33
3. GRUPO DE TRABAJO DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA SEAP.....	63
<i>Susana Hernández, Esther Conde, Ana Suárez-Gauthier, Rebeca Martínez, Fernando López-Ríos</i>	
Implementación de la secuenciación masiva dirigida en la actividad asistencial de los servicios de anatomía patológica. Un resumen teórico con recomendaciones prácticas .....	65
4. RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO DE LINFOMAS DE LA SEAP .....	73
<i>Santiago Montes Moreno, Manuela Mollejo Villanueva, Máximo Fraga, Juan Fernando García, José Luis Villar, Antonio Martínez, Socorro María Rodríguez Pinilla, Empar Mayordomo Aranda, Ana Batlle, Mariano Provencio Pulla, María Rozmán, Ramón García Sanz</i>	
Recomendaciones para el estudio histopatológico, inmunohistoquímico, citogenético y molecular e informe diagnóstico de los procesos neoplásicos linfoides. Consenso SEAP-SEHH-GOTEL.....	75
Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Introducción.....	77
Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico.....	81
Estudio histopatológico de tejidos hematolinfoides.....	87
Estudio inmunohistoquímico. Aplicación del inmunofenotipado de neoplasias linfoides .....	91
Estudio citogenético-FISH .....	97
Estudio molecular .....	105
Informe diagnóstico .....	113
Linfomas B no Hodgkin:	
Linfomas B indolentes:	
Leucemia linfocítica crónica B / Linfoma B linfocítico de célula pequeña.....	115
Leucemia células B-prolinfocítica .....	123
Linfoma folicular.....	125
Linfomas de la zona marginal:	
Linfoma esplénico de la zona marginal.....	133
Linfoma de la zona marginal tipo MALT .....	139
Linfoma de la zona marginal tipo ganglionar.....	143
Linfoma linfoplasmacítico .....	147
Otros procesos linfoproliferativos:	
Leucemia de células peludas.....	151
Linfoma B esplénico de células pequeñas, difuso de la pulpa roja.....	155
Leucemia de células peludas, variante.....	159
Linfomas B agresivos:	

Linfoma de Burkitt.....	161
Linfoma B difuso de célula grande .....	165
Linfoma B de alto grado doble hit/triple hit/NOS.....	173
Linfoma B de células del manto .....	177
Plasmocitoma/Gammapatía monoclonal de significado incierto/Mieloma múltiple.....	181
Linfoma de Hodgkin y linfoma de la zona gris (linfoma B inclasificable con rasgos intermedios entre LBDCG y LHC) .....	185
Linfomas T y T/NK:	
Leucemias/Linfomas linfoblásticos (T y B).....	191
Linfomas T ganglionares:	
Linfoma de células T periférico (NOS).....	195
Linfomas ganglionares de células T con fenotipo <i>follicular helper</i> .....	199
Linfoma de células grandes T anaplásico, ALK+ y ALK-.....	203
Leucemia de linfocitos grandes granulares, leucemia prolinfocítica, linfoma hepatoesplénico, leucemias NK, linfomas enteropáticos y sd linfoproliferativos T pediátricos asociados a VEB.....	207
Linfomas primarios cutáneos.....	215
Neoplasias de células histiocíticas y de células dendríticas.....	225
5. RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO DE PATOLOGÍA DIGESTIVA DE LA SEAP.....	229
<i>Carolina Martínez Ciarpaglini, Miriam Cuatrecasas, Isidro Machado, Eva Musulén, Mar Iglesias, Stefania Landolfi</i>	
Gemaciones tumorales o desdiferenciación tumoral focal ( <i>tumor budding</i> ) y grupos de tumor pobremente diferenciados ( <i>poorly differentiated clusters</i> ) en carcinoma colorrectal.....	231
Apéndice cecal: Tumores mucinosos apendiculares. Actualización del informe diagnóstico protocolizado y modificaciones en el estadio .....	239
Clasificación histológica del cáncer gástrico y síndromes hereditarios de predisposición al cáncer gástrico .....	247
6. RECOMENDACIONES DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CITOLOGÍA.....	257
<i>Belén Lloveras Rubio, Ignacio Sánchez Güerri, Sonsoles Aso</i>	
Terminología en citología por punción-aspiración de tiroides.....	259
7. RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO DE TÉCNICOS SUPERIORES EN ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOLOGÍA DE LA SEAP .....	267
<i>Eva Rodríguez Escudero, Patricia Barreiro Sanabria, Rosa María Rodero Villanueva, M de los Ángeles Cerón Nieto, María del Mar Olmo Fernández</i>	
Recomendaciones en citología del grupo de trabajo de técnicos de anatomía patológica.....	269
Metodología y técnicas en la obtención de material citológico en los laboratorios de anatomía patológica.....	271
Manejo de las muestras procedentes de PAAF en servicios de anatomía patológica.....	279
Patología molecular en el laboratorio de citología.....	281
La citología en el laboratorio de inmunohistoquímica.....	287
El no hacer en citología.....	289
8. RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO DE GESTIÓN APLICADA Y CALIDAD DE LA SEAP.....	291
<i>Antonio Martínez Lorente, Rosario Granados Carreño, Cristian Perna Monroy, Teresa Hermida, Silvia Carnicero, Rita M. Regojo, Virginia de Lucas López, Esther Roselló</i>	
Recomendaciones de la SEAP para la era SARS-COV2: Bioseguridad en patología quirúrgica, citología y autopsias. Operativa de retorno a la normalidad.....	293
Proyecto para la estimación de la carga de trabajo en citopatología, histopatología, patología molecular y digitalización (tiempo técnico) atendiendo al catálogo de muestras y procedimientos de la SEAP .....	317

# Presentación

**Xavier Matias-Guiu Guia**

*Presidente de la SEAP*

Es para mí un placer escribir la presentación del Libro Blanco de la SEAP 2021. En primer lugar, agradecer a Esther Roselló por la coordinación del mismo. Me consta el trabajo y esfuerzo que supone aglutinar estos manuscritos, que abarcan un número importante y variado de temas, como la historia de la SEAP, con referencia a importantes figuras de la Patología Española, la Patología Digital, con las perspectivas de la Inteligencia Artificial, el impacto de la secuenciación masiva en nuestra práctica, una actualización sobre integración de resultados fenotípicos y moleculares en los procesos neoplásicos linfoides, recomendaciones del grupo de Patología Digestiva y de la Sociedad Española de Citología. El volumen termina con las recomendaciones del grupo de trabajo de Gestión Aplicada y Calidad de la SEAP sobre bioseguridad en nuestros servicios, con el objetivo de adaptarnos a la situación pandémica y post-pandémica. También resaltar la contribución de los técnicos de anatomía patológica. Enhorabuena a todos los participantes.

Al examinar este volumen, inmediatamente vienen a mi mente recuerdos de presentaciones del Libro Blanco en los sucesivos congresos de la SEAP, desde su presentación inicial como curso precongreso en el Congreso de Málaga de 1997. Por supuesto, el recuerdo a José Antonio Giménez Mas, que lo hizo resurgir en 2009. José Antonio fue un profesional de altísimo valor, al que echamos mucho de menos. También es de justicia hacer un reconocimiento público a Isabel Guerra, por los años que en que ha tenido la labor de generar sucesivas actualizaciones del Libro Blanco, desde 2015 hasta 2019. Isabel, gran profesional y persona ha pasado el testigo a Esther, en esta edición. Aunque Isabel ha dejado sus responsabilidades asistenciales hace pocos meses, esperamos contar con su opinión y ayuda en las sucesivas ediciones del Libro Blanco, en las que actualizaremos la encuesta, que generamos con regularidad, sobre aspectos profesionales de nuestra especialidad.

De nuevo, gracias a Esther, y a todos los que han contribuido en esta edición.



# Introducción

**Esther Roselló Sastre**

*Coordinadora*

Aquí tenemos un nuevo volumen del Libro Blanco, con actualización de temas asistenciales, que nos ocupan y preocupan la mayor parte de nuestra jornada laboral, y de otros temas más transversales que nos convierten en patólogos y técnicos más humanos y conocedores de la historia de nuestra sociedad científica (al que hace referencia el capítulo de la historia de la SEAP).

Los temas tratados en este volumen nos impulsan hacia el futuro, con una visión de lo que pueden y deben llegar a ser nuestros servicios de anatomía patológica (con un capítulo dedicado a la inteligencia artificial aplicada a la patología y otro capítulo dedicado a la implementación de técnicas moleculares de NGS en nuestros centros).

Dentro de los temas asistenciales, contamos con la actualización del mundo de los linfomas, de la patología neoplásica gastro-intestinal, de las recomendaciones para mejorar la calidad de la citología en su conjunto (primer capítulo elaborado íntegramente por los técnicos), y para mejorar la calidad diagnóstica de la citología tiroidea en particular, mediante la implementación del Sistema Bethesda.

En esta edición, contamos con un capítulo muy especial que coincide con la pandemia de Covid-19: un capítulo dedicado a mejorar nuestros centros y nuestro método de trabajo con el fin de minimizar el riesgo de contagios. Queda finalmente un capítulo que nos servirá de base para desarrollar un sistema de cuantificación de la carga laboral de los TSAPyC en nuestros centros, al que estáis todos invitados a participar, para que sea lo más universal posible.

Esta vez el Libro Blanco se publica sólo en formato electrónico, estando así disponible para todos desde la página web de la SEAP. Prescindimos del papel, para adaptarnos a los tiempos y contribuir a preservar el planeta.

Nada de esto hubiera sido posible sin el trabajo de un buen grupo de compañeros, patólogos y técnicos, que se han esforzado por actualizar y hacer comprensibles para todos los no expertos, los temas que conocen muy a fondo. Agradecemos su colaboración y desde ya os animamos a todos a seguir preparando nuevos capítulos para la edición 2023, porque *«tempus fugit»*.

Y mi mayor agradecimiento para Isabel Guerra, mi predecesora, mi mentora y siempre colaboradora, y para Jordi Temprana, que le ha dado agilidad y juventud al proyecto. Sin olvidar por supuesto a nuestro presidente, Xavier Matías, que ha creído en el proyecto y nos ha dado todas las facilidades para poder llevarlo a cabo.



# GRUPO DE TRABAJO DE HISTORIA DE LA PATOLOGÍA DE LA SEAP





# Orígenes y antecedentes de la Sociedad Española de Anatomía Patológica

**Luis Alfaro**

*Coordinador del Grupo de Trabajo de Historia de la Patología de la SEAP*

La edición de 2013 del libro blanco de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP), recoge un trabajo de uno de sus más destacados miembros, el Dr. Juan Domingo Toledo y Ugarte, que trata de poner orden en la lista histórica de socios. Como él indica: «Las sociedades humanas se fortalecen recordando sus orígenes» [1]. Más de 60 años después de la fundación de la SEAP, volvemos a recordar aquellos tiempos iniciales, tras intentar localizar fotografías de los socios fundadores que nos proporcionen una memoria gráfica. Algunos son muy conocidos por su continua vinculación con la SEAP, y por su relevancia científica, pero otros son casi desconocidos, por tener a la Patología como actividad secundaria, por el abandono de la misma o por su temprano fallecimiento. Al margen de las fuentes bibliográficas tradicionales, hemos tenido ocasión en los últimos años de hablar personalmente con alguno de los socios que tenían recuerdo directo de la fundación de la SEAP. Aquellas conversaciones, además del valor histórico de recoger aquello que solo ellos vivieron, resultaron una vivencia extremadamente entrañable y emotiva y no hacen sino poner de manifiesto la gratitud y homenaje que les debemos, por todo lo que nos enseñaron y por su continua lucha en el progreso y la defensa de nuestra Patología.

El 26 de octubre de 1959 se reúnen en Madrid, en la sede del Instituto Cajal y constituyen una junta directiva interina de la Sociedad Española de Anatomía Patológica los doctores: Julián Sanz Ibáñez, como presidente; Ángel Valle Jiménez, como secretario; Julio Rodríguez Puchol como tesorero; y Manuel Morales Pleguezuelo, Juan Manuel Ortiz Picón y Luis Zamorano Sanabra, como vocales [2].

Las primeras actas constan manuscritas en un libro y firmadas por el secretario Ángel Valle. Sin embargo, la primera acta tiene una versión mecanografiada con la misma fecha, firmada por el presidente y el tesorero, en la que se expresa la autorización del Ministro de la Gobernación para la constitución de la Asociación e incluye los siguientes asistentes: Julián Sanz Ibáñez, José Manuel Ortiz Picón, Manuel Morales Pleguezuelo, Julio Rodríguez Puchol, Juan Domínguez Gil, Horacio Oliva Aldamiz, Luis Zamorano Sanabria (sic), María Teresa Hidalgo Martínez, Ángel Valle Jiménez y Carlos Liñán Olmos (añadido a mano). Se relacionan los cargos electos de la junta directiva:

Presidente: Dr. J Sanz Ibáñez  
Vicepresidente: Dr. J. Sánchez Lucas  
Tesorero: Dr. J. Rodríguez Puchol  
Secretario: Dr. A. Valle Jiménez  
Vocal 1º: Dr. M. Morales Pleguezuelo  
Vocal 2º: Dr. L. Zamorano Sanabría  
Vocal 3º: Dr. J.M. Ortiz Picón  
Vocal 4º: Dr. M. Pérez Lista

**Figura 1.** Primera junta directiva de la SEAP 1959-1960.



Julián Sanz Ibáñez (presidente); Julio García Sánchez Lucas (vicepresidente), Ángel Valle Jiménez (secretario); Julio Rodríguez Puchol (tesorero). Manuel Morales Pleguezuelo (vocal 1º); José María Ortiz Picón (vocal 2º); Luis Zamorano Sanabra (vocal 3º); Manuel Pérez Lista (vocal 4º).

Los acuerdos de esa primera junta son: 1) enviar boletines de inscripción para reclutar nuevos asociados; 2) ponerse en relación con todas las sociedades internacionales de anatomía patológica; 3) enviar a los medios de comunicación la noticia de constitución de la sociedad, 4) Invitar al acto de

inauguración de la Sociedad a los doctores Marañón, Jiménez Díaz y Vara López (haciendo un oficio a la comisaria de policía).

La sesión inaugural se celebró el 10 de mayo de 1960 en la sede del Instituto Cajal en la calle Velázquez 138 de Madrid con la Intervención de: 1) Prof. Vara López: «Relaciones entre la Cirugía y la Anatomía Patológica»; 2) Prof. Jiménez Díaz: «Relaciones entre la medicina interna y la anatomía patológica»; y 3) Prof. Sanz Ibáñez: «Significación y finalidad de la Sociedad Española de Anatomía Patológica» (acta 2). El anuncio del acto quedó recogido en la prensa madrileña [3]. Las conferencias fueron grabadas por la empresa Infordisco pero en la siguiente reunión de la SEAP, el 3 de junio de 1960, se deniega la adquisición de las mismas (acta 3). La siguiente reunión de la junta directiva celebrada el 7 de julio de 1960, fija la fecha de la primera Asamblea General de la SEAP para los días 23 y 24 de septiembre de ese año, en la que propone la aprobación del reglamento de la sociedad y la elección de los cargos definitivos de la junta directiva (acta 4). Las siguientes actas recogen, además de acuerdos administrativos, las primeras comunicaciones científicas. En la reunión de 28 de octubre de 1960 (acta nº6) se acuerda dirigirse al presidente del Colegio Oficial de Médicos, para que incluya en la lista de especialidades, la de Histopatología (en la denominación de la época) para las entidades del seguro libre. El 18 de noviembre de 1960 (acta 7) se acuerda reducir la cuota mensual de la SEAP a 25 pesetas, desde las 50 inicialmente estipuladas. En la reunión de 22 de junio de 1961 (acta 12) se trata sobre la posible Federación con la Sociedad de Análisis Clínicos. En 30 de octubre de 1961 (acta 13) se planteó el problema de si se debían o no firmar los informes falsos que piden a veces los familiares de los enfermos. Se aprobó que se podría hacer un informe falso, incluso con el nombre del patólogo, pero sin firmarlo. Este tema vuelve a tratarse en la reunión de 26 de marzo de 1962 (acta 17) a propuesta del Dr. José Gómez Sánchez. En 30 de noviembre del 1962 (acta 22) se plantea la posible convalidación de los títulos de análisis clínicos y anatomía patológica. El presidente propone consultar al Ministerio o a la Facultad si la petición de título oficial debe ser nominal e individual o a propuesta de la Sociedad. Los días 22, 23 y 24 de abril de 1963 (acta 25) se celebra en Salamanca el Primer Congreso Nacional (figura 2), organizado por el Prof. Zamorano. En la Asamblea anual se trató de nuevo la posible federación con la Asociación de Análisis Clínicos y Hematología. Se elige Santiago de Compostela para acoger al II Congreso en 1965; y se propone conseguir tumores modelo para hacer preparaciones y enviarlas a los asociados que las soliciten. El 21 octubre de 1963 (acta 26) se celebra el funeral por el presidente Julián Sanz Ibáñez, conjuntamente con la Sociedad de Citología, seguida por una sesión necrológica en el Instituto Cajal, con la Intervención de los Profs. Sánchez Lucas, Valle y Montalvo. Se procede a elegir al Prof. Luis Zamorano como nuevo presidente.

**Figura 2.** Primer Congreso SEAP. Salamanca 1963.



De izquierda a derecha: No identificado, Luis Zamorano Sanabra, Julián Sanz Ibáñez (de pie), Alfonso Balcells Gorina (Rector U. Salamanca), Fernando Cuadrado Cabezón (Decano F. Medicina), Julio García Sánchez Lucas.

El 17 de enero de 1964 (acta 27) el presidente informa sobre las gestiones con el Seguro de Enfermedad para que en todas las residencias hubiera un anatomopatólogo, ya que solo están donde hay facultad de medicina, siendo entonces el encargado el catedrático de la asignatura. Se propone que en todos los hospitales se creen jefes de servicio de anatomía patológica, que al mismo tiempo podrían ser los de las residencias del seguro. En 30 de noviembre de 1964 (acta 30) se celebra sesión necrológica por el Dr. Rodríguez Pérez (vocal de la Sociedad). El presidente informa sobre las gestiones realizadas en Salzburgo para la constitución de la Sociedad Europea de Patológica. En Santiago de Compostela durante el II Congreso Nacional se celebra el 9 de mayo de 1965 (acta 32) asamblea para elegir nueva Junta Directiva. Se acordó elegir 2 vocales de Madrid y 2 de provincias. El Prof. Zamorano continúa como presidente. El Prof. Bullón es elegido vicepresidente, como tesorero es reelegido el Dr. R. Puchol, y como secretario fue elegido el Dr. Anaya. Los Vocales electos fueron los Dres. Oliva Aldamiz, Valle Jiménez, Toledo Ugarte y Herranz Rodríguez. En 24 de mayo de 1965 (acta 33) se informa de la petición al Ministerio de Educación del cambio de nombre del título de especialista en histopatología por el de anatomía patológica. El Dr. Zamorano propone que se estudie la posibilidad de crear una revista de la Sociedad. En 23 de julio de 1965 (acta 34) se propone la posibilidad de separar las cátedras de anatomía patológica e histología. Por no existir unanimidad el problema queda sobre la mesa. La Junta directiva comisiona a los Dres. Zamorano y Oliva para estudiar el problema de la revista. Se nombran socios representantes en provincias: Dres. Manuel Alejo Pedrero en Badajoz; Aguirrezabal en Vitoria; Sáez Marrero en Las Palmas; Ibáñez Cepero en Valladolid; García Rodeja en León; García Arroyo en Cáceres; Sánchez Lucas en Barcelona; García Sanz en Oviedo; Herrero Zapatero en Oviedo; Llombart Bosch en Valencia; Llorca Lledó en Alicante, Manzanares Puerta en Logroño; Martínez Pérez en Zaragoza; Oliva Priego en Santander; Rodríguez Bermejo en Murcia; Sard Oliver en Mallorca; Varela Núñez en Santiago; Vigil Menéndez en Gijón, Fernández Grassi en Vigo, Ortiz Picón en Granada.

En 24 de noviembre de 1967 (acta 40) se aprueban las gestiones para la aparición de la revista de la Sociedad y su denominación como «Patología», el contrato con el editor, la aparición trimestral y la subida de la cuota anual de socio a 800 pesetas. Se aprueba nombrar al Dr. Anaya como director de la revista y un comité de redacción compuesto por los Dres. Carrato, Escalona, Herranz, Llombart y Navarro. Se planea un homenaje a los doctores Fernando de Castro y Carlos Jiménez Díaz. En 7 de mayo de 1969 durante el III Congreso Nacional en Pamplona se celebra asamblea (acta 41). El Dr. Anaya es confirmado director de la revista. El Dr. Galera propone que la Asamblea se pronuncie contra los contratos de patólogos en la Seguridad Social. Pide crear un comité que estudie el problema y emita un juicio de aprobación o rechazo de la idoneidad de cada patólogo designado para puestos de la Seguridad Social. El Dr. Anaya duda que la Seguridad Social acepte y el Dr. Toledo opina que debe hacerse publicidad suficiente de las plazas, pero que la Seguridad Social tiene derecho a asignar los nombramientos.

Desde la creación de la revista Patología en 1968 se reflejan en ésta, al menos parcialmente, las reuniones, asambleas y acuerdos de la Junta Directiva [4].

En el año 1959 la SEAP tiene como inscritos a 18 miembros. En el año 1960 se alcanzan 50 miembros y con las primeras inscripciones de 1961 se completan los 57 socios considerados fundadores de la SEAP [5], y a los que se expidió diploma acreditativo. Estos diplomas están fechados en 6 de noviembre de 1961 y firmados por el secretario Ángel Valle, el presidente Julián Sanz y el tesorero Julio Rodríguez Puchol. (figura 3).

**Figura 3.** Título de socio fundador del Dr. Juan Domingo Toledo y Ugarte de 6 de noviembre de 1961.



En un principio la Sociedad era netamente madrileña y con un peso principal de cátedras y universidades, ligada también a los escasos hospitales existentes en los primeros años 60. Llevó

décadas alcanzar la distribución geográfica actual y el predominio de socios vinculados a la asistencia hospitalaria.

La relación completa de socios fundadores está recogida en la página web del GT de Historia de la Patología de la SEAP:

<https://arhipa.org/f.html>

Los primeros miembros de las juntas directivas de la SEAP tienen un nexo común de una formación consolidada en el extranjero gracias a las becas de la Junta de Ampliación de Estudios (JAE). Esta institución, desde su creación en 1907 y hasta su desaparición por la guerra civil, aportó un inmenso beneficio a la sociedad española, pensionando estudiantes, investigadores y profesores de todos los ámbitos de la ciencia y las humanidades, y esta labor fue presidida por Cajal hasta su muerte y ejecutada por Castillejo, como secretario y otros miembros vinculados a la Institución Libre de Enseñanza. El prestigio de Cajal allanaba las dificultades para conseguir los fondos necesarios, y es otro de los grandes méritos que le debemos, quizá menos recordado que sus aportaciones en investigación.

Además, esa primera junta de la SEAP de 1959 es también una reunión de amigos con objetivos comunes. La iniciativa corresponde Julián Sanz como titular de la cátedra madrileña de anatomía patológica y como director del Instituto Cajal. Sánchez Lucas había competido contra él en las oposiciones de 1940, pero con cordialidad (en una época en que las «trincas» eran un espectáculo brillante y a veces sarcástico y cruel, que llenaba de espectadores las sesiones); y un año después con Sanz en el tribunal, obtenía Sánchez Lucas la cátedra de Barcelona. Ángel Valle era discípulo de Sanz Ibáñez, de Pérez Lista y de Morales Pleguezuelo. Morales acude a esa primera junta con sus dos discípulos M.<sup>a</sup> Teresa Hidalgo y Horacio Oliva. No está en ella Pérez Lista, aunque es elegido vocal, pero sí está Juan Domínguez, su colaborador en el Hospital Provincial.

Fernando de Castro, miembro de la Sociedad, era reconocido por todos como la mayor personalidad científica de la época y aunque no se implicó directamente en la organización ni gestión, (si asistió al segundo Congreso en Santiago presentando la ponencia oficial), su prestigio y apoyo se extendían a prestigiar la incipiente Sociedad.

## **JULIÁN SANZ IBÁÑEZ**

Julián Sanz Ibáñez, nació en Zaragoza en 1904 donde estudia medicina y es alumno interno con Pedro Ramón y Cajal. Acude a Alemania en 1929 al laboratorio de Albert Fischer, gracias a una ayuda de la Facultad de Medicina de Zaragoza, a trabajar en cultivo de tejidos. Había sido becario del Laboratorio de Fisiología Cerebral del Instituto Cajal, bajo la dirección de Gonzalo Rodríguez Lafora; y se incorporó a la Unidad de Cultivo de Tejido de Instituto Nacional de Higiene, apoyado por Tello. Al año siguiente solicita ayuda para volver y es pensionado por la JAE, trabajando en el Instituto de Neurología de la Universidad de Viena con el profesor Marburg y en la Unidad de Anatomía Patológica con el profesor Pollak [6]. Acorta su estancia ante la grave enfermedad de su padre y posterior fallecimiento. En 1934 se hace cargo en departamento de Histopatología, de la sección de cultivo de virus vacunal en el Instituto Nacional de Higiene y trabaja en la primera vacuna del tifus exantemático [7]. En 1940 obtiene la cátedra de Santiago de Compostela, tras haber opositado en 1935 a las de Cádiz y Sevilla. En 1941 por traslado obtiene la cátedra de Valencia, aunque no se incorpora al obtener licencia para proseguir en Alemania sus estudios sobre el tifus exantemático. En 1942 se le nombra agregado a la cátedra de Histología de Madrid, a la que se acumula la de Anatomía Patológica. En 1945 obtiene por oposición la cátedra de Anatomía Patológica de Madrid, a la que también optaba Julio G. Sánchez Lucas, la primera de España que aparece dotada de manera independiente de la Histología [8]. En 1947 es nombrado director del Instituto del Cáncer, cargo que ocuparía 17 años y en 1949 se le nombra director del Instituto Cajal cargo que ejerció 15 años hasta su fallecimiento. En 1959 ingresa en la Academia Nacional de Medicina.

Ortiz Picón en sus desenfadadas memorias relata la asistencia a un Congreso de anatomistas en Lyon en 1949 que compartió con Julián Sanz y con Fernando de Castro y que los tres prolongaron con una visita a París. Ortiz Picón:

«Durante esta breve estancia en París yo tuve con Sanz Ibáñez más estrecha relación que con Castro. Uno y otro eran tanto física como psicológicamente muy distintos. Sanz de mediana estatura, aragonés un tanto cauto o reservado y optimista, sin aparente nerviosismo; Castro era alto y más bien delgado, de rostro largo y algo cetrino, era un madrileño de compleja psicología y en ocasiones algo intemperante. Uno y otro no podían congeniar y creo que se profesaban cierta soterrada aversión. Sanz Ibáñez quizá envidiaba el prestigio científico de Castro; éste probablemente sentíase postergado injustamente ante los importantes cargos –y particularmente la dirección del Instituto Cajal– que Sanz había logrado en el nuevo Régimen.»

«Confieso que me sentía más cerca de Castro que de Sanz, sin embargo, mi trato con éste era más confiado y ambos nos tuteábamos, mientras que a Castro, siete u ocho años mayor, ambos lo tratábamos de usted... Como Castro tenía refinadas aficiones y nos llevaba a lujosas tiendas de antigüedades para ver libros antiguos y porcelanas; bromeando ante el anticuario yo le llamaba «Monsieur le marquis De Castro» con cierta complacencia por su parte y gran regocijo en Sanz, y éste en confianza conmigo tachaba a Castro de vanidoso. Por otra parte, luego de haber cenado los tres juntos me quedaba a solas con Castro y le comentaba que Sanz había tardado solamente un par de minutos en comerse un grueso «touredós» de solomillo, aquél me decía refiriéndose a Sanz: «en él predomina lo vegetativo: engulle como una serpiente boa; y, luego es vencido por el sueño» [9].»

Muy pocos años antes de la fundación de la SEAP, en los primeros 50, prácticamente no se hacían biopsias diagnósticas. Sanz Ibáñez comentó emocionado a sus alumnos en la Facultad (entre ellos Alberto Anaya), la realización allí de la primera biopsia de un cáncer laríngeo [10], más de 60 años después de errar Virchow el diagnóstico del cáncer laríngeo del Kaiser Federico III. Durante 21 años estuvo Sanz Ibáñez vinculado a los cursos de Biología de la Universidad Menéndez Pelayo en Santander y durante el celebrado en 1963, el 13 de agosto, falleció de una pancreatitis hemorrágica recidivante [11]. La iniciativa de la creación de la SEAP fue en realidad su empeño personal, más incluso una decisión del grupo de fundadores [H. Oliva. Comunicación personal. 13 de octubre de 2016].

## **JULIO GARCÍA SÁNCHEZ LUCAS**

Julio García Sánchez Lucas nace en León 23 de julio de 1901, residió en Madrid desde su infancia, donde realizó los estudios de medicina. Fue discípulo de Río Hortega. Al terminar la Licenciatura fue enviado por la Junta de Ampliación de Estudios a Alemania trabajando en los institutos dirigidos por Otto Lubarsch, Carl Benda y Rudolf Jaffé en Berlín, y mantuvo estrecho contacto con Ludwig Aschoff (Friburgo). En 1929 volvió a España y fue nombrado jefe de Anatomía Patológica de la Casa de Salud de Valdecilla en Santander. Allí realizó una destacada labor convirtiendo su servicio en un ejemplo de organización innovadora, con un elevado número de autopsias y destacadas exposiciones posteriores, así como un gran número de publicaciones y la implantación de una organización docente modélica, prelude de la futura Facultad de Medicina [12]. En 1942 es nombrado catedrático de la Universidad de Barcelona en unas oposiciones detalladamente relatadas por Ortiz Picón [13] y Castilla del Pino [14] en las que destacó como el mejor de los 6 opositores y en 1957 decano de dicha Facultad [15]. Tradujo los principales textos alemanes de anatomía patológica, que aún pueden encontrarse en los catálogos digitales de librerías: Tratado de Patología General y Anatomía Patológica de Hugo Ribbert y Herwig Hamperl (su libro básico en la enseñanza universitaria), Histología Patológica de Max Borst y Tratado de Anatomía Patológica de Ludwig Aschoff, entre otros.

Era brillante como docente y sus clases destacaban dentro de la Facultad. Tenía aspecto y fama de autoritario [16], que se manifestó en las protestas estudiantiles de 1965, tras unas elecciones falseadas en la universidad y donde una organización estudiantil clandestina (Unión de Estudiantes

Revolucionarios) pide su dimisión tras unas declaraciones amenazando cerrar la Facultad o traer al ejército [17]. Murió el 15 de octubre de 1969 cuando se preparaba para acudir a la Facultad el día de apertura de curso. En una época en la que la microscopía electrónica generaba enormes expectativas, se mostraba reacio hacia ella al igual que hacia la citología [18]. La firmeza de su carácter queda reflejada en una polémica (absolutamente bizantina vista en el siglo XXI) sobre la naturaleza del «mesénquima» que mantuvo en 1951 con Luis Urtubey, catedrático de anatomía patológica de Valencia, expulsado de la Universidad tras la guerra civil [19].

### **ÁNGEL VALLE JIMÉNEZ**

Ángel Valle Jiménez nacido el 26 de mayo de 1909 en Jaca (Huesca), estudió en la Facultad de Medicina de Zaragoza y comenzó su dedicación a la anatomía patológica a través del Ejército del Aire, obteniendo el nº2 en las oposiciones para el ingreso en la Academia de Sanidad del Ejército del Aire, donde fue nombrado teniente médico en 1941 y recibiendo en 1986 la gran cruz de San Hermenegildo por sus méritos militares [20] vinculados a las Escuadrillas Azules [21] y las heridas recibidas en campaña en la guerra civil. «Al ver caer a un soldado por el impacto de la metralla saltó de la trinchera en medio de la refriega, siendo él también ametrallado, mientras se cargaba al hombro al soldado herido, con el que regresó a la trinchera salvándole la vida» [22], y conservando para siempre en sus piernas las heridas del plomo de la metralla [23].

Fue discípulo de Pérez Lista y de Julián Sanz Ibáñez, con especial dedicación a las autopsias, siendo profesor prosector en 1953, y después profesor adjunto, agregado y alcanzando la cátedra de Salamanca en 1974. También participaba en el Instituto de Investigaciones Médicas creado por Carlos Jiménez Díaz [24], incorporándose en 1955 al departamento de Anatomía Patológica que dirigía Morales Pleguezuelo. Sus habilidades con las autopsias, como algunos pocos de sus contemporáneos, ya no podrán ser superadas. Prosector sin guantes, las hacía con tijeras y unas pinzas en cada mano, sin tocar los órganos y eran numerosos los que acudían a la sala de autopsias de San Carlos a aprender de él [25].

Publicó el primer caso en España de Enfermedad de Rosai-Dorfman [26] poco después de la descripción inicial.

Su vinculación con la SEAP le mantuvo en la Junta Directiva desde su fundación, como secretario desde 1959 a 1967 y de 1972 a 1975 y como redactor jefe de la revista Patología desde 1972 a 1975, con activa participación en los congresos de la SEAP desde el primero 1963 en Salamanca hasta el de Tenerife en 1977.

### **JULIO RODRÍGUEZ PUCHOL**

Julio Rodríguez Puchol, nació en Valladolid en 1912. Inicia los estudios de anatomía patológica en Madrid en 1929, siendo alumno interno de anatomía patológica en la cátedra de Francisco Tello. Al comienzo de la guerra civil es adscrito a la Sanidad Republicana y alcanza el grado de Teniente Médico en la XII-XIII Brigadas Internacionales [27]. Tenía estrecha amistad con el dramaturgo Antonio Buero Vallejo, y durante la guerra entra en contacto con escritores que apoyaban a la República, Ernest Hemingway y John Dos Passos. Tras la guerra fue duramente represaliado, internado dos años y medio en el campo de concentración de Albatera y en la cárcel de Gandía [J. Rodríguez Costa. Comunicación personal, 4 de enero de 2021]. Curiosamente tras la catástrofe de la guerra civil, la primera reunión de la SEAP sentó en la misma mesa a un oficial médico de la División Azul (A.V.) y a un oficial médico de la Brigadas Internacionales (J.R.P.). En su labor profesional Julio Rodríguez Puchol se dedicó preferentemente a la Dermatopatología. Se convirtió en un experto en lepra y acudía al Sanatorio de Fontilles organizando algunos de los cursos para médicos, que había iniciado en 1948 Félix Contreras Dueñas [28]. Uno de sus trabajos sobre la lepra en colaboración con su gran amigo Rodríguez Pérez resulta premiado [29]. También tenía especial interés por la citología, siendo pionero



en la citología pulmonar. Se incorporó al servicio de anatomía patológica que dirigía Pérez Lista en el Hospital Provincial, trasladado desde la unidad de Análisis Clínicos en la que inicialmente había ingresado. Horacio Oliva le describe con admiración [30]:

*«...de los hombres más encantadores y mejor preparados en anatomía patológica. Eran tiempos en los que cualquier patólogo especializado era mal visto por la patología académica que se caracterizaba, precisamente, por su escasos conocimiento de la patología, fuese la rama que fuese.»*

### **MANUEL MORALES PLEGUEZUELO**

Manuel Morales Pleguezuelo nacido en 1898 fue pensionado por la JAE en Alemania [31], aunque solicitó extender su formación en Francia y Austria. En Viena estuvo con Carl Sternberg, y desde entonces mantuvo siempre una dedicación especial a la patología linfóide. Había sido compañero de curso de Carlos Jiménez Díaz y se incorporó a su primer Instituto en 1941 ubicado en la calle Granada de Madrid [32], modesto en comparación con lo que sería después la Clínica de La Concepción. Morales siempre tuvo una forma independiente de trabajar, vivía en su mundo de estudio y trabajo y no le era infrecuente levantarse de madrugada e ir rellenando fichas con todo lo que estudiaba. Su despacho tenía un cartel en la puerta que decía: «Se ruega no molestar ni entrar sin necesidad» [A. Morales. Comunicación personal, 30 de diciembre de 2020]. El Instituto de Jiménez Díaz tenía desde sus inicios una importante vocación investigadora y el suministro de animales de experimentación se resolvió con el equivalente al «ranero de Cajal» contratando un gitano llamado Vargas como encargado del suministro de animales. La relación estrecha con Jiménez Díaz se manifestó en una anécdota que relata el sobrino y biógrafo de éste, Mariano Jiménez Casado [33]:

*«Habiendo quedado los dos un sábado por la tarde (día de trabajo en la Institución) a revisar al microscopio casos de cirrosis hepática, parte de la plantilla del hospital se ausentó pensando que el jefe quedaría entretenido por Morales con los casos. Llegó Don Carlos a las 4, pero Morales se retrasaba, tras un rato viendo él solo los casos, salió por los pasillos encontrando el Hospital medio vacío y empezó a preguntar dónde estaba todo el mundo. Llegó Morales hora y media tarde, en su pequeña moto, para él, hombre de gran envergadura próximo a los 2 metros, y le dijo con toda naturalidad: perdona Carlos, ya sé que llego tarde, pero es que ¡hacia un viento en contra!...»*

La correlación clínico patológica tenía allí todos los ingredientes para alcanzar la excelencia. Desde el gran número de autopsias realizadas, y el elevado número de publicaciones, surgió la primera generación de patólogos diagnósticos, probablemente junto a Arteta y Pérez Lista, evolucionada desde los discípulos de Cajal formados en primer término como investigadores y cuando aún faltaba una década para la fundación de la SEAP. Después ese departamento de la Clínica de La Concepción sería complementado por Ángel Valle, Ricardo Ceballos, Horacio Oliva y Vicente Navarro [34].

Manuel Morales Pleguezuelo falleció en 1967 el mismo año apenas 3 meses antes que Jiménez Díaz.

### **LUIS ZAMORANO SANABRA**

Luis Zamorano Sanabra nació en Melilla el 17 de agosto de 1913. Estudia Medicina en Madrid, inicialmente acogido en la Residencia de Estudiantes de la Junta de Ampliación de Estudios, y entra en contacto con los discípulos de Cajal, Tello en San Carlos, Rio Hortega en su Laboratorio de Histología Normal y Patológica y Fernando de Castro en el Instituto Cajal. En 1943 ocupa la jefatura de servicio de anatomía patológica del Hospital del Rey en Madrid y al año siguiente es ayudante en el Instituto Cajal que dirige Sanz Ibáñez. Entre 1951 y 1953 se traslada a Colombia y ejerce de catedrático y jefe de anatomía patológica en la Universidad del Valle (Cali). En 1960 consigue la cátedra de la Universidad de Salamanca, en la misma oposición que Ortiz Picón obtiene la de Granada. Ambos eran amigos y recientemente regresados de experiencias docentes en Colombia. Las oposiciones también relatadas

por Ortiz Picón [35], empezaron por el acuerdo de renuncia a las trincas propuesto por Zamorano. Y entre los miembros del tribunal ambos compartían a maestros y amigos: Sanz Ibáñez, Fernando de Castro, Bullón y Llombart. En Salamanca fue decano de la Facultad de Medicina, y contó en su cátedra como colaboradores a Hugo Galera, Alfredo Matilla, Ángel Sanz, Luis G. García Romo [36]. Se opuso a la reorganización universitaria en departamentos y a la creación en la Facultad de Farmacia de una escuela de citología [37], problema que también la junta directiva de la SEAP informó en contra ante el Ministerio. En 1972 ocupa la cátedra de Histología de Madrid y en 1974 es nombrado decano de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense, y en ese periodo incorpora los hospitales militares a la labor docente de la Facultad de Medicina, lo que le fue recompensado con una «Gran Cruz al Mérito Militar» [38]. Tuvo también estrecha vinculación con Gregorio Marañón dedicándose a la Endocrinología clínica y experimental, siendo vicedirector del Instituto Marañón en 1959 [39]. Falleció el 15 de agosto de 1999.

### JUAN MANUEL ORTIZ PICÓN

Juan Manuel Ortiz Picón escribió una autobiografía [40] que es una excelente fuente para conocer su actividad, pero también la de los miembros de la escuela de Cajal y los inicios de la anatomía patológica española tras la guerra civil. Escrita con estilo desenfadado, no oculta sus amoríos de juventud ni los de sus compañeros. Los estudios de licenciatura le inspiran escaso interés pero su vocación se despierta cuando entra en contacto con la histología y la anatomía patológica. Discípulo de Rio Hortega, su dominio del alemán, hizo que éste le pidiera acompañarlo en un ciclo de conferencias que dio en 1930, y poco después fue pensionado por la Junta de Ampliación de Estudios, trabajando en el Instituto de Anatomía de la Universidad de Múnich con el profesor F. Wasserman [41]. Su vinculación con Alemania se incrementa al casarse con una alemana y tiene ocasión de ver los inicios y las tensiones del crecimiento del nazismo. Tras la guerra civil española, queda adscrito a la cátedra de anatomía patológica de Madrid, inicialmente con Llombart Rodríguez y después con Sanz Ibáñez. Tras la jubilación de Tello, es encargado de la cátedra de Histología hasta la incorporación a la misma de Fernando de Castro. En 1953 se traslada a Colombia y ejerce de catedrático en la Universidad de Cauca (Popayán). A su vuelta tras formar parte del grupo fundador de la SEAP obtiene en 1960 la cátedra de la Universidad de Granada [42].

### MANUEL PÉREZ LISTA

Manuel Pérez Lista nació en Orense, en El Barco de Valdeorras en 1901. Concluye sus estudios de Medicina en 1926. Es becado por la JAE [43] trabajó entre 1931 y 1932 en el Instituto de Patología de la Universidad de Múnich con el Profesor Max Borst. Fue discípulo directo de Pio del Rio Hortega y entre los más asiduos a su laboratorio de Histología normal y Patológica. Isaac Costero condiscípulo suyo recuerda en sus memorias el ambiente del laboratorio [44]:

*«De ordinario, y por varias horas, nadie se movía de su asiento; una muchacha era la encargada de traer y llevar la cristalería y los reactivos, cuando hacían falta; casi siempre había silencio, cada quien atento a teñir o a estudiar su material. No era raro escuchar fragmentos de música clásica que, sobre todo López Enríquez y Pérez Lista silbaban muy bien; el fino oído de Don Pío corregía de cuando en cuando pequeñas inexactitudes. No era fácil sostener pláticas porque todos estábamos de espaldas al más próximo compañero y separados del de enfrente por una alta mampara de madera; y, sin verse las caras, es difícil conversar. Pero, de mesa a mesa aun sin mirarnos directamente, se intercambiaban algunas breves ideas.»*

Otro ilustre visitante del laboratorio de Rio Hortega, Wilder Penfield completa la descripción [45]:

*«El laboratorio estaba ubicado en una única habitación en forma de «L». Ante mi apareció una hilera de mesas colocadas una junto a otra y cada una enfrente de las ventanas que daban a la calle. Cada mesa estaba ocupada por un hombre con un microscopio delante y con pequeñas cubetas y botellas de cristal junto a él. No había laborantes, ni secretarías, ni puertas que comunicasen con otras habitaciones.»*

En el verano de 1929, Pérez Lista y Ortiz Picón los dos jóvenes compañeros en el laboratorio de Río Hortega planean un viaje a Alemania, sin duda con la intención de preparar sus futuras solicitudes a la JAE para completar allí sus estudios. El viaje tiene una escala previa en París, y esta ciudad rompe los planes, atrapando con sus encantos al primero, teniendo Ortiz Picón que continuar solo hacia Múnich [46].

Río Hortega ocupaba la plaza de histopatólogo en el Hospital Provincial de Madrid con escasa actividad de autopsias hasta la creación de una plaza de Jefe de Autopsias que ganó por oposición Manuel Pérez Lista. Allí continuó hasta su jubilación en 1971; convirtiendo en un oasis el Hospital Provincial, en el deprimente panorama de la anatomía patológica en la postguerra [47]. Es otro de los iniciadores de la anatomía patológica diagnóstica, y contribuyó a formar numerosos discípulos [48], curiosamente simultaneó otros puestos asistenciales e incluso actividad privada, sin optar a plazas universitarias como la mayor parte de sus compañeros de generación. Manuel Pérez Lista, junto con Morales Pleguezuelo y Sánchez Lucas eran los tres mejores patólogos de la generación de finales de los 50. [H. Oliva. Comunicación personal, 13 de octubre de 2016].

## LAS MUJERES EN LA SEAP

Entre los miembros fundadores de la SEAP se encuentran 4 mujeres M.<sup>a</sup> Teresa Hidalgo Martínez (17), M.<sup>a</sup> del Pilar Najera Morrondo (34), M.<sup>a</sup> Luisa Arambarri Zuricalday (35) y Adoración Morales Fernández (48).

De entre ellas, Adoración Morales es quien ha tenido una vinculación continua con la SEAP en toda su carrera. Se licenció en 1960, en una de las pocas promociones en las que Carlos Jiménez Díaz consiguió habilitar su institución, antes del veto de claustro de San Carlos, para la enseñanza teórica y práctica de la licenciatura de Medicina. Se dedicó desde sus inicios a la citología, formándose para ello en París y luego completó formación en citología pulmonar con la ayuda de Julio Rodríguez Puchol y citología digestiva en Barcelona, en el Hospital Sant Pau, antes de la llegada de Lorenzo Galindo a aquel hospital. Estuvo en sus inicios en la actual Fundación Jiménez Díaz, donde su padre Manuel Morales Pleguezuelo había creado allí el primer servicio de anatomía patológica. Se trasladó unos años al hospital Clínico de San Carlos y luego desarrolló la mayor parte de su actividad en Tenerife, en el Hospital Universitario y la Universidad de La Laguna [A. Morales, comunicación personal, 30 de diciembre de 2020].

M.<sup>a</sup> Teresa Hidalgo desarrolló su actividad también en la Clínica de la Concepción de Madrid, con una estrecha vinculación con Manuel Morales de la que era su asistente personal.

M.<sup>a</sup> Luisa Arambarri, nacida en Bilbao el 8 de marzo de 1930 está entre las pioneras de la medicina vizcaína. El Colegio de Médicos de Bilbao la reseña como su séptima colegiada. Realizó los estudios de licenciatura en Sevilla y se formó como especialista en anatomía patológica en Zúrich. A su vuelta abrió consulta de anatomía patológica y mantuvo relaciones con el Hospital de Basurto. En 1963 se trasladó de nuevo a Zúrich donde continuó su actividad como patóloga [49] hasta la jubilación, aunque no perdió contacto con su tierra natal conservando casa en Mundaca.

M.<sup>a</sup> Pilar Najera Morrondo, se inscribió en los inicios de la SEAP, pero posteriormente diversificó su actividad profesional con dedicación preferente a la Salud Pública, estando vinculada al Instituto de Salud Carlos III. Fue la única mujer en la primera promoción de Gerentes de Hospitales en 1968 y en sus últimos años trabajó en Sociedad Española Interdisciplinaria del SIDA (SEISIDA). Falleció el 22 de enero de 2018 [50].

## Agradecimientos

A Cristina Terrádez, secretaria de la SEAP y ya vínculo de continuidad de diversas generaciones de patólogos, por el trabajo de digitalizar las primeras actas de la SEAP y por continua colaboración y amabilidad en ésta y otras muchas ocasiones.

A los Dres. Julio Rodríguez Costa, Adoración Morales, Ana Puras, Alberto Anaya, Guzmán Ortuño y Antonio Llombart por sus relatos vividos de tiempos pasados en la SEAP.

A Juan Domingo Toledo y su esposa Karmele Atucha por digitalizar y compartir su magnífico archivo particular.

A Horacio Oliva y Beatriz Aguilera, por sus deliciosas conversaciones pasadas y por la cesión de documentos y archivos.

## Bibliografía

1. Juan Domingo Toledo Ugarte. La lista histórica de la Sociedad y sus problemas. Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España. SEAP 2013.
2. Acta nº1. Sociedad Española de Anatomía Patológica. 26-10-1959 Original en la Sede actual de la SEAP c/ Alcalá 209 Bajo C. Madrid 28028.
3. Hoja del Lunes de Madrid. 9 de mayo de 1960. Pág. 2.
4. Archivo histórico de números iniciales de la revista Patología 1968-1995. <https://arhipa.org/REP.html>
5. Patología, 1989, vol. 22 (1): 73.
6. Memoria de la Junta de Ampliación de Estudios. Cursos 1933 y 1935. Madrid. 1935, pág. 141.
7. Julián Sanz Ortega. Julián Sanz Ibáñez fundador y primer presidente de la SEAP y de la SEC. V Reunión de Grupo de Trabajo de Historia de la Patología. Madrid 8 de junio de 2018.
8. Rafael González Santander. La escuela Histológica Española. Vol. III. Oposiciones a cátedras de Histología y Anatomía Patológica. 1994. Ed. Universidad de Alcalá. Págs. 203-204.
9. J. M. Ortiz Picón. Una vida y su entorno.1993. CSIC. Cap. XXII. Págs. 222-223.
10. Alberto Anaya. La irrupción de la Patología en los hospitales. Una revolución inacabada. IV Reunión de GT de Historia de la Patología de la SEAP. Madrid 16 de febrero de 2018.
11. H. Oliva. Cajal y la Anatomía Patológica española. Una historia compartida. 1984. Pág. 173. SEAP. Re-Ed 2011.
12. López Vélez, S. (1974). Semblanza del Profesor D. Julio Sánchez Lucas. Anales de La Casa de Salud de Valdecilla. 1974.Págs. 267-272. [http://centrodeestudiosmontaneses.com/wp-content/uploads/DOC\\_CEM/HEMEROTECA/ANALES\\_CSV/AnalesCSV\\_1974.pdf](http://centrodeestudiosmontaneses.com/wp-content/uploads/DOC_CEM/HEMEROTECA/ANALES_CSV/AnalesCSV_1974.pdf)
13. J. M. Ortiz Picón. Una vida y su entorno.1993. CSIC. Cap. XIX.
14. Carlos Castilla del Pino. Pretérito Imperfecto. 2003. Ed.Tusquets. Págs. 316-317.

15. B. Rodríguez Arias y M. Carreras Roca. Perfil biográfico-histórico de una línea de catedráticos de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Barcelona. *Anales de Medicina y Cirugía*. 1979. VOL. LIX - N: 258. págs. 231-264.
16. Jacint Corbella i Corbella. El servei d'anatomia patològica de l'hospital Clínic de Barcelona els anys 50's del segle XX. *Records d'un alumne intern*. Gimbernat. 2006, 45, 145-156.
17. Els Estudiants de Medicina de la Universitat de Barcelona. Un estímul de progrés. Ferran Sabaté. 2013. Ed. Universitat de Barcelona.
18. H. Oliva. Cajal y la Anatomía Patológica española. Una historia compartida. 1984, Pág. 209. SEAP. Re-Ed 2011.
19. Ibidem págs. 335-353.
20. Boletín oficial del Ministerio del Aire, 1941, 24 de abril. Año II núm. 49 pág. 782. [https://bibliotecavirtual.defensa.gob.es/BVMDefensa/i18n/catalogo\\_imagenes/imagen.cmd?path=33545&posicion=1](https://bibliotecavirtual.defensa.gob.es/BVMDefensa/i18n/catalogo_imagenes/imagen.cmd?path=33545&posicion=1) (Consultado 2-1-2021).
21. <http://memoriablau.es/viewtopic.php?t=1340&start=150> (Consultado 2-1-2021).
22. Rafael González Santander. La escuela Histológica Española. Vol. V. Oposiciones a cátedras de Histología y Anatomía Patológica. 1994. Ed. Universidad de Alcalá. Págs. 179-183.
23. Horacio Oliva. Maestros y Dómines 1997. Ed. Fundación Jiménez Díaz. Cap. VI.3. pág. 146.
24. H. Oliva. Profesor Ángel Valle Jiménez. *Patología* 1986;19(4):263.
25. Horacio Oliva. Maestros y Dómines 1997. Ed. Fundación Jiménez Díaz. Cap. VI.7. pág. 162.
26. A. Valle et al. Histiocitosis sinusal con linfadenopatía masiva de Rosai y Dorfman. *Patología* 1973, vol. VI (4) págs. 263-272.
27. Francisco Fuster Ruiz. El Servicio de Sanidad de las Brigadas Internacionales. 2018. Ed. Universidad Castilla La Mancha. Pág. 149.
28. José Terencio de las Aguas. Historia de la lepra en España. *Piel*. Volumen 20, nº10, diciembre 2005, Págs. 485-497.
29. Purificación Rodríguez Ruiz. Antonio Pedro Rodríguez Pérez (1912-1964). Un murciano en la escuela neurohistológica española. 2015. Editium, pág. 211.
30. Horacio Oliva. Maestros y Dómines. 1997. Ed. Fundación Jiménez Díaz. Cap. VI.2. pág. 144.
31. Memoria de la Junta de Ampliación de Estudios. Cursos 1931 y 1932. Madrid. 1933, pág. 98. <http://cedros.residencia.csic.es/imagenes/Portal/ArchivoJAE/memorias/013.pdf> (Consultado 2-1-2021).
32. 32.- Mariano Jiménez Casado. Doctor Jiménez Díaz. Vida y obra. La persecución de un sueño 1993. Ed.Fund. Conchita Rábago. pág. 302.
33. Ibidem págs. 408-409.
34. Horacio Oliva. Maestros y Dómines 1997. Ed. Fundación Jiménez Díaz. Cap. VI.10. pág. 176.
35. J. M. Ortiz Picón Una vida y su entorno.1993 CSIC. Cap. XXX Págs. 300-302.
36. Universidad de Salamanca. Memoria docente del Año académico 1968-1969.
37. Sara González Gómez (tesis doctoral) 2013. La Universidad de Salamanca durante el franquismo (1956-1968) pág. 139.

38. Rafael González Santander. La escuela Histológica Española. Vol. V. Oposiciones a cátedras de Histología y Anatomía Patológica. 1994. Ed. Universidad de Alcalá. Págs. 120-126.
39. Julio Escalona Zapata. Historia de la Anatomía Patológica madrileña. 2003. Ed MacLine. Pág. 43.
40. J. M. Ortiz Picón Una vida y su entorno.1993. CSIC.
41. Memoria de la Junta de Ampliación de Estudios. Cursos 1933 y 1935. Madrid. 1935. Pág. 119.
42. Fernando Pérez Pena. Exilio y Depuración Política en la Facultad de Medicina de San Carlos. 2005. Ed.Vision Net. Págs. 239-240.
43. Memoria de la Junta de Ampliación de Estudios. Cursos 1931 y 1932. Madrid. 1933.Págs. 66-67. <http://cedros.residencia.csic.es/imagenes/Portal/ArchivoJAE/memorias/013.pdf> (Consultado 2-1-2021).
44. Isaac Costero. Crónica de una vocación científica. 1977. Editores asociados. Pág. 163.
45. Wilder Penfield. Homenaje a Cajal y Del Rio- Hortega de un alumno agradecido. [https://arhipa.org/documentos/HOA/Penfield\\_Wilder\\_La-Escuela-Española-de-Anatomía.pdf](https://arhipa.org/documentos/HOA/Penfield_Wilder_La-Escuela-Española-de-Anatomía.pdf)
46. J. M. Ortiz Picón. Una vida y su entorno.1993 CSIC. Cap. VIII Págs. 75-78.
47. H. Oliva. Cajal y la Anatomía Patológica española. Una historia compartida. 1984. Pág. 188. SEAP. Re-Ed 2011
48. Rafael González Santander. La escuela Histológica Española. Vol. IV. Expansión y repercusión Internacional. Cajal, Rio Hortega y sus discípulos. 1996. Ed. Universidad de Alcalá. Págs. 328-329.
49. Colegio de Médicos de Bizkaia. <https://www.cmb.eus/maria-luisa-aramburu-zuricalday-de-otaola> (Consultado 31-12-2020).
50. Alberto Nájera <https://twitter.com/najera2000>

# GRUPO DE TRABAJO DE PATOLOGÍA DIGITAL DE LA SEAP





# Aplicaciones de *deep learning*, un método de inteligencia artificial, en anatomía patológica

**Marcial García Rojo**

*UGC Anatomía Patológica. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.*

## INTRODUCCIÓN

La digitalización en anatomía patológica tiene ventajas como la mejora de los flujos de trabajo y la reducción en los tiempos de respuesta, facilitar el intercambio de datos e imágenes, una mejora en eficiencia, al poder disponer de forma integrada de múltiples fuentes de datos, modernizar esos flujos de trabajo con una orientación hacia la seguridad en la atención al paciente, impulsar la colaboración intra e interdepartamental, ayudar al responsable final de comunicar al paciente los hallazgos anatomopatológicos, conseguir ahorros en los costes asociados al rendimiento de los profesionales y una reducción de los errores médicos [36].

## PATOLOGÍA DIGITAL Y PATOLOGÍA COMPUTACIONAL

A principios de los años 2000, comenzó a utilizarse el término patología digital para referirse al uso de la imagen totalmente digitalizada de preparaciones histológicas o citológicas en anatomía patológica (en inglés, «*whole slide digital imaging*» o «*whole slide images*») [43], un término que reemplazaría a otros sinónimos como patología virtual o microscopía virtual [51]. Hoy día, entendemos la **patología digital** como el conjunto de herramientas informáticas y de comunicaciones que ayudan a los profesionales del departamento de anatomía patológica en su trabajo clínico tanto en la gestión de datos (gracias al sistema de información de anatomía patológica, que a su vez forma parte de la historia clínica electrónica) como en la gestión de imágenes (mediante el uso de escáneres de preparaciones y los sistemas de gestión de almacenamiento, como los PACS o «*Picture Archive and Communication Systems*»).

Los escáneres de preparaciones han evolucionado rápidamente en estos veinte años y hoy día, un solo escáner es capaz de digitalizar más de 500 preparaciones con muy alta resolución, es decir, unos 0,25 micras/píxel (equivalente a un objetivo 40x), en una jornada de trabajo.

Con altas resoluciones, una sola preparación digital contiene unos 40 GB de información, que afortunadamente, suele comprimirse (con JPEG, JPEG2000 o formatos propietarios de compresión) en ficheros que ocupan un espacio de entre 1 y 3 gigabytes (GB, unos 1.000 megabytes) cada preparación.

Un hospital que genere unas 500 preparaciones al día, con una media de 2 GB por cada preparación, genera al día 1 terabyte (TB, unos 1.000 GB) de datos comprimidos de imagen, lo que

suponiendo unos 250 días laborables al año, suponen 250 TB en imagen comprimida y unos 5 petabytes (PB, unos 1000 TB) de datos de imagen sin comprimir, al año.

Otra de la fuente de gran cantidad de datos en anatomía patológica son las técnicas de patología molecular, principalmente, la secuenciación de próxima generación (NGS), ya que una sola carrera de 8 estudios, con un panel de 50 a 150 genes, incluyendo el estudio de ADN y fusiones, puede requerir unos 40-50 GB de datos, es decir, unos 5 GB por cada estudio. Entre los formatos de ficheros más utilizados para almacenar los datos de secuenciación están el formato SAM (del inglés «*Sequence Alignment Map*») y su versión comprimida binaria llamada BAM, que utiliza un método de compresión llamado BGZF [45]. En la práctica, en cada muestra estudiada mediante secuenciación de ácidos nucleicos se obtiene un fichero comprimido BAM (uno para ADN y otro para fusiones), que suele ocupar entre 50 MB y 3 GB, según el tamaño del panel, el número de lecturas obtenidas y otros parámetros.

La información contenida en un fichero BAM es muy útil, pues contiene todas las lecturas obtenidas (alineamientos) y permite analizar de nuevo los resultados de la secuenciación con diversos filtros, tantas veces como sea necesario. Una vez analizados los datos, se obtiene una lista de variantes, generalmente en formato VCF (del inglés, «*variantcalls*») o ficheros en formato separado por tabulador (\*.tsv), que, una vez filtradas, suelen ser de mucho menor tamaño que los ficheros BAM.

Por cada 1 TB de datos genómicos de las muestras que estudiemos, necesitaremos 2,5 TB de datos brutos obtenidos por el secuenciador («*base-calls*») y por todos los filtros aplicados, para poder reproducir esos datos en futuros estudios [9].

Es decir, si suponemos que por cada de 1.000 muestras estudiadas mediante NGS, se pueden generar 1 TB de datos de resultados (suponiendo una media de 1 GB en la suma del tamaño de ficheros BAM comprimidos y VCF), pero harán falta unos 2,5 TB de almacenamiento adicional para todos los datos obtenidos del secuenciador, lo que, en la práctica, supone un total de 3,5 TB de almacenamiento por cada 1.000 estudios de NGS.

Si bien es cierto que al final de un estudio de NGS lo más importante desde el punto de vista clínico puede resumirse en un solo párrafo de texto que indique la o las variantes detectadas con valor patogénico, si es que se detecta alguna, es necesario guardar toda la información previa que ha permitido llegar a esa conclusión.

Un departamento que a) genere unos 50.000 informes de anatomía patológica al año (unos 50 GB de datos al año o más si se incluyen datos de trazabilidad), b) digitalice todas sus preparaciones (p. ej. 250 TB en preparaciones digitales) y c) realice 1.000 estudios de NGS al año (unos 3,5 TB de datos), necesitará gestionar un gran volumen de información de múltiples fuentes de datos, que a menudo no están integrados entre sí.

Con el fin de ofrecer una solución a este reto, hacia 2010, nace el término de **patología computacional**, que inicialmente se definió como el tratamiento completo, mediante métodos probabilísticos, de flujos de trabajo clínico en patología, para lo cual combina diseño experimental, reconocimiento de patrones, análisis de supervivencia, entre otros, para ofrecer un marco unificado que permita dar respuesta a problemas clínicos y científicos en anatomía patológica [20].

Posteriormente, se ha usado este término para hablar de la integración de múltiples fuentes de datos (incluidas las imágenes) o *big data* de anatomía patológica, con el fin de extraer patrones y analizar características o hallazgos [1,30].

Aunque hay otras modalidades de imagen, también utilizadas en patología, que se basan en técnicas computacionales («*computational imaging*»), como la microscopía confocal láser de barrido o la tomografía óptica de coherencia (OCT) [38], en esta revisión nos centraremos en la microscopía óptica convencional de campo claro.

Con la llegada de nuevas técnicas de inteligencia artificial, el término patología computacional a menudo se utiliza, de forma poco precisa, como sinónimo del análisis automatizado de imagen mediante inteligencia artificial en patología [25].

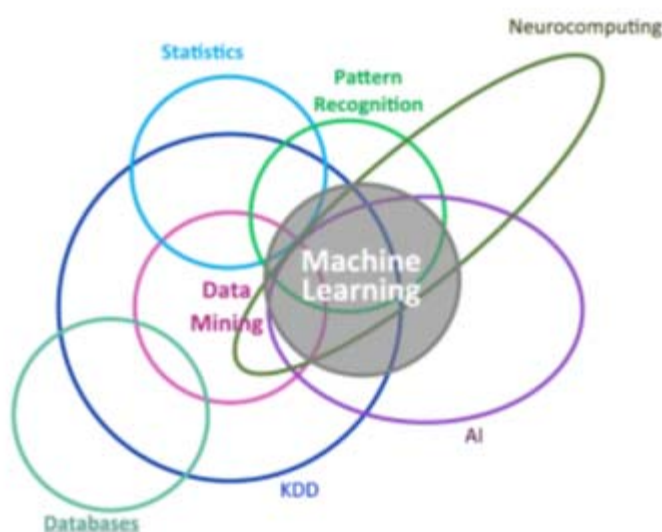
## INTELIGENCIA ARTIFICIAL, MACHINE LEARNING Y DEEP LEARNING

En ciencias de la computación, la inteligencia artificial (IA) tiene como objetivo crear sistemas informáticos que interpretan la información y se comportan imitando al ser humano, realizando predicciones y trabajando de una forma semiautónoma [35].

En el llamado «universo de inteligencia artificial» son muchas las metodologías con las que se superpone, como el descubrimiento del conocimiento y la minería de datos, el reconocimiento de patrones por métodos matemáticos o la neurocomputación. La mayor parte de las técnicas de aprendizaje automático («*machine learning*», que abreviaremos como ML) se basan en inteligencia artificial, pero no todas, pues también existen métodos estadísticos y de reconocimiento de patrones, basados en el análisis de regresión lineal, que no entran dentro del concepto de inteligencia artificial (figura 1) [33].

Algo similar sucede con los métodos de visión por computador (*computer vision*), diseñados para reconocer e interpretar datos visuales, que pueden estar basados o no en inteligencia artificial [35].

**Figura 1.** Relación de inteligencia artificial con otras ciencias. Tomado de Miller y Brown [33]. AI: *Artificial intelligence*. KDD: *knowledge discovery and data mining*.



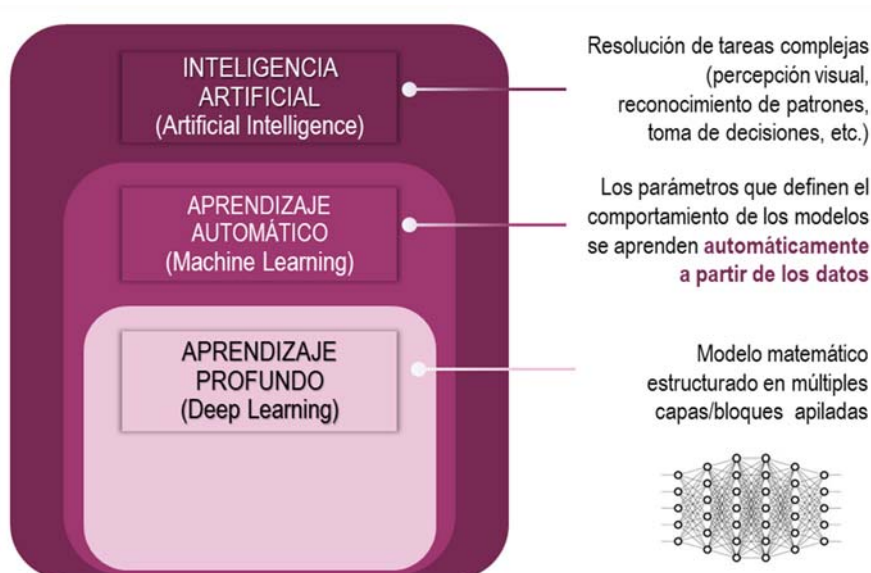
Algunos métodos de inteligencia artificial hasta ahora aplicados en anatomía patológica se basaban en sistemas expertos (a menudo, usando reglas previamente definidas). Los sistemas de análisis de imagen tradicionales aún usados hoy día para cuantificar biomarcadores de inmunohistoquímicos no son sistemas de IA pues se basan en instrucciones muy específicas y no son capaces de aprender nuevas formas de clasificar ni pueden adaptarse a información nueva. Muchos de estos sistemas empiezan a ser reemplazados por sistemas de análisis de imagen basados en métodos de aprendizaje automático [35].

Un método de aprendizaje automático (ML) que ha tenido especial éxito son las llamadas **redes neuronales artificiales**, que consisten en modelos matemáticos flexibles, capaces de identificar relaciones no lineales en grandes volúmenes de datos [33]. Además, estos modelos pueden aprender

de los errores, que son corregidos mediante entrenamiento, para mejorar la capacidad de predicción del modelo [33].

El desarrollo de estos algoritmos ha sido posible gracias a la mejora de los modelos matemáticos, a la mayor capacidad de computación de los ordenadores y al acceso a grandes volúmenes de datos incluso en red («*cloud networking*»). Por ello, fue posible desarrollar redes neuronales con múltiples capas, con diseños complejos y muy diversos. Algunas actúan de filtros (llamadas **redes neuronales «convolucionales» (CNN)**, que son las más usadas en análisis de imagen de patología), otras con capas recursivas (llamadas redes neuronales recurrentes, muy usadas en procesamiento de lenguaje natural), con autocodificadores («*autoencoders*») o con redes generativas adversarias (capaz de generar datos nuevos) [33,41]. Todos estos métodos que utilizan múltiples capas en redes neuronales, son conocidos como aprendizaje profundo o «*deep learning*» (**DL**, así llamado por usar redes muy profundas, con muchas capas), basados en diseños que se iniciaron en 1990 (figura 2) [33].

**Figura 2.** Esquema simplificado de la relación entre inteligencia artificial, aprendizaje automático (*machine learning*) y aprendizaje profundo (*deep learning*) [21].



Todos estos métodos tuvieron un éxito significativo a partir de 2006, cuando Hinton y col. diseñaron una nueva red neuronal muy profunda en la que, en el aprendizaje, no intervenía el ser humano (método no supervisado). Entonces, estas técnicas comenzaron a ser validadas en problemas reales (búsquedas en Internet, redes sociales, ingeniería financiera), y se dieron a conocer universalmente [33].

Comparado con el ser humano, estos algoritmos son capaces de abordar rápidamente problemas muy complejos (con más de 5.000 variables distintas) y están especialmente indicados cuando el volumen de datos es muy grande [33].

Aunque los algoritmos de *deep learning* requieren una gran capacidad de computación, ya existen sistemas comerciales basados en computación paralela de unidades de procesamiento gráfico (GPU), diseñados específicamente para optimizar la ejecución de estos algoritmos [32].

Gracias a la digitalización completa de preparaciones histológicas y citológicas en anatomía patológica, ha sido posible desarrollar e integrar las plataformas de inteligencia artificial dentro de la patología digital [36].

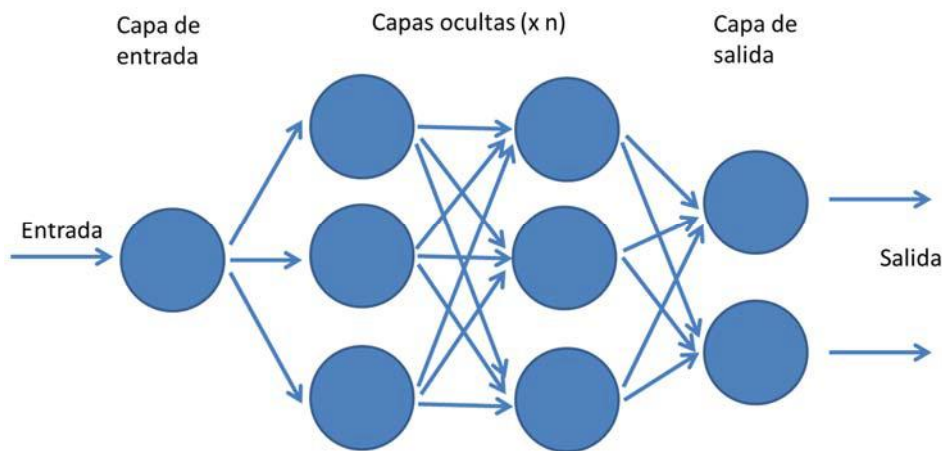
### CÓMO FUNCIONA UN SISTEMA DE *DEEP LEARNING*

Cuando se trata de buscar patrones, la imagen digital (fotografía o preparación digital completa) se descompone en múltiples fragmentos (o teselas), y al sistema se le enseña qué fragmentos son positivos (p. ej. para tumor) y cuáles son negativos. Es decir, un sistema *deep learning* (DL) recibe datos de entrada (una preparación digital) y una tarea (clasificar lesiones malignas y benignas), y el sistema aprende a realizar esa tarea de forma autónoma [35]. Posteriormente, es posible procesar los datos obtenidos para crear mapas de calor que ayuden, por ejemplo, a localizar dónde es mayor la probabilidad de tumor [33].

En general, los métodos de ML se clasifican en supervisados y no supervisados. En el ML supervisado, el sistema se entrena dibujando sobre la preparación digital las zonas de interés («anotaciones») de uno o varios tipos que el ser humano ha interpretado previamente, de forma manual o semiautomática. En el ML no supervisado se alimenta el sistema con datos de entrenamiento y el sistema aprende a distinguir determinados patrones, sin intervención del ser humano [35]. En la práctica, a menudo se usa una opción intermedia, los sistemas «débilmente supervisados» o «débilmente anotados», donde solo se clasifican grandes conjuntos de datos (por ejemplo, preparaciones que tienen un diagnóstico global, pero no tienen anotaciones detalladas sobre dónde está el tumor o el componente infiltrante del mismo) [41].

Las múltiples capas de redes neuronales artificiales interconectadas de un sistema de *deep learning* se clasifican en capa de entrada (que aplica distintos pesos a cada opción), las capas ocultas (o de procesamiento) y la capa de salida (o de clasificación) (figura 3).

**Figura 3.** Funcionamiento básico una red neuronal artificial (modificado de [35]).



Durante el entrenamiento se utiliza un conjunto de datos del que se conoce los resultados (p. ej. imágenes de carcinoma ductal infiltrante). En la capa de entrada, cada nodo recibe un dato de una muestra terminada (p. ej. tamaño de un núcleo) y cada nodo asigna un peso a esos valores. Posteriormente, la señal pasa a la capa oculta, donde cada nodo utiliza métodos estadísticos (p. ej. regresión lineal) para clasificar el dato obtenido según el peso asignado y si el dato transformado alcanza un valor determinado, es enviado a otros nodos. Y así sucesivamente, según el número de capas de la red neuronal. Al final, todos los datos que han ido pasando por las sucesivas capas se reciben en la capa de salida, que tiene la misión de clasificar el dato inicial (maligno o no maligno).

El sistema aprende a clasificar objetos al poder comparar la predicción que ha realizado (p. ej. maligno) con el resultado conocido (p. ej. el núcleo fue anotado como benigno). Durante el entrenamiento, los distintos nodos van modificando y ajustando los pesos y se vuelve a ejecutar una y otra vez la red neuronal, hasta que se obtiene el valor de predicción que haya definido el usuario (p. ej. que el 90% de los núcleos sean correctamente clasificados) [35].

Las redes neuronales convolucionales se han usado con gran éxito para clasificar imágenes (p. ej. en células neoplásicas o en estroma) incluso a partir de una preparación digital completa [35].

La gran ventaja de estos modelos de redes neuronales es que continúan mejorando su rendimiento cuantos más datos se les proporcionen [35].

A menudo, estos sistemas son considerados «cajas negras» pues, aunque vemos sus excelentes resultados, aún desconocemos de forma detallada cómo funcionan internamente [35].

### ¿CÓMO SE EVALÚAN LOS RESULTADOS DE UN SISTEMA DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL?

Para calcular la eficacia de un sistema de *deep learning* entrenado por expertos para clasificar (maligno/benigno o grado histológico), puesto que disponemos del número de casos que han sido correctamente clasificados, al comparar con la clasificación que hicieron los patólogos, podemos usar métodos estadísticos conocidos (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo o negativo, exactitud, etc.), conociendo los verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN).

La **sensibilidad** o tasa de verdaderos positivos (TVP) se calcula con la fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

La **especificidad** o tasa de verdaderos negativos (TVN) se calcula con la fórmula:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

La **precisión** sirve para medir la **calidad** del algoritmo de *machine learning* en tareas de clasificación. La fórmula es:

$$\text{Precisión} = \frac{VP}{VP + FP}$$

La **exhaustividad (recall)** mide la **cantidad** que el modelo de ML es capaz de predecir. La fórmula es:

$$\text{Exhaustividad ("recall")} = \frac{VP}{VP + FN}$$

La **exactitud (accuracy)** se utiliza para medir el **porcentaje** global de células o imágenes correctamente clasificadas. La fórmula es:

$$\text{Exactitud ("accuracy")} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

La **media armónica** («H-mean» o «H») se calcula mediante la fórmula:

$$\text{Media H} = 2 \cdot \frac{\text{Sensibilidad} \cdot \text{Especificidad}}{\text{Sensibilidad} + \text{Especificidad}}$$

También se utiliza el **valor-F o F1** («F-measure» o «F1-score»), que es una media armónica que combina la precisión y la exhaustividad («recall»). La fórmula es:

$$F1 = 2 \cdot \frac{\text{Precisión} \cdot \text{Exhaustividad}}{\text{Precisión} + \text{Exhaustividad}}$$

La tasa de falsos positivos (o error tipo I) se calcula con la fórmula:

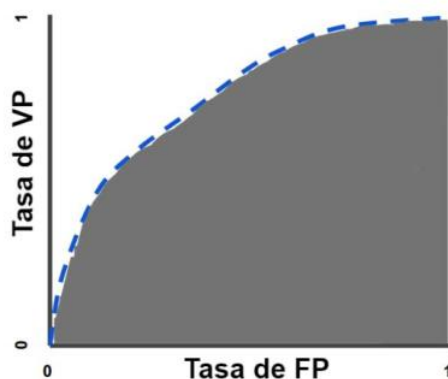
$$TFP = \frac{FP}{FP + VN}$$

La tasa de falsos negativos (o error tipo II) se calcula con la fórmula:

$$TFN = \frac{FN}{FN + VP}$$

Se utiliza el «área bajo la curva» (AUC, por sus siglas en inglés), por ejemplo, para clasificar biopsias en malignas o benignas. Se refiere a la curva «característica operativa del receptor» o curva ROC, que es la representación gráfica de la tasa de falsos positivos en el eje X o de abscisas y tasa de verdaderos positivos en el eje Y o de ordenadas (figura 4). AUC es una medida de probabilidad. Un algoritmo cuyas predicciones son correctas en un 100% tiene un AUC de 1.

**Figura 4.** Representación de área bajo la curva (AUC) [24].



En la predicción de supervivencia se utiliza el **índice c** de Harrell para valorar el error de la predicción al ordenar los tiempos de fallecimiento del paciente. Un  $c = 0,5$  indica azar y  $c = 1$  si el modelo predice perfectamente el orden en el tiempo de fallecimiento de pacientes [27].

Estas medidas de precisión se pueden medir en tres dimensiones (o niveles): a) imagen (fotografía o cada tesela o fragmento de una preparación digital que ha sido estudiado), b) preparación digital o c) paciente.

## ¿POR QUÉ ES NECESARIA LA INTELIGENCIA ARTIFICIAL EN ANATOMÍA PATOLÓGICA?

Muchos de los argumentos a favor del uso de IA en patología son los mismos que conocemos a favor del uso de la patología digital, tal y como hemos indicado arriba, como la mejora en los flujos de trabajo en los departamentos de anatomía patológica, automatizar tareas específicas (como la cuantificación de biomarcadores) o mejorar la eficiencia de los profesionales y ayudar en las situaciones en las que haya carencia de patólogos o citotécnicos [23].

La variabilidad interobservador en anatomía patológica es bien conocida, por ejemplo, en el diagnóstico de lesiones melanocíticas o en establecer el grado de Gleason en cáncer de próstata [35]. En la mejora del diagnóstico anatomopatológico (mejor reproducibilidad y consistencia, disminución de errores, cuantificación más precisa), es donde la IA parece que está ofreciendo en estos momentos resultados más llamativos, al poder aplicarla incluso en tinciones de hematoxilina-eosina (HE) [35].

Se estima que incorporar IA en un flujo de trabajo totalmente digital (sistema de información de anatomía patológica moderno e interoperable, digitalización completa de preparaciones, reconocimiento de voz y sistema completo de trazabilidad) puede reducir en un 40% el tiempo de respuesta en patología [35].

## PRINCIPALES RETOS DEL USO DE LA INTELIGENCIA ARTIFICIAL EN LAS IMÁGENES DE PATOLOGÍA

La aplicación de inteligencia artificial en anatomía patológica tiene dos objetivos fundamentales: impulsar la automatización en la especialidad y normalizar los procesos [36].

A diferencia de otros campos de la medicina, donde la inteligencia artificial ha demostrado ser especialmente útil, como cardiología y radiología, en patología, el reto es significativamente mayor [36], debido a:

- Un tamaño de imagen de gran tamaño (a menudo incluso de 100.000 x 100.000 píxeles).
- Imágenes en color con gran diversidad de técnicas (hematoxilina-eosina, histoquímica e inmunohistoquímica - IHQ).
- Ausencia de orientación anatómica.
- Necesidad del uso de diversos aumentos (cada aumento tiene información relevante y complementaria).
- En algunos casos, requiere recoger información de múltiples planos en el eje Z.

## APLICACIONES DE LA INTELIGENCIA ARTIFICIAL EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

Podemos agrupar las aplicaciones de la IA en patología en:

- a. Cribado rápido de estudios anatomopatológico. Es posible clasificar automáticamente las preparaciones digitales que contengan tumor o algún otro hallazgo de interés y priorizar el estudio de algunos casos, sobre todo en patologías muy prevalentes. Se calcula que esto permitiría evitar revisar hasta el 75% de las preparaciones sin disminuir la sensibilidad [10,35]. En la detección de metástasis ganglionares en cáncer de mama, se ha calculado un 58,2% de disminución de la carga del trabajo para el patólogo [2].
- b. Mejorar la calidad y seguridad del diagnóstico, comprobando que no hemos obviado ninguna zona importante de alguna preparación que modifique el diagnóstico anatomopatológico [35], ayudar a predecir el grado de un tumor o su clasificación histológica [2] y mejorar la concordancia entre patólogos [37].
- c. Servir de herramienta de segunda opinión y telepatología. En radiología, se ha reducido en un 88% la necesidad de una segunda opinión, gracias al uso de algoritmos de IA [35].



- d. Predicción y pronóstico. Al poder identificar nuevas características en una enfermedad, la IA puede relacionar esas características o las ya conocidas con el riesgo de recurrencia, el estado de mutaciones en genes o la supervivencia global del paciente, incluso únicamente con HE [2].
- e. Investigación y docencia [37]. La IA aplicada a las preparaciones digitales permiten mejorar aspectos donde ya sabemos que la patología digital tiene numerosas ventajas, como en docencia, control de calidad, certificación y acreditación profesional, e investigación [32,36].

## ANÁLISIS DE IMAGEN AUTOMATIZADO Y DEEP LEARNING

A diferencia de los primeros algoritmos de análisis de imagen utilizados en fotografías o en preparaciones digitales, basados en técnicas más convencionales (basadas en características conocidas del dominio o en características básicas), los métodos como *deep learning* no requieren que el programador indique todos los parámetros que deben ser tenidos en cuenta (intensidad de color, tamaño mínimo máximo de un núcleo, etc.), pues el sistema es capaz de aprender de los posibles errores cuando los entrenamos con nuevos datos corregidos. De hecho, todas estas técnicas computacionales tienen como objetivo ir más allá de los límites del ser humano, con el fin de identificar biomarcadores que podamos usar en la práctica clínica para diagnosticar mejor y más precozmente las enfermedades, ofrecer información pronóstica fiable y seleccionar la opción terapéutica más adecuada en cada momento [36].

Las principales ventajas del uso de IA en el análisis de imagen automatizado de preparaciones digitales son:

- Ejecutar más rápidamente el análisis en la preparación completa y no solo en un área seleccionada por el patólogo [36].
- Mejorar los resultados en la segmentación automática y cuantificación de núcleos (p. ej. en Ki67), permitiendo analizar sólo los núcleos de una región determinada (p. ej. solo en el componente infiltrante de una neoplasia) [36].
- En otros casos, es necesario que el sistema reconozca los núcleos o las células de interés solo en una región anatómica o histológica determinada (p. ej. en lámina propia en vejiga o en folículos linfoides) [36].
- Disponer de un mapa de la preparación donde ya a pequeño aumento se marquen las zonas más «calientes» o en las que son más frecuentes las células positivas para un determinado biomarcador [36].
- Es posible crear algoritmos que permitan detectar el mismo tipo de objetos (p. ej. núcleos o mitosis) en diversos órganos o enfermedades, sin necesidad de entrenar el algoritmo de nuevo para cada localización o problema [36].
- En cáncer de pulmón, piel y colorrectal, algunos algoritmos se han entrenado para distinguir tejido normal del neoplásico e incluso distinguir entre diversos tipos histológicos [36].
- Permite al patólogo enfocarse en las áreas de mayor interés [36].
- Disminuye la variabilidad inter- e intraobservador en tareas repetitivas, como la cuantificación de células (p. ej. linfocitos intratumorales) o de mitosis [35,36] o en áreas con límites poco preciso (p. ej. valoración de atipia o pleomorfismo) [37].
- Es posible superponer imágenes de inmunohistoquímica y de hematoxilina-eosina (HE) incluso aunque no sean secciones consecutivas de tejido [36], e incluso correlacionar imágenes de resonancia magnética, macroscópicas y microscópicas, por ejemplo, en una pieza de prostatectomía radical [32].
- Conocer mejor la heterogeneidad tumoral [35], al poder evaluar y cuantificar más áreas de la neoplasia.

## MÉTODOS DE APRENDIZAJE AUTOMÁTICO (*MACHINE LEARNING*) NO BASADOS EN APRENDIZAJE PROFUNDO (*DEEP LEARNING*)

En análisis de imagen automatizado, aún se usan diversos métodos de ML que no entran dentro de la definición de DL. Algunos ejemplos que encontramos en la literatura son los árboles de decisión, como bosque aleatorio o «*random forest*» (RF), muy útil cuando hay múltiples tipos de datos. En las máquinas de vectores de apoyo o «*support vector machine*» (SVM), en el que los datos de entrenamiento se comparan con un espacio de representación y tienen la ventaja que se entrenan muy rápidamente [41]. En la segmentación de núcleos de células tumorales en adenocarcinoma de pulmón, *random forest* ha obtenido mejores resultados que SVM [51]. SVM ha sido utilizado con éxito en la predicción de metástasis en cáncer de colon [54]. Recientemente, Rashidi y col. han realizado una revisión de los diversos métodos de aprendizaje automático utilizados en patología [39].

Otro método llamado aprendizaje de múltiples instancias o «*multiple instance learning*» (MIL) se utiliza a menudo para entrenar algoritmos débilmente supervisados [41].

## VALORACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA Y ANÁLISIS AUTOMATIZADO DE IMAGEN

La valoración automática de técnicas inmunohistoquímicas ha demostrado tener numerosas ventajas, frente a la cuantificación manual, que podemos resumir en [5]:

- Disminuir la variabilidad interobservador, con mejor reproducibilidad
- Valoración de un área más amplia de la lesión e incluso la preparación completa
- Ofrecer valores continuos, evitando la categorización previa durante la cuantificación
- Combinar la cuantificación de múltiples marcadores (multiplexación)
- Cuantificar la relación espacial entre células y otras estructuras histológicas, ofreciendo una visión global del microambiente tumoral [28].

Usando una combinación de métodos basados en reglas y aprendizaje automático (no basados en *deep learning*), se han diseñado soluciones para cuantificar automáticamente PD-L1 en células tumorales y CD8 en cáncer de pulmón no microcítico. En un estudio en 163 pacientes, utilizando el software Developer XD™ de Definiens, se observó que una mayor densidad de células CD8+ o mayor densidad de células PD-L1+ se relaciona con un aumento significativo de la supervivencia. Sin embargo, fue la cuantificación simultánea y automática de ambos marcadores la que demostró tener una mejor correlación con la respuesta al tratamiento y la supervivencia global en pacientes con terapia anti-PD-L1, incluso en pacientes con metástasis hepáticas, mejor incluso que la cuantificación aislada de PD-L1. Este estudio, también mostró que la cuantificación automática de PD-L1 proporciona mejor clasificación de los pacientes, en cuanto a supervivencia global que la cuantificación manual. En pacientes no tratados con anti PD-L1 solo la mayor densidad de células CD8+ y la cuantificación manual de PD-L1 en células tumorales  $\geq 25\%$  se asociaron con una mejor supervivencia global [5].

## EXPERIENCIAS DEL USO DE *DEEP LEARNING* EN SUBESPECIALIDADES

### Aparato digestivo

En cáncer colorrectal, algunos algoritmos de IA son capaces de distinguir automáticamente entre regiones neoplásicas y tejido no tumoral [36], e incluso es posible distinguir entre epitelio tumoral, fibroblastos y células inflamatorias [32].

También es posible predecir la supervivencia de cáncer de colon mediante redes neuronales convolucionales, que valoran el patrón de HE de la neoplasia [32].

Las áreas tumorales de tumores neuroendocrinos pancreáticos pueden ser delimitadas del estroma usando *deep learning* [36], lo que permite cuantificar mejor Ki67 solo en las áreas tumorales (97,8% sensibilidad, 88,8% especificidad) [2].

La IA (CNN) permite una cuantificación más fiable y reproducible de células inflamatorias en la enfermedad celiaca, permitiendo distinguir entre tejido normal, duodenitis inespecífica y enfermedad celiaca, con un AUC en preparación digital de 0,95 [35].

### **Patología cardiovascular**

En biopsias de endomiocardio, un algoritmo de CNN consiguió predecir insuficiencia cardiaca con un AUC de 0,97, incluso mejor que los patólogos (AUC 0,75) [2].

### **Dermatopatología**

En el diagnóstico histopatológico de 1.417 imágenes de piel, un sistema de *deep learning* descrito por Cruz-Roa y col. (2013), fue capaz de distinguir lesiones benignas de malignas (epitelioma basocelular) con más de un 90% de precisión [16].

Los subtipos histológicos de melanoma pueden ser mejor detectados por DL (CNN), con mejor sensibilidad y especificidad [2].

DL (CNN), aplicado a HE, puede predecir el pronóstico en el melanoma en estadios iniciales, con AUC de hasta 0,905 en la predicción de supervivencia específica de enfermedad [2].

También se ha observado mediante el uso de DL, que la cantidad de linfocitos es el factor pronóstico más importante en el melanoma [2].

### **Ginecopatología**

En cáncer de ovario, es posible clasificar automáticamente los diferentes subtipos histológicos con DL en preparaciones de HE con una precisión del 78,20% [2].

### **Patología mamaria**

En cáncer de mama, es posible señalar automáticamente áreas de carcinoma intraductal o de carcinoma infiltrante en hematoxilina-eosina y clasificar las preparaciones digitales en benignas o malignas, alcanzándose un AUC de 0,962 en preparación digital (WSI level) [2,36,41].

En el reto BACH, donde fueron evaluadas múltiples soluciones de DL para distinguir mama normal, benigna, carcinoma in situ y carcinoma infiltrante de mama (4 clases), se obtuvieron las siguientes conclusiones: a) los mejores resultados se obtienen usando *deep learning* y preparaciones digitales completas; b) Algunas soluciones DL consiguieron una exactitud de 87% (la de 4 patólogos oscilaba entre 73% y 96%) y todas mostraban una alta sensibilidad en la detección de cáncer infiltrante, pero fallaban algo más en las clases benigno e in situ [7].

Otro estudio basado en fotografías de biopsias intraoperatorias en cáncer de mama, obtuvo una exactitud del 94,96% para distinguir maligno de benigno [12].

Incluso, es posible distinguir lesiones benignas intraductales (hiperplasia ductal usual) de hiperplasia ductal, atípica o carcinoma ductal in situ con la misma especificidad (0,80) que los patólogos, pero mejor sensibilidad (0,89) y exactitud (0,85) [2,41].

Se ha utilizado *deep learning* para la graduación de neoplasias, la detección de formación de túbulos, el pleomorfismo nuclear y la cuantificación de mitosis [41]. En la detección de mitosis en cáncer de mama se ha conseguido un valor F de 0,782 [12].

Al cuantificar mitosis mediante una red neuronal, se ha observado que el número de mitosis tienen un escaso impacto pronóstico en el cáncer de mama triple negativo [35].

En la valoración automática del estroma en 646 biopsias de mama, una red neuronal convolucional consiguió una exactitud del 92% para distinguir estroma asociado a tumor de estroma no tumoral (AUC 0,962 en preparación), incluso en el carcinoma intraductal [2,18].

Las técnicas de *deep learning* obtienen resultados similares o mejores (AUC 0,994) que los del patólogo (AUC 0,810) en la detección de metástasis de cáncer de mama en ganglios linfáticos centinela, con un 100% de sensibilidad [2,50], como demostró el reto CAMELYON16, donde se obtuvo una exactitud del 93,8% en tesela (*patch level*) en 400 preparaciones digitales [17].

En inmunohistoquímica, se ha utilizado *deep learning* para la clasificación automática de HER2 (con 100% sensibilidad y 95,5% especificidad, respecto a FISH) o de receptores de estrógenos [41]. Además, es posible distinguir las células tumorales de las no tumorales que son positivas para Ki67 en preparaciones de cáncer de mama [36].

*Deep learning* también ayuda en la cuantificación del infiltrado de células del sistema inmune (linfocitos intratumorales, TIL) en hematoxilina-eosina [41].

Se han diseñado modelos pronósticos de cáncer de mama, integrado datos clínicos, de HE y moleculares, para detectar a las pacientes con una enfermedad más agresiva, en algunos de los cuales se confirma que el estroma juega un papel importante [13,31,41]. Como veremos más adelante, la combinación de imagen histológica y datos genómicos ofrece mejores resultados pronósticos que cada uno de los datos por separado [13].

La formación de túbulos, evaluada mediante DL, se asocia significativamente (AUC 0,76) con las categorías de riesgo de Oncotype DX en cáncer de mama ER+ [2].

En la evaluación de enfermedad residual tras tratamiento sistémico neoadyuvante en 62 pacientes de cáncer de mama, un sistema de DL (*InceptionNet*) obtuvo una exactitud de 93% para separar tumor de tejido no tumoral, mejor que un sistema basado en análisis de imagen tradicional (81%), con una concordancia alta con los patólogos (0,82), aunque los mejores resultados se obtuvieron en la evaluación manual por patólogos. Además, se creó un mapa de calor sobre la preparación digital, para facilitar la localización de células tumorales [3].

## Nefropatología

Utilizando una plataforma de software abierto (DeepLab v2) fue posible entrenar una CNN con solo 5 preparaciones digitales inicialmente anotadas y tras varias revisiones por patólogos, el sistema fue capaz de identificar y distinguir correctamente glomerulos normales y esclerosados, así como áreas de atrofia tubular en biopsias renales [25].

## Neuropatología

Se han utilizado redes neuronales profundas (CNN) para graduar automáticamente gliomas y distinguir entre glioma de bajo grado y glioblastoma con una exactitud del 96%, y de un 71% para clasificar los gliomas de bajo grado [2,32].

Los modelos de DL para predecir supervivencia también se han utilizado en gliomas, observándose resultados similares a los del estudio realizado por patólogos [2].

## Patología pulmonar

Utilizando los ficheros disponibles en TCGA, se ha desarrollado un algoritmo que clasifica automáticamente las preparaciones de tejido pulmonar en tejido normal, adenocarcinoma y carcinoma epidermoide, obteniendo un AUC de 0,97, similar al de los patólogos. Además, ese sistema entrenado con preparaciones digitales del TCGA pudo ser validado en biopsias intraoperatorias y en parafina del propio centro [2,36].

Es posible predecir el riesgo de recurrencia en cáncer no microcítico de pulmón en estadios iniciales a partir de HE, con una precisión entre el 75% y el 85%. Por otro lado, esta variable sirvió como un factor pronóstico independiente en un modelo multivariante [2].

Utilizando *deep learning* en preparaciones digitales de hematoxilina-eosina, es posible predecir las mutaciones en cáncer de pulmón no microcítico [14].

## Uropatología

El primer sistema DL aprobado por la Unión Europea con marcado CE-IVD fue para la detección de cáncer de próstata [35].

En la literatura, la eficacia en la detección de cáncer de próstata de los sistemas de *deep learning* es muy alta (usando matrices de tejidos o TMA, biopsias de próstata y prostatectomías), habiéndose obtenido valores AUC de entre 0,98 y 0,997 en la precisión (en preparación digital) para clasificar biopsias de próstata en benignas o malignas, incluso en sistemas «débilmente anotados» [2,35].

La creación de mapas de probabilidad de cáncer, superpuestos a la preparación de HE, también facilita el trabajo de localizar las áreas de interés en cáncer de próstata [2].

Un sistema DL entrenado por uropatólogos expertos para establecer el grado de Gleason en piezas de prostatectomía, ha demostrado obtener mejores resultados (exactitud de 0,70) que patólogos generales (exactitud de 0,61), destacando su mayor sensibilidad y especificidad en los casos limítrofes y mejores resultados para cuantificar las áreas correspondientes a grado 4, además de permitir una valoración más continua (p. ej. 3,3 o 3,7), lo que permite discriminar mejor grupos de pacientes con distinto pronóstico [2,35]. En otros sistemas DL aplicados a biopsias de próstata, se han obtenido similares en la graduación de Gleason que los patólogos, con índice Kappa de entre 0,62 y 0,71 [2]. En la distinción entre Gleason 3+4 y Gleason 4+3, una CNN obtuvo una exactitud del 75% [12].

Una aplicación clínica de estas soluciones de IA es el sistema de segunda lectura Galen™ (Ibex Medical Analytics, Tel Aviv, Israel), que implementado sobre una plataforma de patología digital, permite que una vez realizado un informe, comparar el resultado del mismo con los resultados del sistema de IA en biopsias de próstata y genera una alerta en caso de discrepancias, antes de firmar el informe. El sistema detecta la presencia y la extensión de un determinado grado de Gleason y es capaz de detectar la invasión perineural. La especificidad es de 97,3% y la sensibilidad de 98,5% [25].

En cáncer de vejiga, es posible identificar automáticamente tumores T1, al localizar núcleos de células tumorales en la lámina propia [36].

## Citología ginecológica

Los sistemas de cribado automático en citología descritos en el siglo pasado, como PapNet [29], estaban basados en redes neuronales más sencillas que los sistemas de *deep learning*, pero han sido la base de los sistemas comerciales hoy día disponibles, como Hologic ThinPrep® Imaging System (Imager) o BD FocalPoint™ Slide Profiler [8]. Ninguno de estos sistemas está diseñado para su uso con preparaciones digitales.

DeepPap es una red neuronal que ha permitido clasificar células de citología ginecológica correctamente en siete clases de células, incluyendo seis de células escamosas (normal superficial, normal intermedia, displasia leve, displasia moderada, displasia grave y carcinoma epidermoide in situ) y células normales columnares. Se obtuvieron los siguientes resultados: sensibilidad 98,2%, especificidad 98,3%, exactitud 98,3%, H 98,3%, valor-F 98,8%, y AUC 0,998. El rendimiento fue algo menor en la detección de células columnares y de displasia grave, pero siempre mejor que otros sistemas basados en morfología o texturas [53].

En citología líquida ginecológica, al comprar sistemas basados en DL con ThinPrep® Imager, se han obtenido mejor sensibilidad en la detección de ASCUS (66% frente a 62%), LSIL (88% frente a 80%), HSIL (88% frente a 82%) y la misma sensibilidad del 100% en las alteraciones glandulares, con una especificidad similar (87% frente a 85%). Además, se ha calculado que el uso de IA en preparaciones digitales en citología permite trabajar 1,5 veces más rápido que con ThinPrep® Imager (1,7 min frente a 2,5 min) [15].

### **Punción aspiración con aguja fina**

En punción aspiración con aguja fina (PAAF) de tiroides, se ha utilizado una CNN para clasificar 87 fotografías de 10 casos de carcinoma papilar de tiroides, obteniéndose una sensibilidad de un 90,48%, especificidad de 83,33% y exactitud diagnóstica de 85,05% [46].

También se han usado redes neuronales para distinguir adenoma folicular de cáncer de tiroides en extensiones de PAAF, aunque solo se aplicó en 9 casos, que fueron clasificados correctamente. La técnica de SVM (máquinas de vectores de apoyo) también ha conseguido resultados excelentes en PAAF de tiroides [46].

En PAAF de mama, una CNN obtuvo una exactitud del 89,7% para distinguir entre benigna y cáncer en 175 imágenes. En 298 imágenes de PAAF de pulmón se obtuvo una exactitud de 71,1% para clasificar adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y carcinoma de células pequeñas [12].

## **OTRAS APLICACIONES DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL**

### **Patología molecular e IA**

Además del análisis e imagen, se ha utilizado DL para resolver problemas específicos en genómica, como la predicción de rasgos moleculares o la predicción de efectos de una mutación. En la secuenciación masiva de ácidos nucleicos (NGS) y en otros estudios moleculares, es frecuente que los chips donde se producen las reacciones moleculares contengan más 50.000 posiciones que ofrecen datos genéticos, que pueden sufrir artefactos, que pueden ser reducidos con *deep learning*, que puede ayudar en todo el proceso, desde la adquisición de los datos hasta la preparación de resultados, pues limita la dispersión de datos o el sobreajuste y aprende progresivamente sobre cómo los datos obtenidos deben correlacionarse con una mejor clasificación o detección de enfermedades como el cáncer [12,33].

DeepVariant es una CNN utilizada para estudiar variantes genéticas en NGS [12].

### **Docencia e inteligencia artificial**

La existencia de grandes repositorios de imágenes y casos completos (con datos clínicos, morfológicos y moleculares), como el Atlas del Genoma del Cáncer TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) no solo permite el entrenamiento de nuevo algoritmos, sino que constituyen una herramienta de gran valor en enseñanza pregrado y postgrado [32].

Se han desarrollado algoritmos que permite localizar automáticamente las áreas del tejido infiltradas por una neoplasia, o cuantificar automáticamente las células positivas para marcadores inmunohistoquímicos, lo que permite usar estas herramientas para el entrenamiento interactivo de residentes o para educación médica continuada [36,37].

Es posible desarrollar herramientas docentes basadas en IA que ayudan a los residentes a comprender mejor en flujo de trabajo en patología, ofreciendo posibles diagnósticos diferenciales o ayudando a seleccionar las técnicas adicionales o especiales que deben ser aplicadas en cada caso [37].

### **El papel de la inteligencia artificial en el control de calidad**

Gracias a la IA, es posible automatizar la selección de casos que deben ser sometidos a revisión manual o a segunda opinión, algo que, además, puede realizarse de forma remota con preparaciones digitales. Por otra parte, es posible calcular la concordancia interobservador e intraobservador, comparándola con la obtenida por un algoritmo de IA entrenado para un problema específico. Estos algoritmos pueden ser usados como un mecanismo de seguridad o de alerta, para prevenir posibles errores humanos [36].

Por otro lado, es posible disponer de algoritmos (p.ej. *Deep Focus*) que detectan automáticamente las áreas desenfocadas de una preparación digital, evitando que lleguen a patólogo al generar un aviso que indica que, en ese caso, deben ser reescaneadas con otros parámetros [48].

Varios autores han desarrollado algoritmos que permiten normalizar el color en las técnicas convencionales e inmunohistoquímicas, evitando las variaciones debidas a cambios de reactivos, espesor variable del tejido o al uso de escáneres de diversos fabricantes o distintos modelos. De hecho, esta normalización de color es aconsejable realizarla previamente al entrenamiento de algoritmos de *deep learning* [19,26,36].

Se estima que incluir *deep learning* en el trabajo del patólogo reduciría en un 85% la probabilidad de error humano, además de mejorar el rendimiento [33].

### ***Deep learning* para teñir digitalmente preparaciones digitales**

Gracias a un tipo de red de DL (red neuronal adversaria o GAN) se ha conseguido generar imágenes microscópicas digitales equivalentes a las campo claro, sin añadir colorantes, en múltiples tejidos, simulando las tinciones de hematoxilina-eosina, tinción de Jones y tricrómico de Masson. Para ello, se ha usado una adaptación holográfica de microscopía cuantitativa de contraste fases, que consigue resolución final de 0,37  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  [40].

### **Búsqueda de imágenes por contenido**

Es posible realizar búsquedas de imágenes ofreciendo al buscador una imagen en vez de un texto, una técnica llamada búsqueda de imágenes por contenido (CBIR), tal y como trabaja Google Lens en un smartphone. Aunque aún están en desarrollo estas soluciones para anatomía patológica, serían de gran ayuda para resolver casos difíciles o raros [37].

## Procesamiento de lenguaje natural

El procesamiento de lenguaje natural es una técnica de IA que permite contextualizar las palabras y expresiones, como las usadas en informes médicos, con múltiples objetivos, como seleccionar bibliografía relevante, predecir la evolución de un paciente o calcular el riesgo de reingreso [33].

## INTEGRACIÓN DE MÚLTIPLES FUENTES DE DATOS. PREDICCIÓN DE MUTACIONES Y SUPERVIVENCIA

La IA permite detectar relaciones que hasta entonces permanecían ocultas. Al integrar datos clínicos (incluyendo imágenes radiológicas), morfológicos y genómicos, es posible encontrar patrones morfológicos en las preparaciones digitales, incluso en hematoxilina-eosina que se correlacionan con determinadas mutaciones o con determinados datos clínicos o macroscópicos, expresión inmunohistoquímica, etc., que hasta entonces eran desconocidos [36]. Por ello, cabe esperar un impulso aún mayor en el uso de la hematoxilina-eosina, gracias a la AI, al ser una técnica tan asequible y su alta coste-efectividad en el diagnóstico.

La correlación entre inmunohistoquímica (p. ej. distribución subcelular o la cuantificación objetiva de su expresión) y datos moleculares aumentará también nuestro conocimiento sobre vías moleculares o de expresión génica [36].

En 2016, se describió *Fusion GP* como una herramienta basada en métodos bayesianas (no en redes neuronales), que integraba múltiples fuentes de datos (HE, expresión inmunohistoquímica de receptores estrogénicos-RE y datos moleculares como mutaciones de genes en un nucleótido o variantes en número de copias de genes) para predecir la supervivencia y la respuesta a la quimioterapia en cáncer de mama, utilizando METABRIC como fuente de datos. Este sistema permitió descubrir que los datos moleculares solo eran relevantes para la supervivencia en los tumores RE+, mientras que en los tumores RE- el infiltrado de células inmunes jugaba un papel importante para predecir la respuesta a la quimioterapia [47].

Combinando imágenes de inmunohistoquímica de Ki67 y CD8 en 469 muestras (TMA) de cáncer de estómago, se ha conseguido estratificar correctamente la supervivencia de los pacientes, mediante CNN [12].

Se han realizado algunos estudios de predicción de supervivencia en cáncer de mama y cáncer de colon mediante IA aplicada a preparaciones digitales de HE, comprobándose que la IA es más fiable que el ser humano para clasificar los tumores en bajo riesgo o algo riesgo según la supervivencia del paciente a los 5 años [35].

En cáncer de próstata, el índice c para predicción de supervivencia con modelos DL en HE fue de 0,697. En gliomas, se ha conseguido un índice c de hasta 0,754 [12].

Al detectar cambios o patrones, incluso los que el patólogo no puede percibir, se ha confirmado que la IA aplicada a imágenes de HE puede predecir algunas mutaciones en neoplasias. De esta forma, se ha utilizado IA para predecir algunas mutaciones en cáncer de pulmón no microcítico (EGFR, KRAS, TP53, FAT1, SETBP1 y STK11) con AUC de 0,733 a 0,856 en preparación digital («*slide-level*») de HE [14]; la mutación SPOP en cáncer de próstata (AUC 0,74 a 0,86); y BRAF en melanoma [2,35].

En cáncer de colon y cáncer gástrico, es posible predecir la inestabilidad de microsatélites (MSI) mediante *deep learning*, con un AUC de 0,89 (intervalo de confianza 0,88-0,92) y la red neuronal que mejor ha funcionado en esta tarea ha sido ShuffleNet [26].

En gliomas, al integrar histología y datos genómicos en un único modelo de predicción de supervivencia mediante DL, se ha conseguido mejor exactitud (0,801) que usando las variables indicadas por la OMS (0,774) [2].



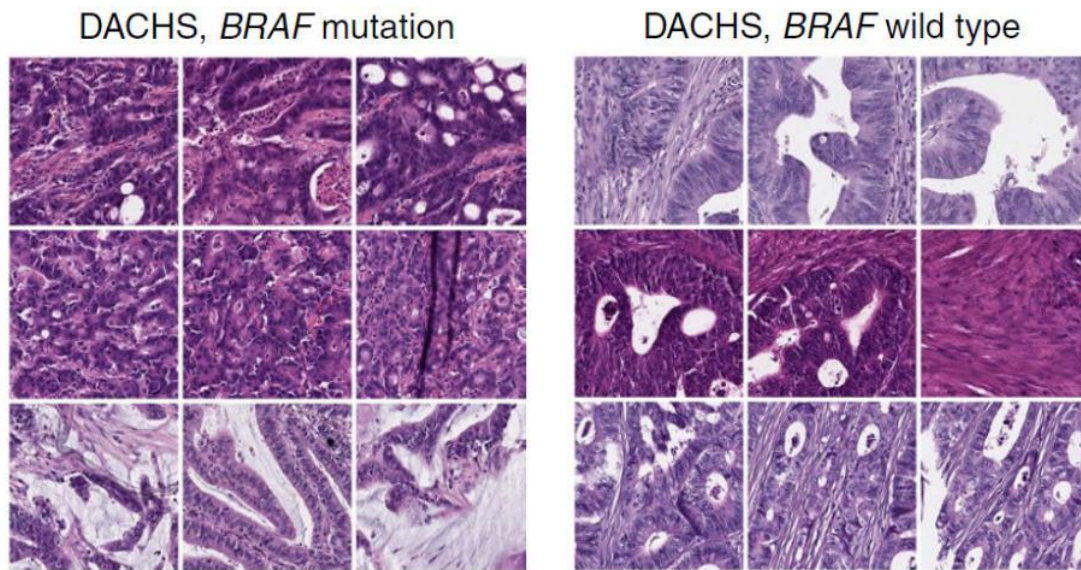
Usando CNN en preparaciones de HE, Saltz y col. han desarrollado mapas de linfocitos intratumorales (TIL) en 13 tipos de cáncer y los han correlacionado con los datos moleculares y con la supervivencia, lo que permite clasificar las diferentes neoplasias en subtipos, que se correlacionan con la supervivencia de forma similar, incluso entre diferentes localizaciones [44].

Un enfoque interesante es el uso de algoritmos «pan-cáncer» o «agnósticos del órgano» que son capaces de predecir las alteraciones moleculares o genotipos en tumores de cualquier localización a partir de la histología. El estudio de Kather y col. incluye los siguientes apartados relevantes [26]:

- En el caso de adenocarcinomas, se comparó su eficacia en la detección de mutaciones en TP53 (pulmón, mama, colon, estómago, próstata), BRAF (en colon y recto), KRAS (páncreas), MTOR (estómago), FBXW7 (pulmón y estómago), PIK3CA (mama y estómago), MAP2K4 (mama), CTNNB1 (hígado) y FOXA1 (próstata). El sistema funcionó especialmente bien en cáncer gástrico (AUC 0,66-0,78) y cáncer colorrectal (0,65-0,76) [26].
- En carcinoma renal, en los tipos papilar y de células claras, se predijeron mutaciones en múltiples genes, incluyendo KRAS y PBRM, pero ninguna en el carcinoma cromóforo [26].
- Este algoritmo no fue capaz de predecir mutaciones en melanoma primario, pero sí en melanoma metastásico (FBXW7 y PIK3CA) [26].
- En carcinoma epidermoide de pulmón, apenas se detectaron mutaciones. En el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, se predijo la mutación en CASP8, mientras que en el carcinoma de cérvix uterino (incluye carcinoma escamoso y adenocarcinoma), predijo las mutaciones en TCERG1, STK11 y AMER1 [26].
- Las firmas génicas o subtipos moleculares de células neoplásicas e inflamatorias también pueden ser predichas mediante histología e IA, obteniéndose los mejores resultados en adenocarcinomas de pulmón, colorrectal, mama y estómago. En pulmón, se predijo las firmas de proliferación (AUC 0,77), infiltración por macrófagos (0,66) y por linfocitos CD8 (0,65). En mama, los mejores resultados se obtuvieron en predicción de tipo basal (AUC 0,85), proliferación (0,81), luminal A (0,75), HER2 (AUC 0,75). En general, los tipos moleculares de TCGA se pudieron predecir en pulmón, colorrectal y mama, con un AUC que oscilaba entre 0,74 y 0,78 [26].
- La predicción de la expresión inmunohistoquímica en cáncer de mama también fue posible, con excelentes resultados en la expresión de receptores estrogénicos (AUC 0,82) y de progesterona (AUC 0,74), pero más discretos en HER2 (0,59-0,64) [26].
- Se obtuvieron resultados similares, pero no idénticos, al usar un método de aprendizaje profundo débilmente supervisado en vez de anotaciones manuales de las regiones tumorales. Las mutaciones en MAP2K4, MSH6, FLT3, PIK3R1 y ERBB2 se predijeron mejor con el método débilmente supervisado [26].
- El sistema es exportable a otros datos distintos a los de TCGA y ha sido validado en la cohorte DACHS, ayudando también a predecir el Fenotipo metilador de islas CpG en el cáncer colorrectal [26].

Al poder disponer de mapas de predicción que permiten detectar cuáles son las áreas teñidas con HE que más probabilidad tienen de asociarse con una mutación determinada, es posible seleccionar mejor las muestras y las áreas en las que deben realizarse estudios inmunohistoquímicos o moleculares. Sin embargo, al comparar las áreas seleccionadas que predicen la misma mutación, hay una gran variabilidad y el ser humano no siempre es capaz de encontrar un patrón claramente visible. En la figura 5, parece apreciarse que la mutación de BRAF es más probable en áreas de diferenciación mucinosa y pobremente diferenciadas [26].

**Figura 5.** Áreas que obtuvieron mejor puntuación en la predicción de presencia (izquierda) o ausencia (derecha) de mutación BRAF en cáncer de colon, en la cohorte de pacientes DACHS. Tomado de [26].



La importancia de estos estudios de inferencia es su posible impacto en la reducción en el número de estudios inmunohistoquímicos y moleculares necesarios, así como la mejora de las clasificaciones histológicas y moleculares en neoplasias, al integrar y combinar mejor ambos datos [35].

## REPOSITORIOS DE DATOS E IMÁGENES UTILIZADOS EN EL ENTRENAMIENTO DE SISTEMAS DE IA

### The Cancer Genome Atlas (TCGA)

Permite disponer de cohortes de pacientes con más de **30.000 preparaciones digitales** (en formato SVS) y datos moleculares. Incluye 3.629 imágenes de sistema nervioso central, 3.281 preparaciones de riñón, 3.222 de bronquio y pulmón, o 3.111 preparaciones digitales de cáncer de mama, entre otros datos.

Está disponible en: <https://portal.gdc.cancer.gov/repository>

### Genotype-TissueExpression (GTEx)

Proyecto sobre tejidos humanos normales. Incluye **25.713 preparaciones digitales** (SVS), enlazadas con 11 transcriptomas de 53 tejidos normales de 714 personas.

Disponible en: <https://gtexportal.org/home/histologyPage>

### Human Protein Atlas

Proyecto iniciado en 2003 sobre tejido normal y patológico. Incluye 3 partes: Tissue Atlas, Cell Atlas, y Pathology Atlas. Contiene más de 25.000 anticuerpos diferentes, **10 millones de imágenes de inmunohistoquímica**, 82.000 imágenes de inmunofluorescencia. El atlas de patológica incluye 5 millones de imágenes, con datos de expresión de ARNm.

Disponible en: <https://www.proteinatlas.org/>

### **DACHS ('Darmkrebs: Chancen der Verhütung durch Screening'/ Cáncer de colon: oportunidades para prevención mediante cribado)**

Colección de cáncer de colon con más de **10.000 pacientes** alemanes incluidos desde 2003.

Se han incluido preparaciones digitales. Algunos trabajos han utilizado esta cohorte para correlacionar los hallazgos en HE con el estado de inestabilidad microsatélite o MSI (n=379), de mutación BRAF o el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP).

Información disponible en: <http://dachs.dkfz.org/>

### **The Stanford tissue microarray database (TMAD)**

Colección de **4.153 preparaciones** de 413 TMA, con un total de 73.332 pocillos.

Incluye múltiples neoplasias, como sarcomas, carcinoma de mama o de vejiga, linfomas, GIST, adenoma pleomorfo, etc.

Disponible en: <https://tma.im/>

### **CAMELYON17 challenge**

Detección de metástasis de cáncer de mama en cáncer de mama. Es una evolución de CAMELYON 16 [17].

Contiene unas **1.399 preparaciones digitales** con algunas anotaciones. No contiene datos moleculares.

Está disponible en varias direcciones web:

- <https://camelyon17.grand-challenge.org/>
- GigaDB: <http://gigadb.org/>
- <https://drive.google.com/drive/folders/0BzsdK4jWx9BaXVHSXRJTnpLZU0>
- Baidu Pan: <https://pan.baidu.com/s/1mlzSewlmtEiscIptTHGSyw#list/path=%2F>

### **METABRIC**

Cáncer de mama. Acceso restringido, requiere solicitud previa.

Incluye 3 conjuntos de datos, con **564 preparaciones digitales**, y en 543 muestras, expresión génica con Illumina HT 12 y genotipado con Affymetrix SNP 6.0.

Información disponible en: <https://ega-archive.org/studies/EGAS00000000098>

### **HER2 Scoring**

Incluye **100 preparaciones digitales** de cáncer de mama teñidas con HER2.

Disponible en: <https://warwick.ac.uk/fac/sci/dcs/research/tia/her2contest/>

### **BreakHis**

Colección de **7.909 fotografías digitales** (2.480 benignas y 5.429 malignas) de múltiples tipos de lesiones y neoplasias de mama (desde adenosis o tumor filodes hasta distintos tipos de carcinoma).

Disponible en: <https://web.inf.ufpr.br/vri/databases/breast-cancer-histopathological-database-breakhis/>

### **BACH (BreAst Cancer Histology)**

Cáncer de mama. Incluye: A) Conjunto de **400 fotografías** microscópicas de mama (normal, benigno, carcinoma in situ y carcinoma infiltrante) a una resolución de 0,42  $\mu\text{m}/\text{píxel}$ . B) Conjunto de 30 preparaciones digitales con 10 anotaciones de diversas áreas de interés [7].

Disponible en: <https://iciar2018-challenge.grand-challenge.org/>

### **HerlevDataset**

Colección de **917 imágenes** (fotografías) de citología de cérvix uterino de Papanicolaou convencional, con una resolución de 0,201  $\mu\text{m}/\text{píxel}$ , recogidas por el Hospital Universitario de Herlev (Dinamarca).

Disponible en: <http://mde-lab.aegean.gr/downloads>

### **TMA Thyroid**

Colección de 14 imágenes TIFF de TMA teñidos con HE y otras 14 teñidas de inmunohistoquímica BRAF V600E, de un total de 154 pacientes, con 616 pocillos.

Información disponible en: <https://grand-challenge.org/challenges/>

### **Lymphoma**

Conjunto de 375 imágenes TIFF de HE images de 30 casos de linfoma.

Disponible en: <https://ome.grc.nia.nih.gov/iicbu2008/lymphoma/index.html>

### **PRODUCTOS COMERCIALES DE IA QUE HAN RECIBIDO EL MARCADO CE-IVD**

La siguiente tabla incluye una relación de productos comerciales de inteligencia artificial (sobre todo, basados en *deep learning*) en anatomía patológica, indicando aquellos que han obtenido la aprobación de la Unión Europea (UE) para diagnóstico in vitro (CE-IVD) de acuerdo con la Directiva 98/79/EC que ya ha sido reemplazada por la regulación EU 2017/746 [22]:

Empresa	Producto	Objetivo	CE-IVD	Sitio web
aetherAI	aetherAI	Control de calidad, cribado, cuantificación, expresión IHQ.	No	<a href="https://www.homepage.aetherai.com/our-service">https://www.homepage.aetherai.com/our-service</a>
Aiforia	AI-assisted diagnostics (RUO)	Enfermedades hepáticas y cáncer (incluyendo próstata)	No	<a href="https://www.aiforia.com/industries-clinical">https://www.aiforia.com/industries-clinical</a>
Bionovation Biotech	800 MP FullyAutomatic microscope	Escaneado, anotación y cuantificación de preparaciones digitales	No	<a href="http://www.bionovationimc.com/cp/html/?19.html">http://www.bionovationimc.com/cp/html/?19.html</a>
ContextVision	INIFY® Prostate Screening	Delimita y cuantifica áreas de carcinoma de próstata	Sí	<a href="https://www.inify.com/">https://www.inify.com/</a>
Datexim	Cyto-Processor	Cribado citológico en cáncer de cérvix	Sí	<a href="https://datexim.ai/cytoprocessor/">https://datexim.ai/cytoprocessor/</a>
DeepBio Inc.	DeepDx-ProstateConnect.	Detectar, cuantificar y graduar áreas con cáncer de próstata en preparaciones digitales	Sí	<a href="https://www.deepbio.co.kr/www/">https://www.deepbio.co.kr/www/</a>
Deep Lens	VIPER	Inclusión de pacientes en ensayos clínicos	No	<a href="https://www.deeplens.ai/viper">https://www.deeplens.ai/viper</a>
DeePathology	Studio™	Algoritmos personalizados	No	<a href="https://deepathology.ai/our-offering/deepathology-studio/">https://deepathology.ai/our-offering/deepathology-studio/</a>
Hologic	Genius™ Digital Diagnostics	Cribado citológico en cáncer de cérvix	Sí	<a href="https://www.nsmedicaldevices.com/news/hologic-genius/">https://www.nsmedicaldevices.com/news/hologic-genius/</a>
Ibex Medical Analytics	Galen™ Prostate	Identificar áreas sospechosas de cáncer de próstata	Sí	<a href="https://ibex-ai.com/solutions/the-galen-platform/">https://ibex-ai.com/solutions/the-galen-platform/</a>
Indica Labs	HALO AI	Módulos flexibles de segmentación y clasificación	No	<a href="https://indicalab.com/halo-ai/">https://indicalab.com/halo-ai/</a>
Medmain	PidPort	Clasificación histológica en tumores de estómago, colon y pulmón	No	<a href="https://pidport.medmain.com/">https://pidport.medmain.com/</a>
Mindpeak	BreastIHC	Cuantificación IHQ en cáncer de mama	No	<a href="https://www.mindpeak.ai/breastihc/">https://www.mindpeak.ai/breastihc/</a>
Nucleai	Nucleai	Cáncer gastrointestinal, mama y próstata	No	<a href="https://www.nucleaimd.com/">https://www.nucleaimd.com/</a>

Empresa	Producto	Objetivo	CE-IVD	Sitio web
Paige	Paige Prostate	Detectar, cuantificar y graduar áreas con cáncer de próstata en preparaciones digitales. DL débilmente supervisado	Sí	<a href="https://paige.ai/hospitals-and-labs/">https://paige.ai/hospitals-and-labs/</a>
PathAI	PathAI	Esteatohepatitis y hepatitis viral. Predecir mutaciones en HE en cáncer de mama.	No	<a href="https://www.pathai.com/news/">https://www.pathai.com/news/</a>
Proscia	DermAI	Clasificación de lesiones en dermatopatología	No	<a href="https://proscia.com/ai/">https://proscia.com/ai/</a>
Qritive	Pantheon AI	Módulos para cáncer de colon, mama, próstata, metástasis ganglionar y cuantificación IHQ	No	<a href="https://www.qritive.com/products">https://www.qritive.com/products</a>
Roche	uPath PD-L1 (SP263) image analysis	Cuantificación de PD-L1 en cáncer de pulmón	Sí	<a href="https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/upath-pd-l1-sp263-image-analysis.html">https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/upath-pd-l1-sp263-image-analysis.html</a>
Techcyte	Techcyte	Plataforma de software. Citología	No	<a href="https://techcyte.com/es/soluciones-digitales-de-patologia-celular/">https://techcyte.com/es/soluciones-digitales-de-patologia-celular/</a>
Tribvn	CaloPix	Múltiples módulos de análisis de imagen	Sí	<a href="https://www.tribvn-hc.com/en/digital-imaging-solutions-applications/image-analysis/">https://www.tribvn-hc.com/en/digital-imaging-solutions-applications/image-analysis/</a>
Visiopharm	Metastasis Detection	Detectar metástasis ganglionar	Sí	<a href="https://visiopharm.com/app-center/app/metastasis-detection-ai/">https://visiopharm.com/app-center/app/metastasis-detection-ai/</a>
West Medica	Vision Cyto Pap	Cribado citológico en cáncer de cérvix	Sí	<a href="https://wm-vision.com/en/product/pap">https://wm-vision.com/en/product/pap</a>

La web AnalogIntelligence incluye una revisión disponible de las empresas «startups» dedicadas en IA en patología [6].

### **CÓMO IMPULSAR EL DESARROLLO DE IA EN PATOLOGÍA**

Aunque los resultados disponibles en el uso de IA en anatomía patológica son muy convincentes en algunas tareas o áreas, aún existen algunas limitaciones y barreras que debemos conocer, para buscar soluciones.

### **Inconvenientes que clásicamente se han asociado a la IA**

- Es necesario disponer de un sistema completo de patología digital [35].
- Una barrera tecnológica más que debemos superar [33].
- Escasa legislación o normas nacionales e internacionales, incluyendo una consideración bioética especial (p. ej. en el uso de grandes volúmenes de datos) [33].
- Eliminar puestos de trabajo o sustituir puestos especializados por otros más generalistas [33].
- Menor desafío intelectual y menores oportunidades de tener experiencia en casos complicados o que requieran un pensamiento crítico [33].
- Las nuevas generaciones que adoptarán esta tecnología convertirán la especialidad en una práctica del uso de herramientas de IA [33].
- Es necesario un gran volumen de imágenes anotadas para que un algoritmo funcione correctamente y en patología hay un volumen pequeño de imágenes bien anotadas [10,36].
- Si en casos desafiantes no hay acuerdo entre patólogos, ¿cómo es posible entrenar redes neuronales adecuadamente? [41]
- ¿Cómo conseguir miles de imágenes para entrenar estos algoritmos con autorización de los pacientes?
- *Deep learning* es una caja negra en la que no es posible conocer cómo se ha obtenido un resultado [2,32].
- Se requiere gran capacidad de computación para entrenar los algoritmos de *deep learning* [41].

Todos estos potenciales riesgos del uso de IA pueden verse superados si consideramos las pruebas que demuestran que la colaboración entre el hombre y la máquina mejora el rendimiento de ambos [33,36].

Para evitar la necesidad de anotar manualmente preparaciones digitales, los sistemas no asistidos de IA pueden aprender de los hallazgos en las imágenes con grandes volúmenes de datos o es posible desarrollar algoritmos especialmente diseñados para facilitar la anotación automática de preparaciones digitales [36].

Hay dos grandes tendencias para mejorar el entrenamiento de los sistemas de IA. La primera, es depurar al máximo los datos que alimentan al sistema consiguiendo anotaciones perfectas, preparaciones perfectas y controlando todo el proceso desde el principio (fijación, tinción, montaje...) hasta el fin (escaneado, selección de expertos, anotación manual...). La segunda es entrenar el modelo con una enorme cantidad de datos que incluya toda la diversidad de datos reales y artefactos posibles, para que el sistema aprenda a distinguirlos [2].

La combinación de métodos de análisis de imagen basados en el conocimiento de los expertos y *deep learning* permite comprender mejor cómo funciona el sistema de IA e incluso permite obtener mejores resultados que usando solo *deep learning* [32].

En general, muchos de esos temores tienen su origen en un desconocimiento de la tecnología por parte de quien debe tomar las principales decisiones [33].

Por ello, es esencial que la legislación europea y española se adapte a la transformación digital que necesita la sociedad, marcando claramente los principios bioéticos que deben regir todo el desarrollo y utilización de la IA en investigación y en la práctica clínica.

Además, las agencias reguladoras como las europeas sobre dispositivos médicos deben permitir valorar de forma adecuada los nuevos dispositivos y soluciones basadas en IA, un camino que ya ha empezado a recorrer la *Food and Drug Administration* (FDA), en EE. UU. [35].

La idea de herramientas de IA que sustituyan a patólogos no es realista. Los casos difíciles, sobre todo en patología poco frecuente, pueden ser resueltos por patólogos gracias a su experiencia de

muchos años, algo que difícilmente podrá lograr la IA [35]. En resumen, el ser humano siempre será esencial para incorporar de forma inteligente la IA a la práctica clínica y será responsabilidad del patólogo seleccionar la herramienta de IA más adecuada para un problema clínico determinado [36].

## **TÉCNICAS QUE AYUDA EN EL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL**

### **Imágenes sintéticas o artificiales**

Algunos algoritmos de redes neuronales están diseñados para crear nuevas imágenes a partir de un conjunto de imágenes nuevas del mismo tipo. El sistema aprende la tinción empleada (hematoxilina o inmunohistoquímica son las más usadas), de la distribución de los elementos y otras características, de forma que esas imágenes nuevas o artificiales son reconocidas como imágenes naturales, incluso por patólogos expertos [36].

Esta solución permite incrementar significativamente el número de casos disponibles, sobre todo en patología poco frecuente, y mejorar a su vez el entrenamiento de nuevos algoritmos.

### **Aprendizaje por transferencia del aprendizaje**

Es frecuente reutilizar algoritmos que, inicialmente fueron utilizados (o «pre-entrenados») para otros propósitos (p. ej. para localizar coches en fotografías) y adaptarlos para otros problemas (p. ej. detectar si hay áreas tumorales o de estroma en una región). A menudo, se utiliza ImageNet, que es una base de datos que contiene millones de imágenes muy diversas, de todo tipo de objetos. Este método se llama aprendizaje por transferencia («*transfer learning*») [21,41].

### **Aumento de datos transformando las imágenes disponibles**

Partiendo de imágenes ya etiquetadas, es posible aplicar a esas imágenes ciertos cambios que no alteran su naturaleza (cambios de color, desenfoque, escalado, rotaciones, volteos, recortes, u otras deformaciones), consiguiendo multiplicar de forma significativa el número de imágenes disponibles [21,41].

### **Métodos que requieran muy poco esfuerzo para anotar imágenes**

Con el fin de poder validar los algoritmos de IA en una gran cantidad de imágenes, en las que sería imposible que los patólogos las anotaran manualmente (aprendizaje supervisado), se ha propuesto como solución clasificar automáticamente las imágenes según los datos disponibles en el sistema de información de anatomía patológica (SIAP) con métodos «débilmente supervisados» [41]. De esta forma, cada preparación tiene asociada una etiqueta de diagnóstico (anotación a nivel de paciente). Este método se ha utilizado en 24.859 preparaciones de biopsias de cilindros de próstata, 9.962 de biopsias de piel y 9.894 de metástasis ganglionar de cáncer de mama, sin corregir los posibles artefactos de las preparaciones, consiguiendo un AUC mayor de 0,98 en la detección global de cáncer, e incluyendo preparaciones de múltiples centros [10].

### **Validación clínica**

La validación de un sistema de IA para su uso clínico requiere evaluar, de forma concienzuda, su exactitud, reproducibilidad y rendimiento en diversas circunstancias (p. ej. con preparaciones histológicas o citológicas de diversos centros), así como un estudio de riesgo-beneficio y un análisis de costes, así como definir cuál es el valor mínimo de eficiencia o rendimiento que vamos a aceptar [2,35].



Es fundamental realizar una validación interna en cada departamento, de las soluciones de IA, ya que los algoritmos de IA solo están entrenados con imágenes o datos de determinados centros. La guía del Colegio Americano de Patólogos (CAP) sobre la validación de algoritmos de IA solo incluye referencias a las recomendaciones previas sobre algoritmos de análisis de imagen. Aunque se puede utilizar un sistema no aprobado por la FDA en el contexto clínico, son los responsables médicos del departamento los que evalúan la viabilidad del sistema y si se usan, en los informes en los que aplique, debe aparecer una exención de responsabilidad que indique que el organismo regulador correspondiente (FDA, UE) no ha aprobado el sistema para uso clínico, aunque este no es un requisito previo para su utilización clínica. Sin embargo, el CAP recuerda que estos algoritmos solo están entrenados para problemas concretos (p.ej. detección de lesiones epiteliales escamosas de cérvix) y si se usan sin discriminación, podemos dejar de detectar otras alteraciones, como infecciones por virus herpes simple [11].

Una base de datos en internet recoge todos los productos de IA/ML aprobados por la FDA. A principios de 2021 no incluía ninguna aplicación de anatomía patológica, pero incluía más de 35 soluciones para radiología [25,49].

La Regulación de la Unión Europea para dispositivos médicos in vitro no recoge instrucciones o recomendaciones específicas para inteligencia artificial o aprendizaje profundo [22,34].

Aún no disponemos de estudios a gran escala randomizados y prospectivos sobre la fiabilidad y la seguridad de los sistemas de IA, con un seguimiento clínico a largo plazo [2,37].

## RECOMENDACIONES PARA EL ALMACENAMIENTO DE DATOS

### Imagen

El sistema de almacenamiento de preparaciones digitales debe estar basado en soluciones abiertas y en normas internacionales, que le permita interoperar con uno o varios sistemas de inteligencia artificial. De esta forma, para entrenar los algoritmos de IA, no hará falta copiar o mover cientos o miles de preparaciones digitales de un repositorio a otro, lo que facilitará el cumplimiento de la Regulación General Europea sobre Protección de datos (GDPR) [35].

Además de las recomendaciones ya indicadas en el Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España 2015 para el almacenamiento en patología digital [23], otras consideraciones de interés para el desarrollo de nuevos algoritmos de IA son:

- Fomentar el uso de normas internacionales de formato de preparaciones digitales, como *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM) [42].
- Utilizar un método de compresión de las imágenes (JPEG, JPEG2000, u otros) o de ahorro de espacio de almacenamiento (eliminación de áreas sin tejido, transformar en imágenes de mejor resolución) que evita la pérdida excesiva de información, sobre todo en las imágenes que se guardarán permanentemente, para que puedan ser utilizadas en futuros desarrollos.
- No asumir que todas las imágenes con patología benigna o muy frecuente (lipoma, apendicitis aguda, hernia inguinal...) pueden ser eliminadas del archivo permanente.
- No guardar únicamente una preparación digital representativa de cada caso.
- Utilizar tecnología de almacenamiento a largo plazo con copias de seguridad, cuyos costes sean asumibles, aunque su rendimiento sea inferior, según las recomendaciones de cada sistema de salud, que pueden ir desde el almacenamiento en la nube o instalación en servidores centrales, con una red de comunicaciones bien dimensionada para dar servicios a todos los usuarios (anatomía patológica y otras especialidades médicas), sobre todo si se van a utilizar redes privadas virtuales (VPN) para usuarios externos [42].

### Datos moleculares (NGS)

- Guardar los datos brutos que se obtienen del secuenciador de cada carrera de forma indefinida [9].
- Almacenar localmente, para cada muestra, todos los demás datos durante al menos 2 años, incluyendo [9]:
  - Informes de control de calidad
  - Archivo de resultados (sin anotar ni filtrar)
  - Informe personalizado
  - Archivo de registro («log») que contiene suficiente información para permitir una réplica exacta de los resultados, de forma que pueda ser reproducido a partir de los datos brutos del instrumento (es decir, detallando todos los comandos y versiones de programas utilizadas en el estudio o «pipeline»)
- Planificar la conservación digital de todos los datos almacenados, ya sea su propio centro, con la ayuda del departamento de informática o con la de terceros [9].

### APLICACIONES FUTURAS DE LA IA

La mayor potencia de cálculo y almacenamiento de la próxima generación de ordenadores permitirá una revolución en la digitalización de imágenes, permitiendo una digitalización de preparaciones con muy alta resolución (equivalente a objetivos 100x), con múltiples capas en el eje Z y con un espectro de luz mucho más amplio, al permitir el uso de imágenes multiespectrales e hiperespectrales [32].

Esto permitirá extender el uso de la tinción digital de las preparaciones, a la vez que veremos nuevos métodos de microscopía para examinar el tejido ex vivo dentro del mismo bloque de parafina, sin necesidad de microtomía, o integrando el análisis de imagen dentro de los sistemas de microtomía automatizada. Estos pasos optimizarán los resultados obtenidos, al seleccionar qué bloques de parafina deben ser seleccionados para microtomía y automatizar y perfeccionar procesos tan manuales hoy día.

Las herramientas de IA ayudarán en la normalización de características histológicas (p.ej. Gleason en cáncer de próstata o grado en cáncer de mama) que hasta ahora manejamos como si fueran compartimentos estancos, pero que biológicamente deben considerar como algo continuo [37].

El desarrollo de la IA debe ser multidisciplinar y orientado a resultados clínicos, teniendo en cuenta las necesidades de patólogos, cirujanos, oncólogos y demás especialistas implicados en cada proceso [37].

Aún estamos en la primera de las 3 fases en las que se cree que evolucionará la IA en anatomía patológica [4]:

- Fase 1. La Inteligencia artificial es una herramienta más del patólogo, con el fin de realizar de las tareas más penosas y repetitivas y mejorar la eficiencia de los patólogos, ayudando en los conceptos de «patología de precisión» y medicina personalizada. No requiere grandes cambios legislativos, pues la responsabilidad final es del patólogo.
- Fase 2. En un futuro «próximo», los sistemas de IA realizarán tareas hoy día asignadas a los patólogos y tomarán sus propias decisiones, pudiendo elaborar autónomamente un informe anatomopatológico sin intervención de un patólogo. Aún será necesaria una validación, supervisión y control de calidad por el ser humano (*human in the loop*). La legislación actual no está preparada para este escenario.
- Fase 3. Aunque aún es una posibilidad muy remota, los avances en IA y robótica teóricamente harían innecesaria la participación de un patólogo (*human out of the loop*), ya que los sistemas podrían funcionar de forma totalmente autónoma. El futuro donde máquinas ejercen la profesión de medicina es tan lejano hoy día, que es demasiado pronto para pensar en

posibles implicaciones éticas o legales, pues aún desconocemos en qué tecnología se basarán esos sistemas autónomos o «patólogos IA».

## CONCLUSIONES

Hoy día, las aplicaciones de IA pueden ser utilizadas para problemas muy específicos, como la detección automática de algunos tipos de tumores o lesiones epiteliales escamosas en cérvix uterino, pero su uso aún no está generalizado por los costes de la transformación digital y la escasez de imágenes digitales, ya que el entrenamiento de los sistemas de IA requiere cientos o miles de preparaciones digitales para cada algoritmo.

El futuro del uso de IA en anatomía patológica es muy prometedor, por los excelentes resultados que ya están ofreciendo los sistemas basados en *deep learning* en tareas que pueden automatizarse, como la detección de áreas tumorales o con otras lesiones, la cuantificación celular o de estructuras como glomérulos, y la predicción de expresión inmunohistoquímica o de alteraciones moleculares. Aunque es previsible que las aplicaciones de la IA vayan expandiéndose en los próximos años, todo ello solo será posible si los departamentos de anatomía patológica adoptan la digitalización completa de sus flujos de trabajo en patología quirúrgica y citopatología y se crean plataformas internacionales con grandes repositorios de imágenes y datos que permitan desarrollar y entrenar nuevos algoritmos. Además, la labor del patólogo es y seguirá siendo fundamental para conseguir crear grandes repositorios de imágenes digitales bien clasificadas y diagnosticadas, que permitirán entrenar y mejorar esos futuros sistemas inteligentes. De esta forma, el patólogo podrá centrarse en labores más complejas, como el diagnóstico de casos especialmente difíciles o la correlación entre datos clínicos morfológicos y moleculares.

## Bibliografía

1. Abels E, Pantanowitz L, Aeffner F, Zarella MD, van der Laak J, Bui MM, Vemuri VN, Parwani AV, Gibbs J, Agosto-Arroyo E, Beck AH, Kozlowski C. Computational pathology definitions, best practices, and recommendations for regulatory guidance: a white paper from the Digital Pathology Association. *J Pathol.* 2019;249(3):286-294.
2. Acs B, Rantalainen M, Hartman J. Artificial intelligence as the next step towards precision pathology. *J Intern Med.* 2020 Jul;288(1):62-81.
3. Akbar S, Peikari M, Salama S, Panah AY, Nofech-Mozes S, Martel AL. Automated and manual quantification of tumour cellularity in digital slides for tumour burden assessment. *Sci. Rep.* 2019;9:14099.
4. Allen TC. Regulating Artificial Intelligence for a Successful Pathology Future. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143(10):1175-1179.
5. Althammer S, Tan TH, Spitzmüller A, Rognoni L, Wiestler T, Herz T, Widmaier M, Rebelatto MC, Kaplon H, Damotte D, Alifano M, Hammond SA, Dieu-Nosjean MC, Ranade K, Schmidt G, Higgs BW, Steele KE. Automated image analysis of NSCLC biopsies to predict response to anti-PD-L1 therapy. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):121.
6. Analog Intelligence. AI startups in pathology: A meta-review. November 10, 2020. Disponible en: <https://analogintelligence.com/artificial-intelligence-ai-startups-pathology-venture-meta-review-analysis/>
7. Aresta G, Araújo T, Kwok S, Chennamsetty SS, Safwan M, Alex V, Marami B, Prastawa M, Chan M, Donovan M, et al. Bach: Grand challenge on breast cancer histology images. *Med. Image Anal.* 2019;56:122–139.

8. Bengtsson E, Malm P. Screening for cervical cancer using automated analysis of PAP-smears. *Comput Math Methods Med.* 2014;2014:842037.
9. Blighe K, Crooks L, Grafham D. Next generation sequencing and the National Health Service: what data should we retain after variant reporting? 2016.02.01. Disponible en: <https://github.com/kevinblighe/BiostarsMisc>
10. Campanella G, Hanna MG, Geneslaw L, et al. Clinical-grade computational pathology using weakly supervised deep learning on whole slide images. *Nat Med* 2019; 25: 1301e9.
11. CAP. How to validate AI algorithms in anatomic pathology. 4 de junio de 2020. Disponible en: <https://www.cap.org/member-resources/clinical-informatics-resources/how-to-validate-ai-algorithms-in-anatomic-pathology>
12. Chang HY, Jung CK, Woo JI, Lee S, Cho J, Kim SW, Kwak TY. Artificial Intelligence in Pathology. *J PatholTransl Med.* 2019;53(1):1-12. doi: 10.4132/jptm.2018.12.16.
13. Chen JM, Li Y, Xu J, et al. Computer-aided prognosis on breast cancer with hematoxylin and eosin histopathology images: a review. *TumourBiol* 2017;39:1010428317694550.
14. Coudray N, Ocampo PS, Sakellaropoulos T, Narula N, Snuderl M, Fenyö D, et al. Classification and mutation prediction from non-small cell lung cancer histopathology images using deep learning. *Nat Med.* 2018;24(10):1559–67.
15. Crowell EF, Bazin C, Saunier F, Brixtel R, Caillot Y, Lesner B, Toutain M, Ferreri C, Garcia I, Mathieu MC, Vaussanvin J, Depardon J, Renouf A. CytoProcessorTM: A New Cervical Cancer Screening System for Remote Diagnosis. *ActaCytol.* 2019;63(3):215-223.
16. Cruz-Roa AA, Arevalo Ovalle JE, Madabhushi A, Gonzales Osorio FA. A deep learning architecture for image representation, visual interpretability and automated basal-cell carcinoma cancer detection. In: Mori K, Sakuma I, Sato Y, Barillot C, Navab N, eds. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI)*, Vol. 8150. Lecture Notes in Computer Science. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013; 403-410.
17. EhteshamiBejnordi B, Veta M, Johannes van Diest P, van Ginneken B, Karssemeijer N, Litjens G, van der Laak JAWM; the CAMELYON16 Consortium, et al. Diagnostic Assessment of Deep learning Algorithms for Detection of Lymph Node Metastases in Women With Breast Cancer. *JAMA.* 2017;318(22):2199-2210.
18. EhteshamiBejnordi B, Linz J, Glass B, et al. Deep learning-based assessment of tumor-associated stroma for diagnosing breast cancer in histopathology images. *arXiv preprint arXiv:170205803.* 2017.]
19. Fernández-Carrobles MM, Bueno G, Déniz O, Salido J, García-Rojo M, González-López L. Influence of Texture and Colour in Breast TMA Classification. *PLoS One.* 2015;10(10):e0141556.
20. Fuchs TJ, Buhmann JM. Computational pathology: challenges and promises for tissue analysis. *ComputMedImagingGraph.* 2011;35(7-8):515-530.
21. García Rojo M. Inteligencia artificial en anatomía patológica. *Rev EspPatol.* 2019;52(4):205-207.
22. García-Rojo M, De Mena D, Muriel-Cueto P, Atienza-Cuevas L, Domínguez-Gómez M, Bueno G. New European Union Regulations Related to Whole Slide Image Scanners and Image Analysis Software. *J Pathol Inform.* 2019;10:2.
23. García Rojo M, Félix Conde A, Ordi J, Ruiz Martín J, Corominas JM, Álvarez Alegret R, Alfaro L, Gatus S, MatiasGuiu X, de Álava E, Ramírez J. Guía práctica para la implantación de la

- patología digital. En: Guerra Merino I, ed. Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España 2015. Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP): Madrid. 2015. p. 249-277.
24. Google. Curso intensivo de aprendizaje automático. Clasificación: ROC y AUC. 2020. Disponible en: <https://developers.google.com/machine-learning/crash-course/classification/roc-and-auc?hl=es-419>
  25. Jahn SW, Plass M, Moinfar F. Digital Pathology: Advantages, Limitations and Emerging Perspectives. *J Clin Med*. 2020;9(11):3697.
  26. Kather JN, Heij LR, Grabsch HI, et al. Pan-cancer image-based detection of clinically actionable genetic alterations. *Nat Cancer*. 2020; 1:789–799
  27. Kim DW, Lee S, Kwon S, et al. Deep learning-based survival prediction of oral cancer patients. *Sci Rep* 2019;9:6994.
  28. Koelzer VH, Sirinukunwattana K, Rittscher J, Mertz KD. Precision immunoprofiling by image analysis and artificial intelligence. *Virchows Arch*. 2019;474(4):511-522. doi: 10.1007/s00428-018-2485-z.
  29. Koss LG, Sherman ME, Cohen MB, et al. Significant reduction in the rate of false-negative cervical smears with neural network-based technology (PAPNET Testing System). *Hum Pathol*. 1997;28(10):1196–1203.
  30. Louis DN, Gerber GK, Baron JM, Bry L, Dighe AS, Getz G, Higgins JM, Kuo FC, Lane WJ, Michaelson JS, Le LP, Mermel CH, Gilbertson JR, Golden JA. Computational pathology: an emerging definition. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(9):1133-8.
  31. Madabhushi A, Agner S, Basavanahally A, Doyle S, Lee G. Computer-aided prognosis: predicting patient and disease outcome via quantitative fusion of multi-scale, multi-modal data. *Comput Med Imaging Graph* 2011;35:506–14.
  32. Madabhushi A, Lee G. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Med Image Anal*. 2016;33:170-175
  33. Miller DD, Brown EW. Artificial Intelligence in Medical Practice: The Question to the Answer? *Am J Med*. 2018;131(2):129-133.
  34. Minssen T, Gerke S, Aboy M, Price N, Cohen G. Regulatory responses to medical machine learning. *J LawBiosc*. 2020: Isaa002. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jlb/Isaa002>
  35. Moxley-Wyles B, Colling R, Verrill C. Artificial intelligence in pathology: an overview. *DiagnHistopathol*. 2020; 26(11): 513-520.
  36. Niazi MKK, Parwani AV, Gurcan MN. Digital pathology and artificial intelligence. *Lancet Oncol*. 2019;20(5):e253-e261.
  37. Rakha EA, Toss M, Shiino S, Gamble P, Jaroensri R, Mermel CH, Chen PC. Current and future applications of artificial intelligence in pathology: a clinical perspective. *J ClinPathol*. 2020;jclinpath-2020-206908.
  38. Ramamurthy B, Coffman FD, Cohen S. A perspective on digital and computational pathology. *J Pathol Inform* 2015;6:29.
  39. Rashidi HH, Tran NK, Betts EV, Howell LP, Green R. Artificial Intelligence and Machine Learning in Pathology: The Present Landscape of Supervised Methods. *AcadPathol*. 2019;6:2374289519873088.

40. Rivenson Y, Liu T, Wei Z, Zhang Y, de Haan K, Ozcaan A. PhaseStain: the digital staining of label-free quantitative phase microscopy images using deep learning. *Light Sci Appl.* 2019;8;23.
41. Robertson S, Azizpour H, Smith K, Hartman J. Digital image analysis in breast pathology-from image processing techniques to artificial intelligence. *Transl Res.* 2018;194:19-35.
42. Romero Lauro G, Cable W, Lesniak A, Tseytlin E, McHugh J, Parwani A, Pantanowitz L. Digital pathology consultations-a new era in digital imaging, challenges and practical applications. *J Digit Imaging.* 2013;26(4):668-77.
43. Saltz JH. Digital pathology. The big picture. *Hum Pathol.* 2000;31(7):779-780.
44. Saltz J, Gupta R, Hou L et al. Spatial organization and molecular correlation of tumor-infiltrating lymphocytes using deep learning on pathology images. *Cell Rep.* 2018;23:181–193.e187.
45. The SAM/BAM Format Specification Working Group. Sequence Alignment/Map Format Specification. 3 Dec 2020. Disponible en: <https://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf>
46. Sanyal P, Mukherjee T, Barui S, Das A, Gangopadhyay P. Artificial intelligence in cytopathology: a neural network to identify papillary carcinoma on thyroid fine-needle aspiration cytology smears. *J Pathol Inform.* 2018;9:43.
47. Savage RS, Yuan Y. Predicting chemoin sensitivity in breast cancer with 'omics/digital pathology data fusion. *R. Soc. Open Sci.* 2016; 3: 140501.
48. Senaras C, Niazi MKK, Lozanski G, Gurcan MN. DeepFocus: detection of out-of-focus regions in whole slide digital images using deep learning. *PLoS One* 2018; 13: e0205387.
49. TMF. The Medical Futurist. FDA-approved A.I.-based algorithms. Última visita: 4 de enero de 2021. Disponible en: <https://medicalfuturist.com/fda-approved-ai-based-algorithms/>
50. Wang D, Khosla A, Gargeya R, Irshad H, Beck AH. Deep learning for identifying breast cancer. In: *Proceedings of the International Society on Biomedical Imaging (ISBI), Quantitative Methods.* 2016.
51. Weinstein RS, Graham AR, Richter LC, Barker GP, Krupinski EA, Lopez AM, Erps KA, Bhattacharyya AK, Yagi Y, Gilbertson JR. Overview of telepathology, virtual microscopy, and whole slide imaging: prospects for the future. *Hum Pathol.* 2009;40(8):1057-1069.
52. Wen S, Kurc TM, Gao Y, Zhao T, Saltz JH, Zhu W. A Methodology for Texture Feature-based Quality Assessment in Nucleus Segmentation of Histopathology Image. *J Pathol Inform.* 2017;8:38.
53. Zhang L, Le Lu, Noguez I, Summers RM, Liu S, Yao J. DeepPap: Deep Convolutional Networks for Cervical Cell Classification. *IEEE J Biomed Health Inform.* 2017;21(6):1633-1643.
54. Zhi J, Sun J, Wang Z, Ding W. Support vector machine classifier for prediction of the metastasis of colorectal cancer. *Int J Mol Med.* 2018;41(3):1419-1426.

GRUPO DE TRABAJO DE  
INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA SEAP





# Implementación de la secuenciación masiva dirigida en la actividad asistencial de los servicios de anatomía patológica. Un resumen teórico con recomendaciones prácticas

**Susana Hernández, Esther Conde, Ana Suárez-Gauthier, Rebeca Martínez, Fernando López-Ríos**  
*Anatomía Patológica-Laboratorio de Dianas Terapéuticas. Hospital Universitario HM Sanchinarro. Madrid.*

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la medicina personalizada (o de precisión) ha supuesto una verdadera revolución en oncología, debido a la posibilidad de seleccionar el tratamiento más personalizado para cada paciente en base a las alteraciones genéticas identificadas en sus muestras tumorales. Seguramente, el cáncer de pulmón no de célula pequeña (CPNCP) sería el mejor ejemplo de la actual oncología de precisión, al ser uno de los tumores con mayor número de dianas potencialmente tratables [1,2].

La creciente necesidad de poder estudiar multitud de biomarcadores predictivos de manera simultánea en cada paciente ha llevado a incorporar en la práctica clínica la secuenciación de próxima generación (NGS, del inglés *next-generation sequencing*) [3]. Aunque en la actualidad existen algunas limitaciones por resolver, entre las que destacan la incorporación de la NGS en el flujo de trabajo del laboratorio, el costo de las pruebas y la optimización de los tiempos de respuesta para la emisión de los informes de datos moleculares, la NGS está demostrando ser una metodología robusta capaz de ofrecer una información relevante que mejora la atención oncológica de los pacientes con cáncer [4], [5].

## DIFERENTES ABORDAJES DE LA METODOLOGÍA DE SECUENCIACIÓN MASIVA

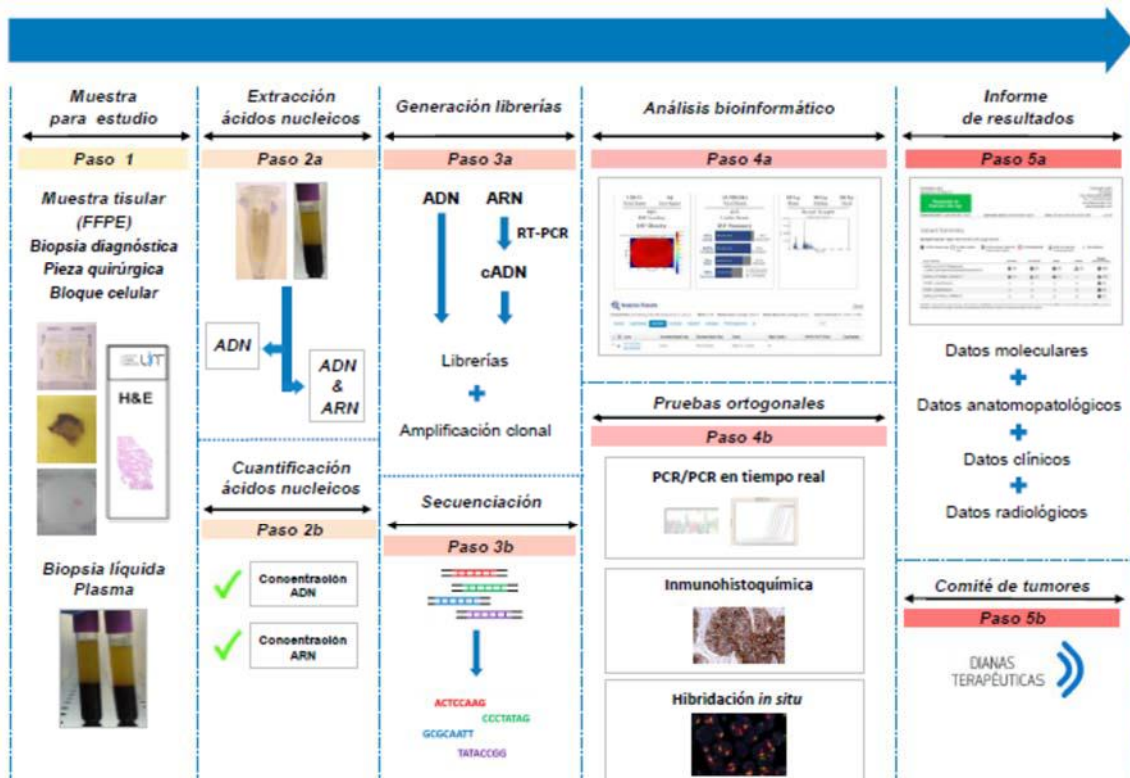
En contrapartida a la secuenciación del exoma completo (WES, del inglés *Whole-Exome Sequencing*), secuenciación del genoma completo (WGS, del inglés *Whole-Genome Sequencing*) o secuenciación del transcriptoma completo (WTS, del inglés *Whole Transcriptome Sequencing*), la metodología de secuenciación masiva más ampliamente implementada en la práctica clínica real es la secuenciación masiva dirigida (SMD, en inglés *Targeted Next Generation Sequencing*). La principal limitación de la aplicación de las secuenciaciones completas (WES, WGS y WTS) reside en que, aunque son metodologías capaces de ofrecer mucha información, son técnicas demasiado caras en relación con el beneficio clínico actual que ofrecen al paciente oncológico. Por el contrario, la SMD es capaz de estudiar variaciones de un único nucleótido (SNVs, del inglés *single nucleotide variants*), inserciones y deleciones (*indels*), variaciones en el número de copias (CNVs, del inglés *copy number variations*) y

reordenamientos o fusiones génicas, en un número limitado de genes de interés que varía en función del panel utilizado (profundidad en anchura, del inglés *breadth of coverage*), convirtiéndose en la metodología más coste-efectiva. Adicionalmente, la SMD ofrece una elevada profundidad de lectura (del inglés, *deep coverage*) de las regiones diana que estudia y que se traduce en una elevada reproducibilidad y robustez de resultados, añadido a un mayor límite de detección analítica (LOD, del inglés *limit of detection*) de las variantes [6]. Por último, esta aproximación implica la obtención más rápida de resultados, así como una interpretación más sencilla de los mismos [3].

## LA SMD EN EL ESTUDIO DE BIOMARCADORES PREDICTIVOS PARA EL PACIENTE ONCOLÓGICO

Cada servicio deberá implementar el panel que mejor cubra sus necesidades respondiendo a varias preguntas: (1) ¿Puedo realizar la SMD dentro de mi institución o tengo que externalizar la prueba?, (2) ¿Qué plataforma (marca comercial) elijo? y (3) ¿Qué panel nos conviene? Aunque el desarrollo de los argumentos necesarios para contestar a estas preguntas no está dentro de los objetivos de este resumen, algunas consideraciones prácticas pueden ayudar a tomar la decisión más sensata. Nosotros somos firmes partidarios de la realización dentro de cada institución de su SMD, pero un análisis de costes es fundamental para garantizar su sostenibilidad a medio y largo plazo. Algunas publicaciones recientes han revisado las distintas marcas comerciales de SMD y es necesario conocer con detalle las ventajas e inconvenientes de cada opción (ver más adelante). Por último, la elección del tamaño del panel dependerá del tipo de patología que queramos estudiar y del tiempo de respuesta y los costes que podamos asumir.

**Figura 1.** Flujo de laboratorio de la secuenciación masiva dirigida. ADN: ácido desoxirribonucleico; ARN: ácido ribonucleico; cADN: ADN copia; FFPE: tejido fijado en formol e incluido en parafina; H&E: hematoxilina eosina; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.



El desarrollo de la metodología de SMD aplicada a la práctica clínica incluye cuatro etapas principales: (1) selección de la muestra y extracción de los ácidos nucleicos, (2) generación de las librerías y amplificación clonal, (3) secuenciación y (4) análisis de los resultados moleculares (figura 1) [7]. Para la generación de librerías, el material de partida debe ser fragmentado siendo posible utilizar diferentes aproximaciones en función de la metodología a desarrollar (fragmentación mecánica o enzimática). La etapa de amplificación clonal de las librerías puede desarrollarse en base a las dos principales aproximaciones metodológicas principalmente implementadas en los laboratorios de anatomía patológica: amplificación en puente (Illumina, San Diego, CA, USA) o PCR en emulsión (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). A nivel de la etapa de secuenciación, ambas aproximaciones también utilizan diferente base metodológica: en el caso de Illumina, secuenciación por síntesis que utiliza nucleótidos marcados cuya señal fluorescente es capturada por cámara tipo CCD (del inglés, *Charge-Coupled Device*); para los paneles de ThermoFisher Scientific, nucleótidos sin marcar, semiconductores no-ópticos y detección del cambio de pH. Aunque no existen comparativas exhaustivas entre ambas metodologías, la experiencia de los diferentes laboratorios adquirida durante los últimos años, describen fortalezas o ventajas para cada una de estas metodologías, entre las que principalmente podemos destacar que Illumina permite identificar alteraciones «desconocidas» y trabajar con paneles de genes más grandes, mientras que ThermoFisher Scientific requiere menor cantidad de material de partida y emite resultados moleculares con tiempos de respuesta más cortos [7]. Como principales debilidades cabe destacar que los secuenciadores de Illumina requieren una concentración de partida de ácidos nucleicos más elevada y tiempos de respuesta más largos, mientras que los secuenciadores de ThermoFisher Scientific pueden generar artefactos de secuenciación tipo *indel* asociados a la presencia de regiones homopoliméricas en la muestra a estudio [8].

## TIPOS DE MUESTRAS PARA LA SMD

Los ácidos nucleicos de partida se obtienen prioritariamente de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE, del inglés *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue*), englobando tanto las muestras tisulares como los bloques celulares procedentes de muestras citológicas. En la primera etapa de preparación de la muestra y extracción de ácidos nucleicos, es primordial la revisión exhaustiva de todo el material parafinado de cada paciente para la selección del bloque de parafina más adecuado en términos de porcentaje de celularidad tumoral (punto de corte óptimo: igual o mayor al 30%) [9]. Según las diferentes metodologías comerciales disponibles, los requerimientos de ácidos nucleicos de partida varían mucho, lo que puede influir en el porcentaje de resultados no concluyentes para cada una de ellas. Para identificar fusiones tratables, el estudio del ARN es más sensible que la utilización exclusiva del ADN [10].

En aquellos pacientes en los que la muestra FFPE inicial es inadecuada, así como en los pacientes en progresión en los que no es posible la toma de una nueva muestra, una alternativa eficiente incluye el estudio de biomarcadores en un nuevo tipo de muestra recientemente incorporada, la «biopsia líquida». La definición global de biopsia líquida incluye las células tumorales circulantes (CTCs), exosomas, DNA libre circulante (cfDNA, del inglés *cell free DNA*), RNA libre circulante (cfRNA, del inglés *cell free RNA*) y ARN plaquetario, aislados principalmente a partir de sangre (plasma) pero también de orina, líquido pleural, líquido cerebroespinal y saliva, entre otros [11]. Las metodologías de secuenciación masiva aplicadas sobre muestras de biopsia líquida requieren desarrollar profundidades de lectura mucho mayores en comparación a la secuenciación masiva sobre tejido. En consecuencia, conlleva un mayor LOD para estas metodologías pero siendo imprescindible incorporar códigos de barras que nos ayuden a diferenciar errores de la secuenciación de la presencia de variantes reales [11]. A nivel de limitaciones, los resultados falsos negativos pueden ser debidos además de a factores técnicos, a una escasa representación de ácidos nucleicos circulantes generalmente en consecuencia de una limitada carga metastásica del paciente. En contrapartida, los resultados falsos positivos están relacionados con el fenómeno de hematopoyesis clonal, pero

también al intento de aumentar la sensibilidad de la técnica para detectar mutaciones con una baja frecuencia alélica (menor del 1%) [12].

### PANELES DE SMD APROBADOS POR LA FDA

El panel OncoPrint Dx Target test (ThermoFisher Scientific) fue el primer test de tipo *companion diagnostic* (CDx) aprobado por la agencia regulatoria de Estados Unidos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) en junio del 2017 para el CPNCP [13]. Este panel estudia de manera simultánea ADN, para evaluar la presencia de SNVs y deleciones en 23 genes, y ARN para el estudio de fusiones, y está optimizado para su uso en muestras parafinadas. El detalle actual de biomarcadores para los que tiene aprobación, incluye: BRAF (V600E), EGFR (deleciones exón 19 y L858R), ROS1 (fusiones) y RET (fusiones) [14].

En noviembre del 2017 consiguieron la aprobación por la FDA dos paneles, *Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets* (IMPACT) del Memorial Sloan Kettering (MSK-IMPACT) y el panel FoundationOne CDx (F1CDx), de Foundation Medicine (Cambridge, MA, USA) [15]. El panel MSK-IMPACT estudia SNVs, *indels*, CNVs, fusiones e inestabilidad de microsatélites (MSI, del inglés *microsatellite instability*) en 468 genes, secuenciando de manera simultánea, tanto muestra tumoral como normal de cada uno de los pacientes a estudio. El panel F1CDx detecta SNVs, *indels*, CNVs y reordenamientos en 324 genes, además de MSI y carga mutacional (TMB, del inglés *tumor mutational burden*). En la actualidad, el panel TruSight Oncology 500 (TSO 500) de Illumina se encuentra pendiente de aprobación por la FDA [16]. Este panel estudia SNVs e *indels* en 523 genes, así como fusiones y variantes de *splicing* en 55 genes. Adicionalmente informa de los resultados de MSI y TMB.

A nivel de paneles optimizados para muestras no invasivas como la biopsia líquida, a finales de 2020 fue aprobado el panel FoundationOne Liquid CDx (Foundation Medicine), como *companion diagnostic* en CPNCP, cáncer de próstata, mama y ovario para diferentes biomarcadores detectados en cfDNA aislado de plasma [17]. Este panel permite el estudio de la presencia de SNVs e *indels* en 311 genes, CNVs en BRCA1, BRCA2 y ERBB2 y reordenamientos en ALK, BRCA1 y BRCA2, además de emitir la información relativa aMSI y bTMB (blood-TMB). Previamente, en agosto de 2020, el panel Guardant360 CDx (Guardant Health; Redwood City, CA, USA) también conseguía su aprobación por la FDA [18]. Por su parte, este panel ofrece la posibilidad del estudio de SNVs e *indels* en 74 genes, CNVs en 18 genes, fusiones en 6 genes y MSI.

### CONTROL DE LA CALIDAD EN LA SMD

El control de la calidad de los procesos de laboratorio relacionados con la SMD es un punto de vital importancia. La recomendación en España incluye la incorporación del laboratorio a la norma ISO9001, así como la correspondiente acreditación de estos procesos bajo la NORMA UNE-EN ISO15189, que engloba tanto la parte de gestión como la parte técnica con los requisitos a nivel de personal, instalaciones, equipos, procedimientos e informes. Así mismo, como parte de las actividades que garantizan la calidad global del procedimiento de SMD en los laboratorios, es aconsejable la participación en programas de calidad externos como el promovido por la *European Molecular Quality Network-EMQN* [19], que evalúan tanto la capacidad técnica de la SMD, como la identificación y correcta interpretación de variantes con utilidad clínica.

### DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA SMD

El mayor potencial de aplicación de la SMD en la práctica clínica se alcanza mediante el desarrollo de comités moleculares de tumores (MTB, del inglés *molecular tumor boards*) tanto intra- como inter-laboratorio [20,21]. Los MTBs intra-laboratorio tienen como objetivo principal la interpretación final de las variantes identificadas en la SMD en las diferentes bases de datos disponibles, así como su

integración con la información anatomopatológica, clínica y radiológica disponible. En la tabla 1 se resumen algunas de las principales bases de datos públicas destinadas a la búsqueda, clasificación e interpretación de variantes. Los resultados moleculares obtenidos para los diferentes biomarcadores deberán reflejarse en el informe de resultados de la SMD junto con las conclusiones relevantes en el contexto del tumor de cada paciente oncológico. Por su parte, en el MTB inter-laboratorio estarán implicados profesionales en representación de los diferentes servicios hospitalarios que participan en el manejo del paciente oncológico. Desde este punto de vista multidisciplinar, su principal objetivo se centra en el consenso de recomendaciones de tratamiento para cada uno de los pacientes en base a su información molecular y a escalas de accionabilidad, como ESCAT de la Sociedad Europea de Oncología Médica (del inglés *ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets*), que simplifican a la vez que estandarizan la elección del tratamiento dirigido [22].

**Tabla 1.** Principales bases y metabases de datos públicas destinadas a la búsqueda, clasificación e interpretación de variantes.

Fuente	URL
cBioPortal	<a href="http://www.cbioportal.org">www.cbioportal.org</a>
Cancer Genome Interpreter	<a href="https://www.cancergenomeinterpreter.org/home">https://www.cancergenomeinterpreter.org/home</a>
Catalogue of Somatic Mutation in Cancer (COSMIC)	<a href="http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic">http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic</a>
Clinical Interpretation of Variants in Cancer (CIViC)	<a href="http://www.civicdb.org">www.civicdb.org</a>
ClinVar	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a>
Database of Curated Mutations (DoCM)	<a href="http://docm.info/">http://docm.info/</a>
Jackson Laboratory	<a href="http://ckb.jax.org">http://ckb.jax.org</a>
Molecular Tumour Board Portal	<a href="https://www.mtbp.org/">https://www.mtbp.org/</a>
MyCancerGenome	<a href="http://www.mycancergenome.org">www.mycancergenome.org</a>
Precision Medicine Knowledgebase (PMKB)	<a href="http://pmkb.weill.cornell.edu/">http://pmkb.weill.cornell.edu/</a>
OncoKB	<a href="http://www.oncokb.org/">www.oncokb.org/</a>
The variant interpretation for cancer consortium meta-knowledgebase	<a href="https://search.cancervariants.org/#*">https://search.cancervariants.org/#*</a>

## Agradecimientos

A todo el personal de Anatomía Patológica-Laboratorio de Dianas Terapéuticas por su filosofía de trabajo en equipo. F. López-Ríos agradece a T. Crean su constante apoyo. Las opiniones incluidas en este capítulo derivan de estudios financiados por diversas agencias (Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Fondos FEDER y Plan Estatal de I+D+I, PI11/02866, PI14/01176, PI17/01001; Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) Red en el Área de Cáncer (CIBERONC), grupo CB16/12/00442; Comunidad de Madrid, Programa iLUNG (B2017/BMD-3884) y de la propia experiencia del Servicio de Anatomía Patológica-Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Grupo HM Hospitales.

**Bibliografía**

1. S.-R. Yang, A. M. Schultheis, H. Yu, D. Mandelker, M. Ladanyi, and R. Büttner, "Precision Medicine in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Applications and Future Directions," *Semin. Cancer Biol.*, 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.07.009.
2. P. Garrido et al., "Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology," *Clin. Transl. Oncol.*, 2019, doi: 10.1007/s12094-019-02218-4.
3. M. D. Ewalt, H. West, and D. L. Aisner, "Next Generation Sequencing - Testing Multiple Genetic Markers at Once," *JAMA Oncol.*, vol. 5, no. 7, p. 1076, 2019, doi: 10.1001/jamaoncol.2019.0453.
4. M. T. A. Donoghue, A. M. Schram, D. M. Hyman, and B. S. Taylor, "Discovery through clinical sequencing in oncology," *Nat. Cancer*, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1038/s43018-020-0100-0.
5. F. Mosele et al., "Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group," *Annals of Oncology*, vol. 31, no. 11. Elsevier Ltd, pp. 1491–1505, Nov. 01, 2020, doi: 10.1016/j.annonc.2020.07.014.
6. D. Sims, I. Sudbery, N. E. Illott, A. Heger, and C. P. Ponting, "Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses," *Nature Reviews Genetics*, vol. 15, no. 2. Nat Rev Genet, pp. 121–132, Feb. 2014, doi: 10.1038/nrg3642.
7. S. Yohe and B. Thyagarajan, "Review of clinical next-generation sequencing," *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, vol. 141, no. 11. College of American Pathologists, pp. 1544–1557, Nov. 01, 2017, doi: 10.5858/arpa.2016-0501-RA.
8. Y. Zhong, F. Xu, J. Wu, J. Schubert, and M. M. Li, "Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine," *Ann. Lab. Med.*, vol. 41, no. 1, pp. 25–43, Jan. 2020, doi: 10.3343/alm.2021.41.1.25.
9. L. J. Jennings et al., "Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists," *J. Mol. Diagnostics*, vol. 19, no. 3, pp. 341–365, 2017, doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.01.011.
10. R. Benayed et al., "High yield of RNA sequencing for targetable kinase fusions in lung adenocarcinomas with no mitogenic driver alteration detected by DNA sequencing and low tumor mutation burden," *Clin. Cancer Res.*, vol. 25, no. 15, pp. 4712–4722, Aug. 2019, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0225.
11. J. Remon et al., "Liquid biopsy in oncology: a consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology," *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 22, no. 6, pp. 823–834, 2020, doi: 10.1007/s12094-019-02211-x.
12. M. Ignatiadis, G. W. Sledge, and S. S. Jeffrey, "Liquid biopsy enters the clinic — implementation issues and future challenges," *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Research, 2021, doi: 10.1038/s41571-020-00457-x.
13. "FDA Approves First Companion Diagnostic Test to Simultaneously Screen for Multiple Non-Small Cell Lung Cancer Therapies - Jun 22, 2017." <https://thermofisher.mediaroom.com/2017-06-22-FDA-Approves-First-Companion-Diagnostic-Test-to-Simultaneously-Screen-for-Multiple-Non-Small-Cell-Lung-Cancer-Therapies> (accessed Feb. 13, 2021).
14. "FDA Approves First NGS-Based Companion Diagnostic for RET Fusion-Positive Non-Small Cell Lung Cancer - Sep 8, 2020." <https://thermofisher.mediaroom.com/2020-09-08-FDA-Approves->

- First-NGS-Based-Companion-Diagnostic-for-RET-Fusion-Positive-Non-Small-Cell-Lung-Cancer (accessed Feb. 13, 2021).
15. "CDRH'S approach to tumor profiling next generation sequencing tests." <https://www.fda.gov/media/109050/download> (accessed Feb. 14, 2021).
  16. "The FDA Grants Breakthrough Device Designation for Illumina's TruSight Assay." <https://www.illumina.com/company/news-center/feature-articles/fda-grants-breakthrough-device-designation.html> (accessed Feb. 14, 2021).
  17. "FDA Approves Liquid Biopsy Next-Generation Sequencing Companion Diagnostic Test | FDA." <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-liquid-biopsy-next-generation-sequencing-companion-diagnostic-test> (accessed Feb. 14, 2021).
  18. "FDA Approves First Liquid Biopsy Next-Generation Sequencing Companion Diagnostic Test | FDA." <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-liquid-biopsy-next-generation-sequencing-companion-diagnostic-test> (accessed Feb. 14, 2021).
  19. "Home - EMQN." <https://www.emqn.org/> (accessed Mar. 09, 2021).
  20. S. Kato et al., "Real-world data from a molecular tumor board demonstrates improved outcomes with a precision N-of-One strategy," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18613-3.
  21. C. Luchini, R. T. Lawlor, M. Milella, and A. Scarpa, "Molecular Tumor Boards in Clinical Practice," *Trends in Cancer*, vol. 6, no. 9. Cell Press, pp. 738–744, Sep. 01, 2020, doi: 10.1016/j.trecan.2020.05.008.
  22. J. Mateo et al., "A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: The ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT)," *Ann. Oncol.*, vol. 29, no. 9, pp. 1895–1902, Sep. 2018, doi: 10.1093/annonc/mdy263.





# RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO DE LINFOMAS DE LA SEAP



# Recomendaciones para el estudio histopatológico, inmunohistoquímico, citogenético y molecular e informe diagnóstico de los procesos neoplásicos linfoides. Consenso SEAP-SEHH-GOTEL

**Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP), Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), Grupo Oncológico para el Tratamiento y Estudio de Linfomas (GOTEL)**

## **Grupo de trabajo:**

**Santiago Montes Moreno.** *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

**Manuela Mollejo Villanueva.** *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.*

**Máximo Fraga.** *Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela.*

**Juan Fernando García.** *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital MD Anderson, Madrid.*

**José Luis Villar.** *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Macarena, Sevilla.*

**Antonio Martínez.** *Unidad de Hematopatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic, Barcelona.*

**Socorro María Rodríguez Pinilla.** *Servicio de Anatomía Patológica, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.*

**Empar Mayordomo Aranda.** *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario La Fe, Valencia.*

**Ana Batlle.** *Unidad de Citogenética Hematológica, Servicio de Hematología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

**Mariano Provencio Pulla.** *Servicio de Oncología Médica, Hospital Puerta de Hierro, Madrid.*

**María Rozmán.** *Unidad de Hematopatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic, Barcelona.*

**Ramón García Sanz.** *Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario de Salamanca.*

Tercera edición. Esta guía se publicará en mayo de 2021. La actualización de la misma se espera en mayo de 2023.

Descargo de responsabilidad y potenciales conflictos de interés: Aunque el contenido de las guías se considera cierto, preciso y actualizado en el momento de la publicación, ni los autores, ni las sociedades científicas a las que representan aceptan ninguna responsabilidad legal en relación con el contenido ni el potencial uso de las mismas. Los autores no tienen conflictos de interés relacionados directa o indirectamente con el contenido de las guías.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Introducción

**Santiago Montes Moreno**

*santiago.montes@scsalud.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

## **OBJETIVO DE LAS GUÍAS DE CONSENSO**

El avance en la investigación en el área de patología oncohematológica aporta continuamente nuevos marcadores con potencial valor diagnóstico, pronóstico y predictivo de respuesta a terapias dirigidas. Es tarea del hematopatólogo conocer y participar activamente en este avance así como incorporar gradualmente en su práctica diaria aquellos marcadores que se validen en el ámbito clínico [1]. No obstante, la evidencia disponible en la literatura basada en ensayos clínicos y estudios observacionales (niveles de evidencia I y II) acerca de la aplicabilidad de marcadores diagnósticos en el campo de la hematopatología es escasa y se requiere con frecuencia un consenso de expertos en la materia para generar documentos de recomendaciones sobre aspectos relacionados con diagnóstico en hematopatología [2,3].

Así, la principal finalidad de estas guías es servir al patólogo general, hematopatólogo y hematólogo dedicado al diagnóstico el producto de la evidencia disponible filtrado por un comité de expertos que matizan las recomendaciones en función, esencialmente, de la aplicabilidad de la técnica y de su relevancia clínica. Se deriva de esto que las guías definen el catálogo de técnicas diagnósticas que se deben utilizar en un laboratorio de hematopatología y la forma en que se integran en el proceso diagnóstico. Adicionalmente se incluyen recomendaciones específicas sobre otros aspectos menos técnicos del proceso diagnóstico como la interpretación de patrones histopatológicos y consideraciones sobre los criterios utilizados en el diagnóstico de cada entidad, según la clasificación vigente, de la OMS y su aplicación cotidiana [4,5].

Aunque es indudable que la terapia de cada paciente y su pronóstico depende en buena medida del diagnóstico histopatológico y de algunos de los marcadores complementarios utilizados en este proceso, la decisión acerca de la mejor terapia para cada paciente se debe tomar en comités multidisciplinares [2]. Existen toda una serie de marcadores biológicos clínicos (por ejemplo, edad del paciente y estadificación), esenciales en muchos casos en la identificación de la mejor terapia para cada caso, que se deben valorar en conjunto con los datos histopatológicos y moleculares en la toma de decisión clínica. A este respecto existen guías clínicas de referencia [3]. Así, el objetivo al desarrollar estas guías de consenso a nivel nacional es normalizar la aplicación de los criterios diagnósticos y los métodos complementarios empleados en el mismo en patología oncohematológica linfóide.

Específicamente se pretende que las guías aquí desarrolladas provean:

- Recomendaciones acerca de los métodos óptimos de obtención de muestras para diagnóstico y el uso y procesamiento adecuado de las muestras e incorporación del excedente a biobancos.

- Orientación del catálogo de técnicas de uso clínico en el ámbito del diagnóstico hematopatológico (estudio morfológico, inmunohistoquímico y de citometría de flujo, FISH y moleculares). Recomendaciones acerca de condiciones técnicas y de interpretación óptimas.
- Orientación acerca del abordaje diagnóstico óptimo en el ámbito de la hematopatología con énfasis en los criterios diagnósticos vigentes, diagnóstico diferencial y potenciales errores diagnósticos.
- Indicación de marcadores diagnósticos de utilidad pronóstica y con potencial carácter predictivo de respuesta a terapia.

## MÉTODO DE GENERACIÓN DE LAS GUÍAS

Un grupo de ocho hematopatólogos expertos (Santiago Montes Moreno, Juan Fernando García, Manuela Mollejo Villanueva, Máximo Fraga, Antonio Martínez, María Rodríguez Pinilla, José Luis Villar, Empar Mayordomo Aranda), tres hematólogos especialistas en diagnóstico hematológico (Ramón García Sanz, María Rozmán y Ana Batlle) y un médico oncólogo especialista en patología hematolinfóide (Mariano Provencio) realiza una revisión exhaustiva de la literatura disponible y genera unos documentos tipo con capítulos dedicados a apartados generales y capítulos específicos para cada entidad nosológica. Al final de cada capítulo se derivan unas recomendaciones específicas. Los niveles de evidencia son los utilizados por la *US Agency for Health Care Policy and Research* (véase tablas 1 y 2).

Estos documentos se revisan en conjunto por el grupo redactor. Las recomendaciones producto de estos documentos revisados se someten a consenso por el grupo redactor utilizando un sistema de votación sobre un cuestionario. Las opiniones sobre cada ítem se miden utilizando una escala Likert de 4 puntos oscilando desde «muy de acuerdo» a «muy en desacuerdo». El consenso se define como el apoyo de más del 70% de los expertos a un elemento, habiendo respondido con «muy de acuerdo» o «de acuerdo». El documento final incluye el texto principal de cada capítulo y las recomendaciones finalmente consensuadas específicas de cada capítulo al final del mismo.

El documento guía se revisará y actualizará con una periodicidad bienal.

**Tabla 1.** Niveles de evidencia.

<b>Ia</b>	Evidencia obtenida de meta-análisis de ensayos clínicos randomizados.
<b>Ib</b>	Evidencia obtenida de al menos un ensayo clínico randomizado.
<b>IIa</b>	Evidencia obtenida de al menos un ensayo bien diseñado, no randomizado, incluyendo ensayos en fase II y estudios de tipo caso-control.
<b>IIb</b>	Evidencia obtenida de al menos un ensayo de otro tipo, bien diseñado, cuasiexperimental, por ejemplo estudios no intervencionistas, incluyendo estudios observacionales.
<b>III</b>	Evidencia obtenida de estudios descriptivos no experimentales bien diseñados. Evidencia obtenida de metaanálisis o ensayos clínicos randomizados o estudios de fase II publicados sólo como resumen a congreso.
<b>IV</b>	Evidencia obtenida de informes de comités de expertos u opiniones y/o experiencia clínica de autoridades en el campo.

**Tabla 2.** Grados de recomendación.

<b>Grado A. Evidencia nivel Ia, Ib</b>	Recomendación basada en al menos un ensayo clínico randomizado de buena calidad y consistencia, enfocado específicamente en la recomendación.
<b>Grado B. Evidencia nivel IIa, IIb, III</b>	Recomendación basada en estudios bien planificados pero no ensayos clínicos randomizados acerca del tema de la recomendación.
<b>Grado C. Evidencia nivel IV</b>	Evidencia basada en informes de comités de expertos y/o experiencia clínica de autoridades en el tema.

### Bibliografía

1. Montes-Moreno S, López-Ríos F. Patología molecular y dianas terapéuticas. Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España. España 2013.
2. Parker A BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting. 2012.
3. NCCN. NCCN Guidelines, <https://www.nccn.org/>. v1, 2017 ed2017.
4. Swerdlow SH CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Press I, editor2008.
5. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016;127(20):2375-90.





# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico

**Santiago Montes Moreno**

*santiago.montes@scsalud.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

## **BIOPSIA DE TEJIDO**

La biopsia de tejido es necesaria para establecer el diagnóstico de procesos linfoproliferativos, especialmente en los casos con afectación ganglionar predominante o no leucémicos. La biopsia no sólo permite establecer un diagnóstico de linfoma sino establecer el tipo histológico específico según la clasificación vigente [4,5], generar información pronóstica y eventualmente orientar la terapia. Asimismo, el material excedente diagnóstico, adecuadamente procesado, se podrá incorporar a los biobancos de tejido para futuros usos en investigación biomédica. Es preciso obtener consentimiento informado del paciente para los diferentes procedimientos requeridos (obtención de la muestra, incorporación de la misma al Biobanco, etc.). Es responsabilidad del clínico obtener estos consentimientos informados del paciente.

En todos los casos, la muestra debe acompañarse de una hoja de solicitud de estudio anatomopatológico con un breve resumen de los antecedentes del paciente debiéndose especificar la sospecha diagnóstica, el origen de la muestra y la hora de extracción. Los datos de índole hematológica relevantes en la orientación diagnóstica del caso deben incluirse en todo caso en la hoja de solicitud si no están accesibles en red en el centro en cuestión.

## **BIOPSIA DE ADENOPATÍA. TIPOS DE MUESTRAS**

La biopsia de adenopatías en un paciente con sospecha de proceso linfoproliferativo debe ser suficiente para realizar los siguientes estudios:

- Análisis de la morfología en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFIP).
- Estudios de inmunohistoquímica en muestras FFIP.
- Estudios de citometría de flujo (CMF) de material en fresco. Si no es posible hacer llegar la muestra en condiciones al laboratorio de CMF se debe considerar disgregar la muestra e incluir en fijador previo al envío.
- Análisis de FISH a partir de improntas de tejido o tejido FFIP.
- Estudios moleculares (análisis de clonalidad linfoide mediante PCR, PCR cuantitativa y similares, secuenciación) a partir de ADN extraído de la muestra. La mayoría de los análisis moleculares basados en amplificación del ADN se pueden realizar a partir de tejido FFIP aunque la calidad del ADN de partida es significativamente inferior al del extraído de muestras en fresco/congeladas.

- Estudios de citogenética a partir de muestras en fresco.

### Tipos de muestra:

1. **Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección y debe de ser el método utilizado siempre en los casos de adenopatías superficiales/palpables. En aquellos pacientes con adenopatías profundas no accesibles a la palpación o que por su localización tienen mayor riesgo quirúrgico, la aproximación dependerá de la situación del paciente, de la sospecha diagnóstica, del tamaño así como de la adherencia a planos profundos\*.

\* En el caso de masas en mediastino anterior para realizar un correcto diagnóstico es necesario realizar una mediastinoscopia con **biopsia incisional** (la rentabilidad de las muestras de punción obtenidas mediante EBUS (ecobroncoscopia) para el diagnóstico de procesos hematológicos es en general bajo) **o en su defecto, una biopsia-trucut con aguja gruesa (14-16 G)**. En el caso de adenopatías retroperitoneales o intraabdominales, ante un paciente con situación clínica que permita afrontar la cirugía se realizará una laparoscopia/laparotomía con toma de biopsia escisional/incisional. En caso de que la situación clínica del paciente no permita una cirugía (por situación general, comorbilidades, coagulopatía etc.) o el diagnóstico de linfoma sea poco probable, se realizará una **BAG (biopsia con aguja gruesa)-trucut**.

2. **Biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la aproximación a utilizar en aquellos casos en los que el diagnóstico de linfoma NO sea probable o que en caso de que la sospecha sea linfoma no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Siempre que sea posible, se obtendrán **6-8 cilindros con una aguja de 14-16G**. En estos casos el estudio de la muestra de BAG debe incluir siempre, además del estudio morfológico, técnicas auxiliares (citometría de flujo, inmunohistoquímica, análisis de reordenamientos mediante FISH y, en situaciones concretas, análisis de clonalidad linfoide B y T).
3. **Punción aspiración con aguja fina (PAAF):** A pesar de la relativa facilidad y el reducido número de complicaciones que presenta la PAAF (dirigida o no mediante técnicas de imagen), debido al escaso rendimiento diagnóstico, esta prueba **NO debe de realizarse** para el diagnóstico inicial de un paciente con adenopatías de posible origen neoplásico linfoide [2]. No obstante, puede ser **suficiente para establecer un diagnóstico de recidiva** [6-10]. Igualmente es de utilidad como medio para orientar el **manejo del paciente con baja sospecha de proceso neoplásico linfoide**.

Una vez realizada la biopsia, la muestra será idealmente remitida en fresco inmediatamente al laboratorio de anatomía patológica donde el patólogo se encargará de procesar y derivar con carácter urgente a los laboratorios pertinentes para los estudios especiales que requieran muestra en fresco (citometría de flujo, FISH en improntas, molecular y microbiología si procede) y biobanco de tejidos. Para una buena preservación del tejido, el intervalo transcurrido entre la toma de biopsia y su procesamiento no debe ser superior a 30 minutos. **Si no es posible asegurar que la muestra se va a procesar en este tiempo se sumergirá intacta en formol tamponado y se enviará de la forma habitual al servicio de anatomía patológica.**

Las muestras de biopsia incisional/escisional así como BAG destinadas a estudio histopatológico se deben fijar en formol tamponado que permite la realización posterior de estudios morfológicos, fenotípicos, de hibridación in situ y moleculares. Las muestras escisionales se deben procesar adecuadamente para asegurar una fijación homogénea (secciones de 2-5 mm de grosor perpendiculares al eje mayor del ganglio linfático). Para evitar problemas de reactividad inmunohistoquímica se debe evitar la sobrefijación (por ejemplo, más de 24 horas en formol o más de 4 horas en zinc formalina o B5 [11]).

La congelación de las muestras con destino biobanco o análisis molecular se debe realizar en condiciones estándar:

- Criomoldes con medio OCT que proteja la muestra.
- Inmersión en isopentano o nitrógeno líquido a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Almacenaje a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **MÉDULA ÓSEA**

La muestra de aspirado de médula ósea, en conjunto con los hallazgos clínicos y en sangre periférica pueden ser suficientes para el diagnóstico de algunos procesos linfoproliferativos, particularmente aquellos con manifestaciones leucémicas (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células grandes granulares, tricoleucemia, entre otros). No obstante, en los casos de proceso linfoproliferativo de localización ganglionar o visceral/ósea las muestras obtenidas de médula ósea (aspirado o cilindro de médula ósea de cresta ilíaca) no son suficientes para el diagnóstico inicial de proceso linfoproliferativo y es preciso obtener una muestra de la localización primaria de la neoplasia.

## **BIOPSIA DE MÉDULA ÓSEA**

El papel de la biopsia-cilindro de médula ósea en el diagnóstico y estadiaje de los procesos linfoproliferativos está bien establecido [2]. La biopsia cilindro se debe obtener idealmente de la cresta ilíaca posterior o anterior y tener una longitud de al menos 1,5 cm. Microscópicamente la muestra de biopsia debe contener entre 7 y 10 áreas intertrabeculares. Es preferible tener en cuenta este criterio en lugar de la longitud del cilindro (al menos 1,5 cm según la OMS) pues la localización subcortical de algunas biopsias o una toma de muestra tangencial a la superficie del hueso puede limitar la representatividad a pesar de tener una longitud de 1,5 cm.

La muestra se puede fijar en medios de formol al 4% o mezclas de formol y B5 u otras, aunque estas últimas requieren de un procesamiento adecuado de los residuos peligrosos. La fijación en formol al 4% permite el uso de posteriores técnicas de inmunohistoquímica y moleculares [2]. Posteriormente a la fijación en formol la muestra se debe decalcificar (EDTA, mezclas de formol y ácido fórmico, etc.) e incluir en parafina.

Las secciones del bloque de parafina se deben teñir con HE (secciones seriadas) y reticulina por defecto [2]. La tinción de Giemsa puede ser de utilidad en determinadas circunstancias, así como el PAS y tinciones de hierro (Perls). El panel de inmunohistoquímica se debe solicitar en función de la sospecha basada en el análisis morfológico.

## **ASPIRADO DE MEDULA ÓSEA**

La muestra de aspirado de MO es útil para análisis morfológico, citometría de flujo, inmunocitoquímica, citogenética convencional, FISH y PCR. La muestra obtenida se puede procesar en fresco en medio anticoagulante o bien fijar en formol tamponado y generar posteriormente un bloque tras FFIP (fijación en formol e inclusión en parafina).

## **PIEZA DE ESPLENECTOMÍA**

La esplenectomía diagnóstica es una técnica en desuso en la actualidad debido a la mejora en las técnicas de caracterización fenotípica de las poblaciones linfoides en SP y MO. No obstante, existe un subgrupo de pacientes que son sometidos a esplenectomías diagnósticas-terapéuticas en el contexto

de enfermedades hematológicas. El procesamiento de la pieza de esplenectomía es equivalente al de la biopsia escisional de ganglio linfático. Se recomienda aislar de entrada áreas representativas del parénquima esplénico y ganglio linfático hiliar de 2 mm de grosor para asegurar una fijación óptima de la muestra.

## RECOMENDACIONES

1. Bajo ningún concepto debe utilizarse la PAAF (Punción-aspiración con aguja fina) para el diagnóstico inicial de un paciente con adenopatías de posible origen neoplásico linfoide (el rendimiento diagnóstico es muy bajo y existe riesgo de desvirtuar una muestra necesaria para una biopsia posterior). No obstante, puede ser suficiente para establecer un diagnóstico de recidiva (Grado C, nivel de evidencia IV).
2. La biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto es el método de elección para el diagnóstico inicial de los casos con sospecha de proceso linfoproliferativo. En los casos en que por la situación clínica del paciente se realice una BAG (Biopsia con aguja gruesa) el estudio de la muestra de BAG debe incluir siempre, además del estudio morfológico, técnicas auxiliares (citometría de flujo, inmunohistoquímica, análisis de reordenamientos mediante FISH y, en situaciones concretas, análisis de clonalidad linfoide B y T) (Grado C, nivel de evidencia IV).
3. En todos los casos, la muestra debe acompañarse de una hoja de solicitud de estudio anatomopatológico con la sospecha diagnóstica, el origen de la muestra, los datos clínicos y de laboratorio relevantes y la hora de extracción (Grado C, nivel de evidencia IV).
4. La muestra de tejido será idealmente remitida en fresco inmediatamente al laboratorio de anatomía patológica donde el patólogo se encargará de procesar y derivar con carácter urgente a los laboratorios pertinentes para los estudios especiales. (Grado C, nivel de evidencia IV).
5. Las muestras de biopsia incisional/escisional así como BAG destinadas a estudio histopatológico se deben fijar en formol tamponado que permite la realización posterior de estudios morfológicos, fenotípicos, de hibridación in situ y moleculares. (Grado C, nivel de evidencia IV).
6. Si se dispone de una cantidad de tejido limitada se debe priorizar el análisis morfológico y fenotípico básico a las técnicas de análisis citogenético (FISH) o molecular o inclusión de muestra en biobanco. (Grado C, nivel de evidencia IV).
7. El estudio citogenético de elección en muestras de tejido o improntas es FISH. (Grado C, nivel de evidencia IV).
8. En la mayoría de los casos de proceso linfoproliferativo (aquellos de localización ganglionar o visceral/ósea) las muestras obtenidas de médula ósea (aspirado o cilindro de médula ósea de cresta ilíaca) no son suficientes para el diagnóstico inicial de proceso linfoproliferativo y es preciso obtener una muestra de la localización primaria de la neoplasia. (Grado C, nivel de evidencia IV).
9. Se debe realizar una biopsia de médula ósea de estadiaje en todos los casos con diagnóstico de proceso linfoproliferativo de localización ganglionar o visceral. (Grado C, nivel de evidencia IV).
10. La biopsia-cilindro de médula ósea debe contener al menos 7 espacios intertrabeculares, con una longitud aproximada de 1,5 cm. (Grado C, nivel de evidencia IV).

## Bibliografía

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375-90.
3. Parker A, BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. *Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting*. 2012.
4. Hehn ST, Grogan TM, Miller TP. Utility of fine-needle aspiration as a diagnostic technique in lymphoma. *J Clin Oncol*. 2004 Aug;22(15):3046-52.
5. Meda BA, Buss DH, Woodruff RD, Cappellari JO, Rainer RO, Powell BL, et al. Diagnosis and subclassification of primary and recurrent lymphoma. The usefulness and limitations of combined fine-needle aspiration cytomorphology and flow cytometry. *Am J Clin Pathol*. 2000 May;113(5):688-99.
6. Dong HY, Harris NL, Preffer FI, Pitman MB. Fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis and classification of primary and recurrent lymphoma: a retrospective analysis of the utility of cytomorphology and flow cytometry. *Mod Pathol*. 2001 May;14(5):472-81.
7. Jeffers MD, Milton J, Herriot R, McKean M. Fine needle aspiration cytology in the investigation on non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol*. 1998 Mar;51(3):189-96.
8. Zeppa P, Marino G, Troncone G, Fulciniti F, De Renzo A, Picardi M, et al. Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification of non-Hodgkin lymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestions. *Cancer*. 2004 Feb;102(1):55-65.
9. Hussong JW, Arber DA, Bradley KT, Brown MS, Chang CC, de Baca ME, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with non-Hodgkin lymphoma/lymphoid neoplasms. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Jun;134(6):e40-7.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Estudio histopatológico de tejidos hematolinfoides

**Máximo Fraga**

*maximo.fraga@usc.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela.*

## INTRODUCCIÓN

Como en cualquier otro campo de la patología, un examen histopatológico sistemático del tejido, usualmente teñido con hematoxilina y eosina, resulta clave para la elaboración de un diagnóstico diferencial adecuado. En algunos casos permite por sí solo emitir un diagnóstico, aunque suelen ser necesarios estudios adicionales, especialmente en el caso de patología neoplásica. Como siempre, es esencial para la correcta orientación diagnóstica el conocimiento del contexto clínico del paciente.

El estudio histopatológico requiere el conocimiento de los compartimentos normales y su composición celular, a fin de valorar primero la arquitectura, para obtener una impresión general y, posteriormente, analizar las características celulares. Por ello, en este capítulo revisaremos brevemente los compartimentos que deben ser examinados de forma sistemática durante el estudio histopatológico de ganglio linfático, bazo y médula ósea. Si el resultado orienta con mayor o menor probabilidad hacia una neoplasia linfoide, pueden consultarse los capítulos de esta guía dedicados a criterios diagnósticos específicos y diferenciales de las diversas entidades.

## GANGLIO LINFÁTICO

El examen de las preparaciones sin microscopio puede ofrecer ya algunas pistas que nos guíen en el estudio microscópico posterior, tales como si el ganglio se encuentra agrandado, si la apariencia es uniforme o heterogénea, si se observan nódulos de tamaño desproporcionado, si la coloración es monótona o existen áreas diferentes, etc.

Una vez al microscopio, se debe explorar la totalidad de la estructura del ganglio, preferiblemente con un objetivo de bajo aumento tipo 2x. Veremos si la arquitectura se encuentra conservada o si, por el contrario, existe un borramiento difuso o una alteración focal de la misma. Posteriormente, con mayor aumento, atenderemos a aquellas áreas en que encontremos algo llamativo o anormal y revisaremos el resto de compartimentos ganglionares. Debemos ir consignando las alteraciones que encontremos porque nos servirán de ayuda para la elaboración del diagnóstico.

De forma sistematizada, los compartimentos que debemos evaluar son:

### **Tejido periganglionar y cápsula del ganglio linfático.**

Se debe examinar el tejido periganglionar, por si existiese infiltración del mismo por alguna proliferación linfoide u otro tipo de proceso. También la cápsula, que debe ser fina y uniforme, debe ser examinada para descartar cualquier proceso infiltrativo, engrosamientos, prolongaciones fibrosas hacia el interior del ganglio, etc.

### **Folículos linfoides.**

Podemos observar folículos primarios, en forma de nódulos densos constituidos por linfocitos pequeños del tipo de la zona del manto, y/o folículos secundarios, con centros germinales rodeados por un anillo de células del manto. Los centros germinales pueden aparecer hiperplásicos o, por el contrario, involucionados o regresivos. Hay que prestar atención a la composición celular de los mismos, que ha de ser polimorfa (centrocitos, centroblastos, macrófagos con cuerpos tingibles...), así como a la existencia o no de polarización, etc.; este tipo de características ayudan a distinguir hiperplasias de linfomas foliculares. En diferentes situaciones patológicas, la zona del manto puede estar expandida, atenuada. Con respecto a la zona marginal, en condiciones normales solo está presente en el bazo y en ganglios mesentéricos, por lo que en ganglios periféricos su existencia siempre indica alguna alteración, ya sea de tipo reactivo o neoplásico.

### **Área paracortical o interfolicular.**

Se trata de un área heterogénea, con abundantes linfocitos pequeños, linfocitos transformados más grandes, generalmente dispersos, y células dendríticas, entre otros componentes. Puede estar expandida en reacciones de tipo inmunoblástico y en linfomas, especialmente de fenotipo T.

### **Senos linfáticos.**

En ocasiones aparecen prominentes, como cuando se encuentran ocupados por células que pueden ser de muy diferente naturaleza: macrófagos, células metastásicas, células neoplásicas de un linfoma anaplásico de células grandes, etc. Otras veces prácticamente no se aprecian: ganglios inactivos, ganglios en los que el crecimiento de un linfoma comprime los senos, etc.

## **BAZO**

El tejido esplénico se compone de pulpa blanca, constituida por folículos linfoides y vainas linfoides periarteriolas, y pulpa roja, ricamente vascularizada. El patrón de afectación esplénico por procesos proliferativos o infiltrativos puede ser difuso o focal:

- a. Con respecto al patrón difuso, algunos procesos asientan preferentemente sobre la pulpa blanca y otros sobre la pulpa roja. En el primer caso se trata fundamentalmente de hiperplasias, linfomas B de células pequeñas y linfomas T, que producen expansiones nodulares que pueden llegar a confluir. Cuando la afectación predominante es en la pulpa roja, en casos benignos esto puede responder a congestión inespecífica, anemias hemolíticas, hematopoyesis extramedular, enfermedades de almacenamiento lisosómico, etc.; en caso de malignidad, son ejemplos característicos de afectación de pulpa roja la tricoleucemia y el linfoma T hepatoesplénico, entre otros.
- b. La afectación focal del bazo puede estar en relación con alteraciones de tipo muy variado, tanto benignas como malignas: pseudotumores inflamatorios, quistes, linfoma de



Hodgkin, linfoma B difuso de células grandes, tumores de células foliculares dendríticas, etc.

## MÉDULA ÓSEA

En la biopsia de médula ósea se deben valorar la proporción, el grado de maduración y la topografía de las series hematopoyéticas. También se debe prestar atención al estroma: presencia o no de fibrosis, senos dilatados, ocupación sinusal por células neoplásicas, agregados o nódulos linfoides.

En el caso de las proliferaciones linfoides, el reconocimiento del patrón de infiltración medular ayuda en el diagnóstico diferencial y puede aportar información pronóstica. Habitualmente se describen 5 patrones: intersticial, nodular o focal aleatorio, paratrabecular, intrasinusoidal y difuso. Ninguno de ellos es específico de un tipo de linfoma, pero algunos sí son muy característicos, como la infiltración paratrabecular en el linfoma folicular y la infiltración intrasinusoidal en el linfoma esplénico de la zona marginal.

## Bibliografía

1. Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martínez L. Hematopathology. Second Edition. Saunders, 2017. O'Malley DP, George TI, Orazzi A, Abbondanzo SL. Benign and Reactive Conditions of Lymph Node and Spleen. AFIP Atlas of Nontumor Pathology, Vol. 7. American Registry of Pathology, 2009.
2. Wilkins BS. Pitfalls in bone marrow pathology: avoiding errors in bone marrow trephine biopsy diagnosis. J Clin Pathol. 2011; 64(5): 380-6.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Estudio inmunohistoquímico. Aplicación del inmunofenotipado de neoplasias linfoides

**Antonio Martínez**

*antonmar@clinic.cat*

*Unidad de Hematopatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic, Barcelona.*

## INTRODUCCIÓN

La clasificación de las neoplasias linfoides se basa en tres pilares: la morfología, las alteraciones genéticas y el fenotipo. El fenotipado puede realizarse actualmente mediante citometría de flujo y técnicas de inmunohistoquímica sobre secciones de tejidos. La disponibilidad de un citómetro de flujo en muchos de los laboratorios de hematología hace esta primera opción especialmente interesante en nuestros días. El diagnóstico de la patología mielóide, por ejemplo, se realiza básicamente por medio de la citometría de flujo puesto que ofrece un resultado más rápido y amplio que el fenotipo del tejido. Tras convertir el tejido de la biopsia en una suspensión celular, se puede proceder a su estudio con los mismos protocolos con los que se analizan los síndromes linfoproliferativos en sangre periférica. En ocasiones, especialmente en biopsias pequeñas, puede optimizarse la rentabilidad del estudio realizando éste sobre el medio de transporte líquido de la biopsia (suero fisiológico, medio de cultivo o PBS) especialmente en linfomas muy agresivos como el linfoma de Burkitt. Esta técnica permite un diagnóstico rápido en pocas horas y es el complemento ideal del fenotipado de líquidos biológicos (derrames o líquido cefalorraquídeo o incluso citologías vítreas). No obstante, en la mayoría de los casos la citometría será una técnica complementaria a la inmunohistoquímica y nunca la debe suplir. El fenotipado sobre secciones de tejido tiene el poder adicional de preservar la inmunoarquitectura del tejido. La expresión de Bcl2 en un centro germinal tiene el valor diagnóstico de neoplasia del que carece la expresión en la zona del manto o la zona marginal. Además nos permite reconocer el tipo celular donde se observa la expresión, por ejemplo, la expresión de ciclina D1 en un macrófago tisular es fisiológica mientras que la expresión en una célula linfóide es indicativa de neoplasia. Lo mismo sucede con el compartimento subcelular donde se observa la expresión. La presencia de ALK en diferentes compartimentos celulares permite inferir el tipo de translocación asociada al linfoma anaplásico: nuclear y citoplasmática en la translocación t(2;5) NPM-ALK o la vesicular citoplasmática en Clatrina-ALK.

El fenotipado sobre secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina no es ya un desafío. Las modernas técnicas de recuperación antigénica se han estandarizado entorno a tres grandes grupos: las técnicas de calor con buffer de pH ácido, con pH alcalino y la digestión enzimática. En la actualidad existen plataformas totalmente automatizadas que permiten la realización de protocolos individualizados sobre cada sección de tejido para caracterizar la expresión de antígenos mediante inmunohistoquímica. Además, los sistemas actuales de amplificación de señal basados en polímeros,

así como la presencia de diferentes enzimas y sustratos, han permitido la expansión de técnicas de marcaje múltiple inmunohistoquímico así como de combinación de protocolos de inmunohistoquímica e hibridación in situ.

En los siguientes apartados resumiremos las principales indicaciones de las técnicas de inmunohistoquímica en el diagnóstico de neoplasias linfoides.

### **ESTUDIO DE INMUNOGLOBULINAS COMO MARCADOR DE CLONALIDAD.**

Una de las aplicaciones más útiles de las técnicas de inmunohistoquímica es la demostración de expresión de cadenas ligeras citoplasmáticas como marcador de clonalidad. Todas las células linfoides B neoplásicas muestran, salvo pocas excepciones, expresión en superficie de un receptor. Este receptor es una inmunoglobulina convenientemente modificada para dirigirse a la membrana citoplasmática. De forma similar a nuestros anticuerpos del suero, la inmunoglobulina como receptor consta de dos cadenas pesadas (una de cualquiera de las siguientes; IgA, IgD, IgG, IgM e IgE) y dos cadenas ligeras (kappa o lambda) apropiadamente ensambladas. En condiciones fisiológicas el proceso de exclusión alélica selecciona en cada célula una única forma de cadena ligera, kappa o lambda. En la sangre de forma fisiológica, se encuentran un 60% de linfocitos B kappa y un 40% lambda. La detección en un tejido de una población exclusiva o dominante con expresión de únicamente de una de estas cadenas es altamente sugestivo de clonalidad y por ende de neoplasia. A esta situación la denominamos restricción de cadenas ligeras. La cantidad de expresión de estas cadenas en un linfoma B de bajo grado es muy baja, y la técnica tiene que estar bien optimizada. La mayor parte de protocolos recomiendan una alta dilución de anticuerpos policlonales que reconozcan cada una de las cadenas tras una conveniente recuperación antigénica con tampones de bajo pH. Por otro lado, la expresión intensa de cadenas citoplasmáticas se observa en linfomas con diferenciación plasmocelular y transformación secretora, además de en neoplasias de células plasmáticas. Por otro lado, la expresión de cadenas ligeras es un argumento sólido para la identificación de la línea B de una neoplasia cuando otros marcadores son negativos (ver más adelante).

De otra forma, las cadenas pesadas son útiles en inmunohistoquímica de procesos linfoproliferativos B. La mayor parte de los linfomas son positivos de forma variable para IgM e IgD. No obstante, IgD es muy útil en la identificación de los mantos foliculares fisiológicos y por ende, en el reconocimiento del patrón infiltrativo de la neoplasia. Además, la positividad casi exclusiva de IgD es característica de los linfomas de zona marginal esplénicos. IgM identifica los plasmablastos del Castleman multicéntrico y es el subtipo de cadena pesada en el linfoma linfoplasmacítico cuando este se presenta como enfermedad de Waldstrom. Otros subtipos son característicos de procesos específicos, como IgA, que se expresa en linfomas foliculares primarios duodenales o IgG que se expresa de forma característica en la tricoleucemia. La expresión de IgG es también útil en el diagnóstico de la forma primaria cutánea del linfoma de zona marginal, y la expresión de IgG4 de algunos linfomas de zona marginal de glándulas salivales además del síndrome sistémico esclerosante IgG4.

### **DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS LINFOIDES B AGRESIVAS**

El diagnóstico de las neoplasias agresivas se basa fundamentalmente en criterios clinicopatológicos fácilmente reconocibles como el crecimiento destructivo del tejido donde se asienta la lesión, el elevado índice mitótico y/o apoptótico (como el «cielo estrellado» del linfoma de Burkitt), la presencia de células grandes y por supuesto la presencia de algunos parámetros clínicos de agresividad (LDH altas, masas grandes tumorales, presencia de anemia severa o la hipercaptación del PET). En esta situación el inmunofenotipo ayuda a definir la línea linfoide B versus T y otras (Hodgkin, mieloide o histiocítico/dendrítico, ver más adelante). La utilización de un único marcador pan B y pan T en estos casos puede ser muy engañosa. Algunos linfomas agresivos B pueden ser negativos para CD20, como el linfoma plasmablastico, y otros, como el linfoma difuso de células grandes de tipo

activado puede perder la expresión de CD79a. En algunos casos, un linfoma T periférico puede expresar CD20 y CD79a, pero raramente otros marcadores disponibles en la actualidad para identificar células B como PAX5, CD19 o CD22. Además, la expresión de cadenas ligeras puede usarse como un potente argumento a favor de la identificación de la estirpe B de la neoplasia. Por otro lado, en este grupo heterogéneo de neoplasias linfoides se han descrito numerosos marcadores pronósticos que permiten estratificar en grupos de riesgo a los pacientes. La diferenciación centrogerminal en un linfoma difuso de células grandes, se asocia a un mejor pronóstico, probablemente, porque en ese momento del desarrollo, su contrapartida no neoplásica es extraordinariamente sensible al microambiente que en todo momento controla su capacidad de proliferación. Por ello en los últimos años han aparecido un sinnúmero de marcadores que reflejan este momento de diferenciación, algunos de los cuales son altamente recomendables en la práctica clínica: CD10, Bcl6, IRF4, HGAL y LMO2 son algunos de los mejor caracterizados. La presencia de un fenotipo clásico de centrogerminal normal, positividad para marcadores de centrogerminal y negatividad para Bcl2 es muy útil en el diagnóstico diferencial entre la hiperplasia folicular, siempre negativa para Bcl2 y el linfoma folicular, usualmente positivo. No obstante, algunos tumores agresivos como el linfoma de Burkitt imitan este fenotipo.

### **DIAGNÓSTICO DE PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS DE CÉLULAS PEQUEÑAS**

En el caso de los linfomas de células pequeñas B, algunas entidades tienen un inmunofenotipo muy característico que permite establecer el diagnóstico casi con total seguridad basado en el inmunofenotipo. Así, el linfoma folicular tiene un fenotipo característico con positividad para CD10, Bcl6 y Bcl2. El linfoma de células del manto expresa CD5 y ciclina D1, mientras que el linfoma linfocítico expresa CD5 y CD23, pero no ciclina D1. El estudio de cadenas ligeras por inmunohistoquímica en los linfomas de bajo grado es de menor utilidad que en los de alto grado, por el menor nivel de expresión que hace que estas sean raramente detectables en secciones de tejido parafinado a excepción del linfoma de zona marginal o del linfoma linfoplasmacítico en las que de forma constante se observa una marcada diferenciación secretora en el tumor.

### **DIAGNÓSTICO DE PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS DE LINFOCITOS T, T/NK Y NK**

A diferencia de las neoplasias de linfocitos B, este grupo heterogéneo de tumores no dispone de marcadores inmunofenotípicos de clonalidad, apenas existen perfiles fenotípicos específicos de una única entidad tumoral y el diagnóstico de la entidad requiere un panel amplio de marcadores que no están al alcance de todas las unidades de diagnóstico.

La expresión de la kinasa ALK1 por inmunohistoquímica en un linfoma T es característica del linfoma T anaplásico (expresándose también en los linfomas B de célula grande ALK positivos y casos de carcinomas de pulmón y tumores miofibroblásticos inflamatorios). No obstante, a veces el fenotipo T no resulta evidente y requiere el estudio de reordenamientos del receptor antigénico de las células T para establecer la línea de la neoplasia.

CD2, el antiguo receptor implicado en las rosetas con eritrocitos de carnero, es un marcador de línea T poco usado en inmunohistoquímica que tiene unos resultados muy buenos en tejido fijado en formol y parafinado. El panel debe completarse con CD3, CD5, y CD7, éste último perdido en una buena proporción de linfomas T. La pérdida de CD5 y CD3, son sugestivas de derivación T/NK, NK. No obstante, el CD3 citoplasmático puede estar expresado en células NK.

### **Ki67**

Ki-67 es un antígeno nuclear presente en todas las células proliferantes que se encuentran en la fase activa del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) y ausente en G0. Es un marcador ampliamente

utilizado en diversas subdisciplinas de la patología, en combinación con otros marcadores puede ayudar a decantar el diagnóstico a favor de benignidad o malignidad en algunos casos.

En el campo de la hematopatología tiene dos grandes utilidades. Por un lado permite ver cuál es el compartimento linfoide que está proliferando y cuál es la distribución de la proliferación; heterogénea u homogénea. Por ejemplo en el diagnóstico diferencial entre un linfoma de la zona marginal y un linfoma folicular. En el caso del primero esperamos una distribución parcheada (colonización) mientras que en el linfoma folicular de bajo grado esperamos una distribución más homogénea. En algunos casos, como en el linfoma de células del manto, es un marcador pronóstico que es capaz de reflejar una compleja firma molecular de proliferación. Por otro lado, dado que realza los nucléolos y tiñe toda la masa nuclear, puede ser de ayuda en casos en que la morfología es pobre, para establecer el diagnóstico de alto o bajo grado, como en el caso del linfoma folicular.

## FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

En los últimos años se ha ampliado el número de marcadores que podemos utilizar en la rutina diagnóstica. Estos además han pasado de corresponder únicamente a proteínas de membrana y se han desarrollado anticuerpos para algunos factores de transcripción, con tinción nuclear que nos permiten caracterizar las poblaciones linfoides en su proceso madurativo.

### Pax-5

Es un factor de transcripción implicado en la diferenciación de la célula B, cuya expresión se extingue al entrar la célula en la fase terminal de diferenciación. Se utiliza para demostrar la línea B de las células y se expresa de forma débil en las células de Reed-Stenberg y Hodgkin. Fuera del sistema hematolinfoide se expresa en tumores neuroendocrinos principalmente pulmonares y muestra reacción cruzada con Pax-8.

### IRF4/MUM-1

Multiple myeloma oncogene-1 (MUM-1) pertenece a la familia de IRF-4. Es un factor de transcripción involucrado en el desarrollo de células B, T y en la diferenciación plasmocelular. Se usa para identificar un subtipo de linfomas difusos de célula grande de fenotipo activado, en combinación con CD10 y Bcl-6. Es positivo también en linfocitos T activados, en un subgrupo de células B del centrogerminal y en las células de Reed-Stenberg del linfoma de Hodgkin.

### Bcl-6

Es un factor de transcripción implicado en la diferenciación en la célula B. La supresión de su expresión es fundamental para la diferenciación plasmocelular. Se utiliza para identificar células centrogerminales así como sus contrapartidas neoplásicas. Se expresa por tanto en linfoma folicular, un subgrupo de linfomas difusos de célula grande y en linfoma de Burkitt.

## DIANAS TERAPÉUTICAS

Desde hace más de 15 años, algunos de los antígenos que utilizamos en el diagnóstico de las neoplasias linfoides se han convertido en dianas terapéuticas de uso en el tratamiento de estos pacientes en combinación con quimioterapia. Muchos de estas dianas pueden estudiarse fácilmente por inmunohistoquímica en biopsias de rutina.

## **CD20**

Se trata de una fosfoproteína no glicosilada de membrana, involucrada en la regulación de la célula B. Se usa como marcador de primera línea para definir la línea B. Su expresión se pierde en el proceso de maduración terminal de la célula B.

El desarrollo de un anticuerpo monoclonal (rituximab) dirigido contra el CD20 ha puesto de manifiesto la necesidad de la estandarización en la interpretación de la inmunohistoquímica y por otro lado la necesidad de utilizar marcadores de línea B alternativos en los casos de recaídas de pacientes tratados con inmunoterapia previa (rituximab).

## **CD30**

La inmunoterapia con el anticuerpo conjugado anti-CD30 (brentuximab vedotina) se ha estudiado en pacientes con linfoma Hodgkin y no Hodgkin CD30+ refractarios o en recaída. Brentuximab vedotina está aprobado para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma Hodgkin CD30+ en recaída o refractario, después de trasplante autólogo o tras al menos dos líneas previas de tratamiento, y también para pacientes adultos con linfoma T anaplásico de células grandes sistémico en recaída o refractario.

## **CD 52**

Es una glicoproteína presente en la superficie de linfocitos maduros, monocitos y células dendríticas. Alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD52. Esta terapia se ha usado en los últimos años en el tratamiento de la leucemia linfática crónica, entre otros.

## **MARCADORES PRONÓSTICOS**

### **P53**

La mutación de p53 es uno de los factores de mal pronóstico más robustos en pacientes con leucemia linfática crónica que reciben tratamiento estándar de primera línea, teniendo impacto tanto en la supervivencia libre de enfermedad como en supervivencia global. Es además una alteración genética secundaria común en progresión/transformación de linfomas de bajo grado a linfoma B de célula grande.

### **Zap-70**

Esta proteína se expresa de forma fisiológica en linfocitos T y no en células B. Sin embargo estudios de expresión génica identificaron su expresión en leucemia linfática crónica y además su expresión correlaciona con el estado mutacional de las inmunoglobulinas, y por tanto tiene impacto pronóstico. Los casos positivos para Zap-70 tienden a ser no mutados y tener peor pronóstico. La expresión de Zap-70 puede valorarse por citometría de flujo y también por inmunohistoquímica en material parafinado.

### **MYC**

La translocación de MYC con el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (y en algunos casos con la cadena ligera) es la alteración genética característica del linfoma de Burkitt. Sin embargo esta alteración citogenética se ha descrito en otros linfomas que no cumplen criterios de Burkitt y

muestran cariotipos más complejos; por ejemplo los llamados linfomas «*double hit*» u otros linfomas difusos de célula grande B. Los resultados publicados sugieren que la presencia de la translocación podría conferir mayor agresividad a estos tumores y podrían ser subsidiarios de regímenes terapéuticos alternativos. Actualmente existe un anticuerpo capaz de reconocer la expresión nuclear de MYC y que podría ser utilizado como cribado inicial para seleccionar los casos con alteraciones de MYC.

## CONTROL DE CALIDAD

Todas las determinaciones analíticas del laboratorio, en especial las técnicas de inmunohistoquímica, deberían estar sometidas a un control de calidad interno y externo. El uso de controles internos es especialmente necesario para aquellos marcadores que no muestran control intrínseco en el tejido estudiado, como es ALK. Para el resto, el tejido estudiado suele contener control intrínseco, por ejemplo células del microambiente tumoral, que ayudan a discernir cuando un estudio es negativo o no valorable. No obstante, la participación en programas externos de garantía de la calidad, como el programa GCP de la SEAP, u otros como el UKNEQAS o NordiQC que permiten mantener nuestro nivel de sensibilidad y especificidad y detectar alteraciones de la normalidad antes que se produzca un error diagnóstico basado en evidencias erróneas.

Algunos programas de control de calidad como el GCP ([www.seap.es/calidad](http://www.seap.es/calidad)), permiten acceso a los mejores protocolos actualizados para cada marcador y pueden ser útiles a la hora de tomar decisiones cuando ponemos a punto un nuevo marcador en el laboratorio.

Los autores desean agradecer a Olga Balagué y Blanca González su colaboración en este capítulo.

## Bibliografía

1. [www.e-immunohistochemistry.info](http://www.e-immunohistochemistry.info)
2. [www.seap.es/calidad](http://www.seap.es/calidad)
3. [www.nordiqc.org](http://www.nordiqc.org)
4. [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)
5. [http://www.ihcworld.com/general\\_IHC.htm](http://www.ihcworld.com/general_IHC.htm)



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Estudio citogenético-FISH

**Ana Batlle**

*anabattlelopez@gmail.com*

*Unidad de Citogenética Hematológica, Servicio de Hematología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

## INTRODUCCIÓN

La citogenética es la parte de la genética que estudia la apariencia microscópica de los cromosomas y sus anomalías en la enfermedad.

El conjunto de técnicas citogenéticas ha sido y continúa siendo clave para la correcta orientación terapéutica de pacientes onco-hematológicos. Esta tecnología ha permitido detectar que determinadas entidades clínicas están en realidad compuestas por múltiples enfermedades distintas no sólo desde el punto de vista molecular sino también clínico. Esto se debe, a que existen reordenamientos genéticos y alteraciones cromosómicas recurrentes asociados con frecuencia a subtipos tumorales específicos, ayudando a establecer el diagnóstico en pacientes en los que no ha podido ser establecido por otras metodologías. Por otro lado, las alteraciones citogenéticas contribuyen decisivamente en muchos casos a establecer el pronóstico de la enfermedad e incluso determinan el tipo de tratamiento a utilizar.

La citogenética junto con biología molecular, además, constituyen en estos momentos unos de los parámetros más importantes para la correcta monitorización de la mayoría de las enfermedades hematológicas.

## CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

**Definición:** Estudio de las anomalías cromosómicas en las metafases de las células neoplásicas, obtenidas de distintos tipos de muestras biológicas (ganglios linfáticos, médula ósea, sangre periférica, líquido ascítico, líquido pleural, etc.). Para la obtención de metafases con frecuencia se requiere cultivar las células *in vitro* con/sin la adición de estimulantes específicos (tabla 1). Una vez extraída la muestra en tubo de heparina sódica o (en su defecto de litio) sin gel, debe remitirse rápidamente a temperatura ambiente al laboratorio de citogenética siempre que sea posible cultivarse el mismo día. Si no es posible deben mantenerse a 4°C durante 24-48 horas como máximo.

**Tabla 1.** \*Sólo se realizará el estudio citogenético si existe infiltración por células neoplásicas detectada por citometría de flujo/morfología. Dado que en ocasiones el resultado de la citometría-morfología puede no estar disponible el mismo día de la recepción de la muestra, se recomienda procesar la muestra, cultivarla y fijarla. El estudio de las metafases se puede posponer hasta conocer si

existe infiltración en la muestra. T: tejido; las células se obtienen por disrupción mecánica. TPA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate; PHA: phytohemagglutinin. SP: sangre periférica, MO: médula ósea.

Orientación diagnóstica	Tipo de muestra	Mitógeno	Horas de cultivo
Neoplasias linfoides fenotipo B de bajo grado	SP*/MO*/T	TPA	72
Neoplasias linfoides de células maduras de fenotipo B de alto grado	SP*/MO*/T	PHA	Directo-24h
Linfoma Burkitt	SP*/MO*/T*	no	directo
Leucemia de células plasmáticas/mieloma múltiple	MO*/plasmocitoma	no	72
Neoplasias linfoides fenotipo T	SP*/MO*/T	PHA	72

**Técnica:** Tras el cultivo se realiza el procesamiento de la muestra, que consiste en la detención de la mitosis en metafase mediante la adición de colcemid, la disrupción de las membranas celulares para lo cual se somete a las células a un choque hipotónico y posteriormente se procede a la fijación de las células con una solución de metanol-acético (Carnoy).

Los pellets de células en Carnoy pueden conservarse en frío (idealmente 20º) durante años. Estos pellets de Carnoy pueden utilizarse para realizar tanto el estudio de citogenética convencional como el de hibridación in situ fluorescente. Por ello, en caso de que se desconozca si la muestra presenta o no infiltración tumoral en el momento en que se recibe en el laboratorio, se recomienda parar el procesamiento en este punto. Una vez confirmada la existencia de población patológica se continuará con el procesamiento, que en el caso del estudio citogenético consiste en extensión de las células en portaobjetos, tinción generalmente con bandas G, captura y análisis de 20 metafases y elaboración de la fórmula siguiendo la nomenclatura internacional (Nomenclatura Citogenética. «*An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013) (ISCN, 2013)*»)

Indicaciones del estudio de citogenética convencional en patología linfoide: Se recomienda hacer el estudio de citogenética convencional en caso de que se detecte población patológica por otros métodos (citometría de flujo en el caso de los estudios de médula ósea o sangre periférica o suspensión de células de tejido y/o morfología-inmunohistoquímica en caso de cortes de tejido) en:

- Siempre: Neoplasias de precursores linfoides para la correcta estratificación pronóstica-terapéutica
- Recomendable en cualquier neoplasia de células linfoides maduras, dado que puede proporcionar información en la orientación diagnóstica y terapéutica (identificación de dianas moleculares). En pacientes con sospecha de linfoma de Burkitt la presencia de un cariotipo complejo debe hacernos dudar de este diagnóstico.

## Ventajas y limitaciones del estudio de citogenética convencional

- VENTAJAS
  - Da información de todo el genoma.
  - Proporciona información global del genoma
  - Coste medio-bajo
- LIMITACIONES
  - Se necesitan metafases (células en división)
  - Se requiere buena calidad de las metafases para realizar un estudio citogenético concluyente.
  - No detecta cambios genéticos crípticos (<5Mb).
  - No permite la identificación de cromosomas marcadores y de las anomalías complejas.
  - Baja sensibilidad

## HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

**Definición:** Técnica que permite detectar/estudiar secuencias específicas de ADN sobre células o núcleos en metafase o interfase, permitiendo identificar determinadas anomalías numéricas y/o estructurales en las muestras analizadas. Se basa en la hibridación del genoma celular con sondas (oligonucleótidos de DNA o RNA) marcadas con fluorocromos por complementariedad de las bases nitrogenadas.

**Tipos de muestras:** Se puede realizar en una gran variedad de muestras:

- Pellets de carnoy procesados para el estudio citogenético,
- Sangre periférica (tanto en tubo de EDTA como de heparina sódica/litio)
- Médula ósea (tanto en tubo de EDTA como de heparina sódica/litio)
- Líquidos biológicos (ascítico, pleural, LCR, etc. que deben ser enviados en fresco lo antes posible al laboratorio, idealmente antes de que transcurran 6 horas desde su extracción)
- Frotis de sangre periférica (incluso previamente teñidos)
- Poblaciones separadas por métodos inmuno-magnéticos o de citometría (*sorter*). La separación de la población patológica permite incrementar la sensibilidad del estudio.
- Tejido:
  - **Tejido fijado en parafina o en muestras fijadas en formol;** los cortes deben de ser de 2-4 $\mu$ . Se debe indicar si la muestra procede de bloque de parafina o si ha sido fijada con formol, así como el tiempo que ha transcurrido desde su fijación, ya que el pretratamiento de la muestra puede variar en función de esas variables. El tiempo requerido de digestión proteica también varía en función del grosor del tejido, siendo en ocasiones necesario repetir el proceso en caso de hibridación fallida. El tiempo de digestión puede controlarse haciendo una visualización al microscopio. En aquellos casos en los que la infiltración sea parcheada, es importante que se delimiten claramente las áreas tumorales. El estudio sobre tejido fijado tiene la ventaja de permitir estudiar las anomalías manteniendo la estructura tumoral y se puede realizar con muestras pequeñas. Como desventaja tiene que se produce solapamiento de núcleos, que puede producir falsas imágenes de fusión y la existencia de núcleos incompletos, dos aspectos que explican que la sensibilidad de la técnica sea menor en este tipo de muestras (tabla 2)
  - **Improntas o mediante la obtención de las células en una suspensión por disrupción mecánica** (este procesamiento permite realizar a partir de la misma muestra el estudio de cariotipo y de FISH, siempre que exista celularidad suficiente). La realización del estudio en improntas o en células en suspensión tiene la ventaja de permitir el estudio sobre células completas sin superposición celular lo que aumenta notablemente la sensibilidad del estudio; tabla 2)

**Técnica:** la muestra de ADN (cromosomas metafásicos o núcleos en interfase) se desnaturaliza, proceso que separa las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del ADN. A la muestra desnaturalizada se le añade la sonda de interés, marcada con un fluoróforo, que se asociará al ADN de la muestra en el sitio diana, proceso denominado hibridación. La señal emitida por la sonda se observa mediante un microscopio de fluorescencia, siendo posible clasificar el patrón de ADN en función de la presencia o ausencia de la señal.

### Tipos de sondas:

**Sonda centromérica (CEP):** Las sondas CEP reconocen secuencias cromosoma-específicas de ADN satélite altamente repetido, normalmente localizado en la región centromérica del cromosoma. Estas sondas permiten la identificación y enumeración de cromosomas en células en interfase y en metafase. Existen sondas centroméricas de todos los cromosomas.

**Sondas específicas del locus:** Las sondas para la detección de deleciones son sondas específicas para el *locus* o región de deleción y suelen incluir una sonda control para la identificación exacta del cromosoma de interés. Ejemplo de estas sondas:

- LSI TP53 SpectrumOrange/ CEP 17 SpectrumGreen: Esta sonda permite estudiar la deleción del p53, anomalía que potencialmente puede encontrarse en cualquier tumor y cuya presencia suele condicionar un pronóstico muy desfavorable.

**Sondas Dual Color Dual fusion:** Las sondas *dual color dual fusion* emplean una sonda específica para cada uno de los loci involucrados en la translocación marcados con diferentes fluorocromos, de tal manera que la presencia de dicha translocación producirá una yuxtaposición de señales (roja y verde juntas o color amarillo) si existe reordenamiento. Debido a que en tejido existe gran superposición celular, las sondas *dual color dual fusion* presentan el inconveniente de poder dar lugar a falsos positivos por la colocalización de señales al azar en núcleos en interfase. Es por ello que en este tipo de muestras es preferible utilizar sondas *break apart*. Ejemplo de esta sonda:

- **LSI t(8;14)(q24;q32) [IgH-MYC]:** La t(8;14)(q24;q32) que se detecta en aproximadamente el 80% de los linfomas de Burkitt, conlleva la yuxtaposición del oncogén MYC (8q24) al gen de IgH (14q32). El método de elección para detectar este reordenamiento es la FISH debido a la variabilidad en los puntos de rotura.
- **LSI t(11;18)(q21;q21) [API2-MALT]:** Este reordenamiento es el más frecuentemente detectado en el linfoma MALT, sobre todo en los de afectación pulmonar y gástrica. En el linfoma MALT gástrico, esta translocación se asocia con falta de respuesta al tratamiento con antibióticos. El método de elección para detectar este reordenamiento es la FISH por requerir poca muestra, poder realizarse directamente sobre biopsias endoscópicas incluidas en parafina y sobre todo debido a la variabilidad en los puntos de rotura.
- **LSI t(11;14)(q13;q32) [IGH-CICLINA D1]:** Es el marcador genético característico del linfoma del manto, aunque puede encontrarse también en mielomas. La técnica de elección para detectar este reordenamiento es la técnica de FISH, ya que por PCR sólo se detecta la mitad de los casos debido a la gran variabilidad de los puntos de ruptura.
- **LSI t(14;18)(q32;q21) [IGH-BCL2]:** Se encuentra en alrededor del 90% de los linfomas foliculares, en aproximadamente el 30% de los linfomas B difusos de células grandes y también se detecta en un porcentaje variable de linfomas de características intermedias entre LBDCG y LB. Los puntos de ruptura del gen BCL2 se ubican generalmente en dos regiones clásicas, el MBR («*major breakpoint region*») o, más raramente, MCR («*minor cluster region*»). Sin embargo, en un 30-40% de los casos de linfoma folicular el punto de rotura se sitúa en otras regiones. Debido a la variabilidad en los puntos de ruptura el método de elección para el diagnóstico es la FISH.

**Sondas *break apart*:** Las sondas «*split*», van dirigidas contra regiones que flanquean el punto de rotura de un mismo gen; por tanto, en núcleos normales las señales se yuxtaponen, mientras que aparecen señales separadas en núcleos que portan alguna translocación que afecte dicho gen. Como inconveniente, este tipo de sondas no permiten conocer que otro gen está involucrado en la traslocación. Las sondas «*split*» son muy útiles para el estudio de translocaciones en los que los genes diana presentan múltiples posibles «*partners*». Ejemplos de estas sondas:

- **LSI MYC Dual Color Break Apart:** esta sonda permite evaluar la existencia de reordenamiento del gen MYC independientemente del «*partner*». MYC se encuentra reordenado en  $\approx 100\%$  de los linfomas de Burkitt (aunque se han descrito falsos negativos en torno al 5% mediante técnica de FISH con sondas de tipo BA). También se encuentra reordenado en otros tipos de neoplasias linfoides B maduras, (linfomas B de alto grado DH/TH/NOS, Leucemia linfática crónica/linfoma linfocítico, LBDCG, Linfoma plasmablasto, etc) generalmente implicando un pronóstico desfavorable. El *partner* del reordenamiento es usualmente IgH, IgK o IgL y el reordenamiento con otros genes puede tener menor relevancia pronóstica, al menos en los casos de LBDCG.
- **LSI BCL6 Dual Color Break Apart:** El gen BCL6 se encuentra fundamentalmente reordenado en 30-40% de los LBDCG, en algunos linfomas B de alto grado DH/TH/NOS (generalmente asociado a reordenamientos del gen MYC y/o BCL2) y en algunos linfomas foliculares. Se han descrito una gran cantidad de «*partners*» diferentes, por lo que el método de elección para su detección es la FISH, utilizando esta sonda de tipo «*split*»
- **LSI ALK Break apart:** Este reordenamiento permite detectar reordenamientos del gen ALK, detectados en algunos tipos de linfomas anaplásicos, y en linfoma «*ALK-positive large B cell Lymphoma*». La identificación de esta anomalía es de especial interés debido a que existen en la actualidad inhibidores frente al ALK que están en fase de ensayo clínico.
- **LSI BCL2:** Reordenamientos que implican a esta región se observan en varios tipos de linfomas, incluyendo el linfoma folicular. El reordenamiento del BCL2 es un parámetro importante para el diagnóstico diferencial de linfomas no – Hodgkin. Esta sonda permite detectar reordenamiento del gen BCL2, independientemente del «*partner* implicado». Es la sonda de elección en tejido y en casos de linfomas de características intermedias entre LBDCG y LB, ya que en éstos el «*partner*» con frecuencia no es la IGH
- **Otros ejemplos:** LSI IGH , LSI MALT, etc

### Ventajas y limitaciones del estudio de FISH

- VENTAJAS
  - Método rápido
  - Requiere poca celularidad (idealmente un mínimo de 100-200 núcleos)
  - Se puede realizar a partir de una gran variedad de muestras diferentes. Al igual que la PCR, la FISH se puede realizar sobre tejido fijado
  - A diferencia del cariotipo puede realizarse en núcleos interfásicos
  - Permite identificar reordenamientos crípticos o de difícil visualización en el cariotipo
  - Técnica de elección para la búsqueda de reordenamientos de genes «promiscuos» o con puntos de ruptura variables (frecuente en neoplasias linfoides maduras) o con patrones aberrantes
  - A diferencia de la PCR permite detectar ganancias o amplificaciones, alteraciones frecuentemente detectadas en linfomas (estas anomalías se visualizan más fácilmente en improntas ganglionares o en células en suspensión)
- LIMITACIONES
  - Requiere un microscopio de fluorescencia
  - Es un estudio dirigido
  - No da información de todo el genoma.
  - Coste intermedio

- Sensibilidad intermedia (dependiendo del tipo de sonda y del tipo de muestra)

**Tabla 2.** \*Los puntos de corte de cada sonda deben establecerse en cada laboratorio utilizando 10-20 muestras de individuos sanos.\*\* En linfomas el punto de corte es más alto debido a que la frecuencia de patrones aberrantes es muy elevado.

Tipo de sondas	Anomalía a estudio	Punto corte en células en suspensión	Punto corte en células en tejido
<b>Sonda centromérica (CEP)</b>	Monosomía	8-10%	25-50%
	Ganancias	1.5-2%	5-8%
<b>Sondas específicas de locus con control interno</b>	Delección	6-10%	25-50% (ratio R/G<0.9)
<b>Sondas dual color dual fusion</b>	Reordenamiento	0,5% (400 núcleos); 0,005% (6.000 núcleos)	10-20%**
<b>Sonda break apart</b>	Reordenamiento	1%(400 núcleos); 0,01% (6.000 núcleos)	8-10%**

**Indicaciones:** Se recomienda hacer el estudio de FISH sólo en caso de que se detecte población patológica por otros métodos (citometría de flujo en el caso de los estudios de médula ósea o sangre periférica o suspensión de células de tejido y/o inmunohistoquímica en caso de cortes de tejido) en un porcentaje suficiente de células como para ser detectado mediante técnica de FISH (tabla 2). Además, el panel de sondas a utilizar en cada caso dependerá del subtipo histológico (especificados en capítulos específicos).

Existen anomalías genéticas específicas concretas cuyo estudio se requiere para la adecuada orientación diagnóstica y/o pronóstica de los pacientes con neoplasias linfoides.

## OTRAS TÉCNICAS DE ESTUDIO CITOGÉNÉTICO

**Cariotipo multicolor:** técnica que consiste en marcar el ADN de un cromosoma con uno o varios fluorocromos, de tal forma que el espectro de emisión de cada cromosoma sea único. Cada cromosoma por tanto aparecerá de un color específico. No permite detectar delecciones, inversiones ni duplicaciones intracromosómicas. Es útil para identificar que cromosomas estén implicados en los cromosomas marcadores o en las traslocaciones cromosómicas. Requiere metafases. En el momento actual esta técnica sólo se utiliza en investigación.

**Hibridación genómica comparada:** Método de análisis de cambios en el número de copias (ganancias/pérdidas) en el contenido de ADN de un tejido con respecto a un ADN de referencia. Para ello primero se realiza la hibridación del ADN del tejido tumoral, generalmente utilizando sondas marcadas con FITC y del ADN normal marcado con Rodamina o Texas Red. Ambos ADNs se mezclan en cantidades equimolares y se realiza la hibridación sobre los *arrays*. Posteriormente se evalúan las diferencias regionales de fluorescencia, identificando regiones anormales del genoma utilizando

complejos sistemas informáticos. Existen diferentes tipos de *arrays*: los de BACs y los de oligonucleótidos. En la actualidad esta metodología se está incorporando a la rutina como complemento al cariotipo convencional. Es posible que en determinadas patologías esta técnica sustituya a la FISH.

## RECOMENDACIONES

1. El estudio de FISH es recomendable en todos los casos, siempre que exista muestra suficiente para contribuir a la orientación diagnóstica, pronóstica y terapéutica de los pacientes con neoplasias linfoides. Para entidades específicas (p ej. linfoma de Burkitt, Linfoma B de alto grado DH/TH) es un dato necesario al diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. El estudio de FISH deberá orientarse en función del diagnóstico histopatológico. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. En muestras de tejido, la sonda break-apart es la sonda de elección para estudiar reordenamientos, ya que las sondas *dual color dual fusion* tienen una alta tasa de falsos negativos y elevada variabilidad interobservador. Grado C. Evidencia nivel IV.
4. Se recomienda hacer el estudio de citogenética convencional en todo caso de neoplasias de precursores linfoides para la correcta estratificación pronóstica-terapéutica. En los casos de neoplasias linfoides maduras es deseable pero no estrictamente necesario. Grado C. Evidencia nivel IV.

## Bibliografía

1. Rowley JD. Cytogenetic analysis in leukemia and lymphoma: an introduction. *Semin Hematol.* 2000 Oct;37(4):315-9. Review
2. Nussbaum R, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine.* 7th edition. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2007.
3. Guía de recomendaciones para el diagnóstico genético y seguimiento de las neoplasias hematológicas, 2011. Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH) y el Grupo de Biología Molecular en Hematología (GBMH).
4. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M(eds). *ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* Basel:Karger; 2013.
5. Heim S, Mitelman F (eds). *Cancer Cytogenetics.* 3th edition. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2009.
6. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, Rao KW, Rao PN Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn.* 2007 Apr;9(2):134-43.
7. Schwaenen C1, Nessling M, Wessendorf S, Salvi T, Wrobel G, Radlwimmer B, Kestler HA, Haslinger C, Stilgenbauer S, Döhner H, Bentz M, Lichter P. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 27;101(4):1039-44
8. Swerdlow SH, Campos E, Harris LN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid Tissues.* 2008. ARC ISBN-13 9789283224310

9. Sun T, Nordberg ML, Cotelingam JD, Veillon DM, Ryder J. Fluorescence in situ hybridization: method of choice for a definitive diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Hematol* 2003; 74: 78-84
10. Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R. Interphase cytogenetics of hematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. *Anticancer Res* 2003; 23: 1139-48
11. Sreekantiah C. FISH panels for hematologic malignancies. *Cytogenet Genome Res.* 2007;118(2-4):284-96.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Estudio molecular

**Santiago Montes Moreno**

*santiago.montes@scsalud.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

## DEFINICIÓN

Se incluyen aquí técnicas de detección de alteraciones genéticas que identifican mutaciones y/o reordenamientos génicos. Este es un campo en continua expansión en el ámbito experimental, especialmente a partir del desarrollo de técnicas de secuenciación masiva. Se incluye un detalle de las diferentes determinaciones y la evidencia disponible que apoya su uso en diagnóstico clínico.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

Las técnicas de análisis molecular persiguen la detección de alteraciones en el ADN, esencialmente mutaciones y reordenamientos. La calidad del ADN extraído de una muestra es variable en función del procesamiento que haya sufrido. Así, el ADN obtenido de muestras en fresco o criopreservadas en medio OCT (incluyendo muestras de tejido, aspirado de médula ósea y sangre periférica) es de calidad superior al ADN obtenido de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Esto obliga a realizar un control de calidad del ADN previo a cualquier determinación molecular que valore la integridad del mismo. El protocolo recomendado mide la amplificación de fragmentos de ADN de tamaño conocido (100-400 pb) [1,2]. Existen otros protocolos basados en la amplificación de genes concretos (por ejemplo, p53).

## TIPOS DE ESTUDIO MOLECULAR Y METODOLOGÍA DISPONIBLE

### Análisis de clonalidad linfoide B y T

En la mayoría de los casos con sospecha de proceso linfoproliferativo el estudio histopatológico y citomorfológico, complementado con inmunohistoquímica y citometría de flujo permite discriminar entre procesos benignos y malignos y, en caso de ser neoplásico, subclasificar el tipo de neoplasia según la OMS. No obstante, en 5-10% de los casos los hallazgos histopatológicos no son convincentes o existe una discordancia clínico-patológica. El diagnóstico de neoplasia linfoide se puede apoyar en la identificación de clonalidad ya que >98% de las neoplasias linfoides contienen receptores de inmunoglobulina (Ig) y/o receptor de células T (TCR) reordenados de forma clonal [2,3]. Existen protocolos técnicos e interpretativos estandarizados a nivel europeo por el grupo Euroclonality/Biomed2 que son los que recomienda esta guía [1,2]. Estas recomendaciones estandarizan las condiciones técnicas del ensayo (sets de cebadores recomendados, condiciones de amplificación y control de calidad del ADN, electroforesis capilar y análisis de resultados), así como la interpretación de los mismos y su incorporación a un informe de diagnóstico molecular [1]. Este informe de diagnóstico molecular debe ser integrado al informe de diagnóstico histopatológico como

un estudio complementario y así tenido en cuenta en el contexto del caso en el diagnóstico definitivo. En este punto es esencial tener en cuenta las limitaciones de sensibilidad de la técnica por un lado y, por otro lado, que la presencia de poblaciones clonales no es suficiente, per se, para un diagnóstico de proceso linfoproliferativo.

Paneles de identificación de clonalidad linfoide:

- En el caso de sospecha de linfoproliferativo de línea B:
  - **Panel de primera línea:** Clonalidad de IgH VH-JH (3 tubos, FR1, FR2, FR3), preferiblemente con estudio de IGK Vk-Jk e IGK Kde (2 tubos).
  - **Panel de segunda línea** (si no se detecta clonalidad pero aún se sospecha): IGH DH-JH e IGL (2 tubos).
- En el caso de sospecha de linfoproliferativo de línea T:
  - **Panel de primera línea:** Clonalidad de TCRB V $\beta$ -J $\beta$ , TCRB D $\beta$ -J $\beta$  (3 tubos), preferiblemente con estudio de TCRG (2 tubos).
  - **Panel de segunda línea** (en caso de sospecha de linfoproliferativo T  $\gamma\delta$ ): TCRD (1 tubo).

### Estudio de la mutación L265P de MYD-88

La presencia de la mutación L265P en el gen MYD-88 se ha descrito asociada a la enfermedad de Waldstrom, gammapatía monoclonal de significado incierto de tipo IgM, un porcentaje de casos de linfoma B linfoplasmacítico y aislados casos de otros tipos de linfoma B de célula pequeña (SMZL, entre otros) [4-6]. No se encuentra en casos de mieloma múltiple. Asimismo, se encuentra en un porcentaje apreciable de casos de LBDCG NOS, especialmente de tipo ABC [7,8] y la variante de Linfoma B difuso de célula grande de tipo piernas («*leg type*») [9,10], linfoma B de célula grande primario testicular y Linfoma B difuso de célula grande primario cerebral [11]. La mutación MYD88/L265P se puede encontrar asociada a mutaciones somáticas en CD79B, mutaciones o ganancias de CARD11 y mutaciones o deleciones de A20 en LBDCG [12]. El efecto pronóstico independiente de la mutación MYD88/L265P en LBDCG es controvertido. La presencia de la combinación MYD88/L265P y CD79Bwt se asocia con peor respuesta a terapia y peor pronóstico al menos en dos series clínicas con diferentes esquemas terapéuticos [12,13].

La detección de la mutación MYD88/L265P se ha demostrado de utilidad en el diagnóstico diferencial de procesos linfoproliferativos B de bajo grado en muestras de MO [14] de modo que su presencia apoya el diagnóstico de LPL en casos de linfoma B de bajo grado clasificable.

El estudio de mutaciones de MYD88 se puede realizar con técnicas de secuenciación directa Sanger convencional (sensibilidad ~ 10%) o PCR cuantitativa convencional o alelo específica (sensibilidad ~ 0,1%) [5], así como metodologías basadas en NGS (de Next Generation Sequencing) [12].

### Estudio de las mutaciones en la vía MAPK

La presencia de la mutación V600E en el gen BRAF es la marca genética de la leucemia de células peludas (LCP) encontrándose en virtualmente todos los casos de este tipo de linfoproliferativo y en muy aislados casos de los linfoproliferativos B de bajo grado que la simulan (linfoma esplénico y tricoleucemia variante) [15-17]. Asimismo, se ha encontrado en histiocitosis de células de Langerhans (~60%), sarcoma histiocítico (~60%) y en la enfermedad de Erdheim-Chester (~60%) [18-21]. Esta mutación es un potencial marcador de terapia dirigida en LCP y procesos histiocitarios [22,23].

El estudio de la mutación de BRAFV600E se puede realizar con técnicas de Sanger convencional (sensibilidad ~ 10%), pirosecuenciación (sensibilidad ~ 5%) [24], PCR cuantitativa convencional o alelo específica (sensibilidad ~ 0,1%) [25], así como metodologías basadas en NGS (de Next Generation Sequencing) [26].

Existe asimismo un anticuerpo específico de la mutación (clon VE1) que es válido en muestras FFIP, incluso tras procesos de decalcificación [19,27].

La presencia de mutaciones en MAP2K1 (MEK1) se da en ~20% de los casos de histiocitosis de células de Langerhans y enfermedad de Erdheim Chester [28]. Se recomienda tratar de identificar las mutaciones en BRAFV600E y MAP2K1 en aquellos casos con histiocitosis de tipo L y un diagnóstico impreciso y en los pacientes con fallo a la terapia de primera línea [28]. Estas mutaciones en MAP2K1 se encuentran asimismo en ~50% de los casos de tricoleucemia variante [29] y ocasionalmente (~10%) en casos diagnosticados como linfoma B difuso de la pulpa roja esplénica [30].

### Otras determinaciones moleculares de potencial utilidad clínica

Otras determinaciones moleculares de potencial utilidad clínica son el estudio de perfiles de expresión génica y análisis de mutaciones somáticas derivadas de los estudios de secuenciación masiva.

**Tabla 1.** Alteraciones somáticas en linfoma.

Patología	Alteración genética recurrente
Leucemia linfocítica crónica B/ linfoma B linfocítico de célula pequeña	Mutaciones somáticas en TP53, NOTCH1, ATM, SF3B1.
Linfoma B linfoplasmacítico/enfermedad de Waldstrom	Mutaciones somáticas en MYD88 (L265P), CXCR4.
Tricoleucemia	Mutaciones somáticas en BRAF (V600E).
Tricoleucemia variante.	Mutaciones somáticas en MAP2K1.
Linfoma B difuso de la pulpa roja esplénica.	Mutaciones somáticas en MAP2K1, p53, NOTCH2, cyclinD3.
Linfoma B esplénico de la zona marginal	Mutaciones somáticas en NOTCH2, KLF2, TNFAIP3, MLL2, MYD88, TP53.
Linfoma B folicular	Mutaciones somáticas en MLL2, EZH2, CREBBP, EP300.
	Mutaciones somáticas en MAP2K1 y TNFRSF14 en el LF tipo pediátrico.
Linfoma B de células del manto	Mutaciones somáticas en ATM, CCDN1, MLL2, TP53, BIRC3, WHSC1.
Linfoma B difuso de célula grande NOS	Mutaciones somáticas en MYD88, CD79B, CARD11.
Linfoma de Burkitt	Reordenamientos aislados de MYC, Mutaciones

	somáticas en MYC, ID3, GNA13, TP53, SMARCA4.
Linfoma B de alto grado DH/TH	Reordenamientos de MYC, BCL2 y/o BCL6.
Leucemia de células T grandes granulares	Mutaciones somáticas en STAT3 y STAT5B.
Linfoma T hepatoesplénico	
Linfoma T/NK	
Micosis Fungoide	Mutaciones somáticas en PLCG1, CD28, RHOA.
Linfomas T con fenotipo T folicular (LTAI y equivalentes)	Mutaciones somáticas en RHOA, TET2, IDH2, DNMT3A, CD28, PLCG1.
Linfoma T anaplásico	Reordenamientos de ALK. Reordenamientos de DUSP22 y p63 en Linfoma T anaplásico ALK-.
Histiocitosis del grupo L (de células de Langerhans, ECD)	Mutaciones somáticas en BRAF (V600E), Mutaciones somáticas en MAP2K1.

#### **Firmas de expresión en LBDCG basadas en PCR cuantitativa digital.**

Recientemente se han desarrollado métodos de clasificación de los casos de LBDCG usando la tecnología Nanostring a partir de ARN extraído de tejido parafinado y un método basado en PCR cuantitativa digital.

Los perfiles de expresión permiten subclasificar los casos en las variantes moleculares de LBDCG GCB, ABC y *unclassified* (Lymph2Cx), así como determinar la firma del Linfoma B mediastínico primario (Lymph3Cx) o el *Double Hit Gene Expression Signature* [31-33]. El uso de estos paneles actualmente se limita al entorno de investigación y de los ensayos clínicos.

#### **Grupos genéticos en LBDCG.**

Recientemente se han descrito las firmas mutacionales del LBDCG, basadas en la combinación de mutaciones somáticas, alteraciones en número de copias y reordenamientos. Estas firmas genéticas se asocian con la célula de origen y tienen potencial impacto pronóstico y terapéutico. Se distinguen 4 grupos genéticos (BN2, EZB, MCD y N1) y 5 clústeres (C1 a C5). En particular las mutaciones de MYD88L265P y CD79B, que activan NF-κB, son casi exclusivas del subtipo ABC y configuran el grupo MCD y C5. Por otro lado, las alteraciones en EZH2 y BCL2 son más características del subtipo GCB y C4 [34,35]. El uso de estos paneles y de estrategias como la biopsia líquida para su determinación se limita actualmente al entorno de investigación y de los ensayos clínicos.

#### **RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudio de clonalidad linfoide B y/o T en casos de discordancia entre los resultados de la morfología y el estudio inmunohistoquímico, especialmente si existe alta sospecha clínica de proceso linfoproliferativo. (Grado C, nivel de evidencia IV).
2. Realizar los paneles de primera línea completos de estudio de clonalidad B y/o T en los casos en los que esté indicado. (Grado B, nivel de evidencia III).
3. Poner en contexto morfológico y fenotípico los resultados del estudio de clonalidad. No emitir un diagnóstico de proceso linfoproliferativo basado exclusivamente en el resultado molecular en ausencia de evidencia morfológica y fenotípica (especialmente en lesiones cutáneas o muestras de SP/MO). (Grado B, nivel de evidencia III).
4. La realización del análisis del estudio de clonalidad y su interpretación debe seguir las recomendaciones internacionales disponibles [12]. Si no se dispone de la tecnología o experiencia suficiente derivar el caso a un centro de referencia. (Grado C, nivel de evidencia IV).
5. Realizar estudio de mutaciones de MYD88-L265P en casos de sospecha morfológica y fenotípica de linfoma B linfoplasmácito, especialmente en casos de linfoma B de bajo grado inclasificable. (Grado B, nivel de evidencia III).
6. Realizar estudio de mutaciones en la vía de MAPK (BRAF-V600E) en casos de sospecha de leucemia de células peludas y procesos histiocitarios (histiocitosis de células de Langerhans, enfermedad de Erdheim Chester y Sarcoma histiocítico). (Grado B, nivel de evidencia III).

### Bibliografía

1. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012;26(10):2159-2171.
2. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-2317.
3. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.; 2008.
4. Jimenez C, Sebastian E, Chillón MC, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*. 2013;27(8):1722-1728.
5. Xu L, Hunter ZR, Yang G, et al. MYD88 L265P in Waldenström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood*. 2013;121(11):2051-2058.
6. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367(9):826-833.
7. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(10):3879-3884.
8. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011;43(9):830-837.

9. Pham-Ledard A, Prochazkova-Carlotti M, Andrique L, et al. Multiple genetic alterations in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type support a common lymphomagenesis with activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2014;27(3):402-411.
10. Pham-Ledard A, Cappellen D, Martinez F, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio JP. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol.* 2012;132(8):2118-2120.
11. Fernandez-Rodriguez C, Bellosillo B, Garcia-Garcia M, et al. MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia.* 2014;28(10):2104-2106.
12. Dubois S, Viailly PJ, Bohers E, et al. Biological and clinical relevance of associated genomic alterations in MYD88 L265P and non-L265P mutated diffuse large B-cell lymphoma: analysis of 361 cases. *Clin Cancer Res.* 2016.
13. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med.* 2015;21(8):922-926.
14. Ondrejka SL, Lin JJ, Warden DW, Durkin L, Cook JR, Hsi ED. MYD88 L265P somatic mutation: its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 2013;140(3):387-394.
15. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med.* 2011;364(24):2305-2315.
16. Trifa AP, Popp RA, Cucuianu A, et al. Absence of BRAF V600E mutation in a cohort of 402 patients with various chronic and acute myeloid neoplasms. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(12):2496-2497.
17. Ping N, Wang Q, Wang Q, et al. Absence of BRAF V600E mutation in hematologic malignancies excluding hairy-cell leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(12):2498-2499.
18. Haroche J, Charlotte F, Arnaud L, et al. High prevalence of BRAF V600E mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses. *Blood.* 2012;120(13):2700-2703.
19. Mehes G, Irsai G, Bedekovics J, et al. Activating BRAF V600E Mutation in Aggressive Pediatric Langerhans Cell Histiocytosis: Demonstration by Allele-specific PCR/Direct Sequencing and Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2014.
20. Go H, Jeon YK, Huh J, et al. Frequent detection of BRAF(V) (600E) mutations in histiocytic and dendritic cell neoplasms. *Histopathology.* 2014;65(2):261-272.
21. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, et al. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2010;116(11):1919-1923.
22. Dietrich S, Glimm H, Andrulis M, von Kalle C, Ho AD, Zenz T. BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia. *N Engl J Med.* 2012;366(21):2038-2040.
23. Haroche J, Cohen-Aubart F, Emile JF, et al. Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the BRAF V600E mutation. *Blood.* 2013;121(9):1495-1500.
24. Olson MT, Harrington C, Beierl K, et al. BRAF pyrosequencing analysis aided by a lookup table. *Am J Clin Pathol.* 2014;141(5):639-647.
25. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood.* 2012;119(1):192-195.

26. Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, et al. Clinical validation of a next-generation sequencing screen for mutational hotspots in 46 cancer-related genes. *J Mol Diagn.* 2013;15(5):607-622.
27. Andrulis M, Penzel R, Weichert W, von Deimling A, Capper D. Application of a BRAF V600E mutation-specific antibody for the diagnosis of hairy cell leukemia. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(12):1796-1800.
28. Emile JF, Abla O, Fraitag S, et al. Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. *Blood.* 2016;127(22):2672-2681.
29. Matutes E, Martinez-Trillos A, Campo E. Hairy cell leukaemia-variant: Disease features and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015;28(4):253-263.
30. Martinez D, Navarro A, Martinez-Trillos A, et al. NOTCH1, TP53, and MAP2K1 Mutations in Splenic Diffuse Red Pulp Small B-cell Lymphoma Are Associated With Progressive Disease. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(2):192-201.
31. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, et al. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol.* 2015;33(26):2848-2856.
32. Ennishi D, Jiang A, Boyle M, et al. Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2019;37(3):190-201.
33. Mottok A, Wright G, Rosenwald A, et al. Molecular classification of primary mediastinal large B-cell lymphoma using routinely available tissue specimens. *Blood.* 2018;132(22):2401-2405.
34. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med.* 2018;24(5):679-690.
35. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2018;378(15):1396-1407.





# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Informe diagnóstico

**Santiago Montes Moreno**

*santiago.montes@scsalud.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

El informe de diagnóstico anatomopatológico debe resumir e integrar todos los hallazgos obtenidos de la muestra de forma estructurada. Existen referencias de otras sociedades científicas que utilizan protocolos de informe con un formato predefinido o *checklist* [1]. En esta guía se propone sucintamente la estructura y el contenido de un informe de diagnóstico histopatológico de patología hematolinfóide.

## **DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA**

Se debe especificar el tipo de tejido recibido (ganglio linfático, médula ósea, bazo, otro tejido extraganglionar) y el formato de la muestra (biopsia escisional, incisional, de tipo punción-biopsia con aguja gruesa, PAAF, biopsia y aspirado de MO, pieza de esplenectomía, otros). Se debe consignar si la muestra se recibe en fresco o ya sumergida en algún medio de fijación. Asimismo deben constar las dimensiones máximas de la muestra en caso de biopsia y el tipo de procesamiento (fijación en formol e inclusión en parafina, otros). Si se destina muestra para estudios complementarios (CMF, cariotipo, FISH, molecular) o se incluye parte de la muestra excedente en Biobanco se debe hacer constar en este apartado.

## **DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA**

Incluye un primer apartado de descripción del patrón histopatológico y de las características citomorfológicas del tejido. En un segundo apartado se deben hacer constar los resultados del estudio inmunohistoquímico.

## **DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO**

Incluye el término diagnóstico de acuerdo con la actual clasificación de la OMS de neoplasias del sistema hematopoyético [2,3].

## **NOTAS**

En este apartado es deseable incluir comentarios relativos a la interpretación de los estudios complementarios en el contexto del diagnóstico histopatológico del caso. Esto es especialmente

relevante en lo relativo a los resultados de molecular (clonalidad linfoide, mutaciones somáticas) y de FISH/citogenética, habitualmente de relevancia diagnóstica y pronóstica.

Asimismo, es el espacio conveniente para incluir comentarios acerca del diagnóstico histopatológico en el contexto de los datos clínicos y otros datos de laboratorio proporcionados por el clínico solicitante u obtenidos de la historia clínica.

### **ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS**

En este apartado se debe incluir el resultado detallado de los diferentes estudios complementarios al diagnóstico realizados sobre el material recibido. Esto incluye resultados de molecular, FISH/citogenética o CMF. En el caso de que estos estudios se realicen en un laboratorio distinto al que genera el informe de anatomía patológica se recomienda incluir la información contenida en dicho informe y hacer referencia al laboratorio y personal responsable del análisis. En todo caso los resultados de los estudios complementarios deben integrarse en el cuerpo principal del informe anatomopatológico y si es preciso realizar algún comentario o interpretación sobre los mismos detallarse en el apartado de notas, junto al diagnóstico principal.

### **Bibliografía**

1. Hussong JW, Arber DA, Bradley KT, Brown MS, Chang CC, de Baca ME, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with non-Hodgkin lymphoma/lymphoid neoplasms. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(6):e40-7.
2. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Press I, editor2008.
3. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375-90.

# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B indolentes: Leucemia linfocítica crónica B / Linfoma B linfocítico de célula pequeña

**José Luis Villar**

*jl Villar@us.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Macarena, Sevilla.*

## DEFINICIÓN, EPIDEMIOLOGÍA Y RASGOS CLÍNICOS

Neoplasia linfoide que se caracteriza por la gradual acumulación de linfocitos B pequeños CD23 y CD5 positivos en la sangre, médula ósea (MO), bazo y ganglios linfáticos.

La enfermedad tiene dos formas de manifestación clínica, como:

**Leucemia linfocítica (linfática) crónica (LLC)**, que se define por la presencia de linfocitosis en sangre periférica (SP) de  $\geq 5 \times 10^9/L$  linfocitos B monoclonales con fenotipo de LLC, durante al menos tres meses.

**Linfoma linfocítico (LL)**, que exige para su diagnóstico la afectación de territorios linfoides (generalmente ganglios linfáticos) por linfocitos B monoclonales con las mismas características morfológicas e inmunofenotípicas de la LLC, unos valores de linfocitos en sangre  $< 5 \times 10^9/L$  y la ausencia de citopenias debidas a la infiltración de la médula ósea.

Si la cifra de linfocitos monoclonales en sangre es  $< 5 \times 10^9/L$  y no hay afectación de territorios linfoides el diagnóstico debe ser **linfocitosis B monoclonal (LBM)** con fenotipo de LLC, de LLC atípica o de LLC CD5 negativa. Esta LBM precede a todos los casos de LLC/LL y por ello exige un estrecho seguimiento clínico. Debe ser claramente distinguida de las linfocitosis monoclonales con cifras  $< 0.5 \times 10^9/L$ , sin capacidad de progresión y que no requieren un seguimiento clínico especial.

En occidente es la leucemia más común de los adultos (7ª década de la vida); ligeramente más frecuente en hombres. Hay una tendencia creciente al diagnóstico en individuos más jóvenes. La LLC/LL tiene la más alta tasa de predisposición genética de todas las neoplasias hematológicas. Hay una predisposición familiar a la enfermedad, con un riesgo estimado de 2-7 veces superior en familiares de primer grado de pacientes con LLC/LL.

La LLC/LL es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico, con presentación, curso clínico y evolución muy variables.

## Presentación clínica

Leucemia ( $\geq 5 \times 10^9/L$  de linfocitos monoclonales en sangre), generalmente asintomática, pero que puede cursar con astenia (a veces sin relación con el grado de actividad), síndrome anémico por infiltración, secuestro esplénico, anemia hemolítica autoinmune o infecciones.

Es frecuente la infiltración temprana de los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado, y con ella la aparición de hepato-esplenomegalia y adenopatías.

Es menos frecuente la afectación de otros territorios extramedulares. De éstos, los que se afectan con mayor frecuencia son el SNC, el tubo digestivo y la piel.

En un reducido porcentaje de casos hay un pequeño pico monoclonal de inmunoglobulinas.

Los casos con presentación aleucémica (LL) de la enfermedad son poco frecuentes.

## Curso clínico, respuesta al tratamiento y transformación

La mayoría de los casos de LL desarrollan afectación de la médula ósea y la sangre en el curso de la enfermedad.

El tratamiento sólo está indicado cuando existen síntomas o signos relacionados con enfermedad activa (síntomas B, conglomerados adenopáticos de gran tamaño o adenopatías de crecimiento progresivo, esplenomegalia progresiva, citopenias progresivas o fenómenos autoinmunes refractarios al tratamiento inmunosupresor).

Según su respuesta al tratamiento, la LLC debe encuadrarse en alguna de las siguientes categorías: en remisión completa, en remisión parcial, enfermedad estable, enfermedad en progresión, enfermedad refractaria y enfermedad mínima residual.

El 2-8% de los pacientes con LLC/LL sufre la transformación de su enfermedad: bien desarrollan un linfoma B difuso de células grandes (el denominado síndrome de Richter), o más raramente un linfoma de Hodgkin (<1%).

## Estadaje de la enfermedad

Se emplean dos sistemas: el de Binet o el de Rai modificado, que toman en consideración el número de territorios afectados (considerando 5 posibles áreas cervical, axilar, inguino-femoral, bazo e hígado), los valores de hemoglobina (Hb) y el número de plaquetas.

Binet: Se definen tres estadios:

- Estadio A: Hb  $\geq 10$  g/dL; plaquetas  $\geq 100 \times 10^9/L$  y no más de dos territorios afectados.
- Estadio B: Hb  $\geq 10$  g/dL; plaquetas  $\geq 100 \times 10^9/L$  y tres o más territorios afectados.
- Estadio C: Hb  $< 10$  g/dL y/o plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ , independientemente del número de territorios afectados.

Rai modificado: se definen 3 estadios:

- Riesgo bajo: Linfocitosis en SP y MO, sin otras alteraciones (antes, Rai 0).
- Riesgo intermedio: Linfocitosis y adenopatías, esplenomegalia y/o hepatomegalia (antes, Rai I y Rai II).
- Riesgo alto: Linfocitosis y anemia debida a la enfermedad (Hb  $< 11$  g/dL) (antes, Rai III) o trombocitopenia (plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ ) (antes, Rai IV).

Ambos sistemas tienen limitaciones, siendo la más importante su incapacidad para predecir qué pacientes en estadios iniciales tienen mayor riesgo de progresar. Actualmente, resulta de gran valor la diferenciación entre LLC con mutaciones somáticas o sin ellas en los genes que codifican la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IGHV) (*véase más adelante*).

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

En la mayoría de los casos, el diagnóstico de LLC se realiza en sangre periférica en base a la cifra de leucocitos, la fórmula leucocitaria, la morfología observada en el frotis y el inmunofenotipo apreciado en la citometría de flujo.

La biopsia de médula ósea no es necesaria para establecer el diagnóstico, y su valor pronóstico es controvertido en el momento actual. Se recomienda hacer biopsia de médula ósea en las siguientes situaciones clínicas:

- Antes de iniciar un tratamiento, para posteriormente ayudar en la evaluación de la respuesta al mismo.
- Ante citopenias de naturaleza no aclarada, y no justificadas por infiltración, hemólisis o causa carencial.

La biopsia ganglionar tampoco es habitualmente necesaria, salvo en:

- Los casos que se presenten con afectación ganglionar sin compromiso de SP, o cuando se plantea el diagnóstico diferencial con un linfoma del manto.
- En aquellos casos en los que se sospeche una transformación a un linfoma agresivo (debe sospecharse si aparecen: deterioro del estado clínico, síntomas B, aumento de la LDH, rápido crecimiento de los ganglios linfáticos, aparición de lesiones extraganglionares, etc.).

## RASGOS HISTOPATOLÓGICOS Y HEMATOLÓGICOS

### En el ganglio linfático

Borramiento de la arquitectura debido a un patrón de crecimiento difuso, con áreas más claras que le confieren un aspecto vagamente multinodular (pseudofolículos). En ocasiones hay sólo afectación parcial del ganglio (patrones interfolicular y/o perifolicular).

Linfocitos pequeños, sólo ligeramente mayores que los normales, monomorfos, con el núcleo redondo o algo irregular, la cromatina compacta y un citoplasma escaso. A veces tienen diferenciación plasmocitoide.

Las áreas claras se denominan centros de proliferación, son redondeadas y están constituidas por una población celular heterogénea: linfocitos pequeños, prolinfocitos (algo mayores, con nucléolo) y parainmunoblastos (de mayor tamaño, cromatina dispersa, nucléolo eosinófilo y con un ribete de citoplasma basófilo).

El tamaño, número y visibilidad de los centros de proliferación varía de un caso a otro. La presencia de centros de proliferación grandes y/o confluentes parece estar relacionada con un peor pronóstico.

El índice de mitosis es muy bajo.

### En el bazo

Afectación predominante de la pulpa blanca, pero también de la pulpa roja.

Los centros de proliferación son menos prominentes que en el ganglio.

Linfocitos pequeños, con el núcleo redondo, la cromatina compacta y el citoplasma escaso.

### En la médula ósea

Se describen cuatro patrones de infiltración: intersticial, nodular (nódulos de cualquier tamaño, en general sin centro claro, y de localización típicamente centromedular), mixta (intersticial y nodular) y difusa. En general, los tres primeros son los habituales en las fases iniciales de la enfermedad, y el último en las fases avanzadas.

Antes, a los patrones histológicos de infiltración se les daba valor pronóstico y predictivo de progresión, pero esto no se ha confirmado con los esquemas terapéuticos actuales.

La infiltración paratrabecular no es propia de la LLC.

Los centros de proliferación son menos prominentes que en el ganglio.

Linfocitos pequeños, con el núcleo redondo, la cromatina compacta y el citoplasma escaso.

### En la sangre periférica

El examen del frotis de sangre periférica permite orientar el diagnóstico en la mayoría de los casos.

Se describen dos variantes:

- Forma típica o clásica
- Forma atípica, que incluye a la variante mixta y a la variante prolinfocítica (distinta de la leucemia prolinfocítica).

### CITOMETRÍA DE FLUJO Y PANEL DE INMUNOHISTOQUÍMICA

**Panel de primera línea en CMF:** En la citometría de flujo la LLC típicamente expresa CD19, CD20 (débil), CD5, CD23, CD200 y CD43; y es débil o negativa para slg y FMC7.

**Panel de primera línea en IHQ:** CD20, CD3, CD5, CD23, BCL2 y ciclina D1.

**Panel de segunda línea en IHQ:** LEF1, IgD y CD43.

- Las células de la LLC/LL no expresan habitualmente CD3, CD10, BCL6 ni ciclina D1.
- Algunos casos de LLC/LL tienen un inmunofenotipo aberrante: CD5- y/o CD43-CD23-, FMC7+.
- Si la médula se ha fijado en B5 hay falsos negativos con CD5.
- La expresión de ZAP70 ( $\geq 20\%$  de las células) y CD38 ( $\geq 30\%$  de las células) ocurre habitualmente en los casos con IGHV no mutado y se asocia a un pronóstico adverso.

### DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

#### Diagnóstico diferencial

- Linfoma del manto
- Linfoma folicular
- Leucemia prolinfocítica B
- Linfoma de la zona marginal
- Linfoma de Hodgkin tipo predominio linfocítico

### **Causas de errores diagnósticos**

- Linfocitos atípicos en sangre y/o el aspirado de médula ósea: núcleos hendidos o de aspecto linfoplasmacítico.
- Porcentaje de prolinfocitos en SP del 10-50%.
- En el ganglio linfático, LL con núcleos atípicos y centros de proliferación poco aparentes.
- Afectación de territorios extramedulares como el SNC, la piel o el tubo digestivo.
- Inmunofenotipos aberrantes, con ausencia de expresión de CD5 o de CD23, y más raramente de ambos.
- LLC con la t(14;18)(q32;q21), poco frecuente y propia del linfoma folicular.

### **CITOGENÉTICA Y MUTACIONES SOMÁTICAS**

La LLC/LL es una enfermedad también muy heterogénea y compleja desde el punto de vista genético.

#### **Hipermutaciones somáticas en los genes que codifican la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IGHV)**

Según el grado de homología con respecto a la secuencia de nucleótidos del gen VH entre las células leucémicas y la línea germinal, se distingue entre LLC con IGHV mutado (<98 % de homología) y LLC con IGHV no mutado (≥98% de homología).

Los casos con IGHV no mutado tienen peor pronóstico: a) mayor riesgo de recurrencia tras el trasplante de médula ósea; b) la transformación (síndrome de Richter) ocurre casi exclusivamente en este subgrupo; c) mayor tendencia a adquirir alteraciones citogenéticas desfavorables y d) menor supervivencia.

El estado mutacional se correlaciona con la expresión de ZAP70: los casos con IGHV no mutado son mayoritariamente ZAP70 positivos, y suelen ser negativos los casos con IGHV mutado.

#### **Alteraciones citogenéticas**

Las alteraciones citogenéticas (cromosómicas) en la LLC constituyen uno de los principales factores pronósticos independiente, razón por la cual se recomienda su estudio en todos los casos antes de iniciar el tratamiento.

El estudio de las alteraciones citogenéticas se debe realizar con las técnicas citogenéticas clásicas (que han mejorado sus resultados con los nuevos métodos de cultivo celular, recomendándose el estudio de cariotipo en muestras estimuladas con TPA 72h), y sobre todo mediante FISH (con un panel múltiple frente a las regiones más frecuentemente alteradas). De manera alternativa se pueden usar *arrays* de hibridación genómica comparada.

En los casos de LLC se han identificado una amplia variedad de alteraciones citogenéticas. Las más frecuentes son:

- del(13q14), en general con pronóstico favorable
- trisomía 12 y del(6q21), con un pronóstico intermedio
- del(17p13) y del(11q22-23), se relacionan con un curso clínico agresivo y mal pronóstico

Las alteraciones citogenéticas son relativamente estables durante el curso de la enfermedad, pero en algunos casos aparecen alteraciones adicionales (p. ej. del (17p13) durante su evolución. En el 20% de los casos de LLC tienen de partida cariotipos complejos, en general asociados a un mal pronóstico.

Aunque algunos grupos postulen que antes de iniciar el tratamiento es suficiente con el estudio de la del(17p) y la del(11q), en general se recomienda el estudio de la trisomía 12, del(17p), del (11q) y del(13q) para una adecuada orientación pronóstica y terapéutica.

### Otras mutaciones génicas

El empleo de las nuevas técnicas de secuenciación ha contribuido de manera extraordinaria al conocimiento de las alteraciones genómicas de la LLC.

Los genes que con mayor frecuencia están mutados en la LLC son:

- TP53, con baja incidencia en estadios iniciales, las mutaciones en este gen son más prevalente en la LLC en progresión y la enfermedad refractaria al tratamiento. Se asocia del(17p13), con una concordancia del 80%. En el 5% de los casos con mutación en TP53 no hay del(17p13), y por ello se consideran factores pronósticos adversos independientes.
- ATM, las mutaciones en este gen son más frecuente en casos con del(11q) pero se considera también un factor pronóstico adverso independiente.
- NOTCH1, es uno de los que con mayor frecuencia aparece mutado en la LLC, particularmente en casos de enfermedad avanzada o de síndrome de Richter. Se asocia a la trisomía 12.
- SF3B1, las mutaciones en este gen también son más frecuente en casos con del(11q) y enfermedad avanzada.
- MYD88, presente en casos de IGHV mutado ( $\approx$  3% del total).

### PRONÓSTICO Y FACTORES PREDICTIVOS DE LA EVOLUCIÓN

Entre los factores con valor pronóstico y predictivos del curso clínico, la respuesta al tratamiento y la supervivencia en los casos de LLC/LL se consideran los siguientes:

- Estadio clínico de la enfermedad.
- Marcadores séricos (LDH,  $\beta$ 2-microglobulina, timidina quinasa, entre otros).
- Tiempo de duplicación de las cifras de linfocitos en la sangre periférica (mayor o menor de 12 meses).
- Centros de proliferación grandes y/o confluentes.
- Estado mutacional de IGHV.
- Expresión de ZAP70 en  $\geq$ 20% y/o de CD38 en  $\geq$ 30% de las células tumorales.
- +Tipo de alteración citogenética:
  - del(13q14): buen pronóstico
  - trisomía 12 y del(6q21): pronóstico intermedio
  - del(17p13) y del(11q22-23): mal pronóstico
- Mutaciones en TP53, ATM, NOTCH1 y SF3B1.

### RECOMENDACIONES

1. Para establecer el diagnóstico de la LLC/LL es esencial realizar un estudio morfológico e inmunofenotípico, mediante citometría de flujo y/o inmunohistoquímica, generalmente de sangre periférica en los casos de LLC y en el ganglio linfático en los casos de LL. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. El patólogo puede contribuir a su diagnóstico en casos atípicos, y aportar información valiosa identificando el patrón de infiltración de la médula ósea o valorando la respuesta al tratamiento. Grado C. Evidencia nivel IV.



3. El diagnóstico de LL, generalmente se establece en una biopsia ganglionar, y se debe realizar el diagnóstico diferencial con otros linfomas B de células pequeñas. La eventual transformación en un LBDCG o en un linfoma B Hodgkin-like también es un diagnóstico basado en los hallazgos histopatológicos. Grado C. Evidencia nivel IV.
4. El diagnóstico de LLC/LL requiere la colaboración entre el hematólogo y el patólogo. Grado C. Evidencia nivel IV.
5. Las alteraciones citogenéticas son frecuentes en la LLC, además de un factor pronóstico independiente, razón por la cual se recomienda su estudio mediante FISH y/o cariotipo en todos los casos antes de iniciar el tratamiento. Grado C. Evidencia nivel IV.
6. Se recomienda el estudio del estado de mutación de los genes que codifican la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IGHV) y de las mutaciones de TP53. Grado C. Evidencia nivel IV.

Los autores desean agradecer a la Dra. Neus Villamor la revisión crítica de este capítulo.

#### Bibliografía

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127:2375-2390.
2. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 2015;90:447-460.
3. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
4. Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood* 2015;126:454-462
5. Parikh SA, Shanafelt TD. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia *Semin Oncol* 2016;43:233-240.
6. Rossi D, Gaidano G. The clinical implications of gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 2016;114:849-854.
7. Martín-Subero JI, López-Otín C, Campo E. Genetic and epigenetic basis of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol* 2013;20:362-368.
8. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Beà S, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013; 27:1100-1106.
9. Villamor N, Lopez-Guillermo A, Lopez-Otin C, Campo E. Next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 2013;50:286-295.
10. Amin NA, Malek SN. Gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2016;43:215-221.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B indolentes: Leucemia células B-prolinfocítica

**Manuela Mollejo Villanueva**

*mmollejov@sescam.jccm.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.*

## DEFINICIÓN

Es un proceso neoplásico de células B con morfología de prolinfocitos que infiltra médula ósea, sangre periférica y bazo. La cifra de prolinfocitos en sangre periférica debe ser mayor del 55%. Hay que descartar casos de progresión de LLC-B y linfomas del manto con expresión periférica. Es una entidad muy rara, aproximadamente 1% de leucemias linfocíticas. Afecta a pacientes de edad avanzada y tienen un curso clínico más agresivo que CLL.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se establecerá en la mayoría de las ocasiones en sangre periférica y/o médula ósea. Las descripciones de la PLL en otras localizaciones son excepcionales y la mayoría corresponden a linfomas del manto blásticos

**Sangre periférica:** La mayoría de las células circulantes son prolinfocitos, células de mediano tamaño con nucléolo prominente.

**Biopsia-cilindro y aspirado de médula ósea:** El aspirado muestra abundantes prolinfocitos. La biopsia muestra una infiltración intersticial y/o infiltración difusa y nodular peritrabecular por linfocitos de mediano tamaño con núcleos con nucléolos prominentes.

**Bazo:** El bazo muestra infiltración de pulpa blanca y pulpa roja por una población de linfocitos de mediano tamaño. Las descripciones de PLL en bazo son excepcionales.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico diferencial incluye:

- Linfoma de células del manto. Es el principal diagnóstico diferencial, es necesario realizar ciclina D1 y/o descartar la presencia de la t(11;14).
- LLC-B con un aumento de prolinfocitos. El fenotipo por inmunohistoquímica y/o citometría de flujo (escore Matutes de LLC-B ayuda a establecer el diagnóstico).

- Linfoma esplénico de la zona marginal, con aumento de células grandes. La composición citológica de linfocitos pequeños junto con células con diferenciación marginal y blastos salpicados establece el diagnóstico frente a al relativo monomorfismo de la PLL

Este diagnóstico diferencial debe tener en cuenta la morfología y cifra de linfocitos en sangre periférica, fenotipo y características clínicas.

#### **PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) e HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA (HIS-C)**

**Panel de primera línea CMF:** CD20, CD22, FMC7, CD5, CD23

**Panel de primera línea IHQ:** CD20, CD3, CD5, CD23, ciclina D1,

**Paneles de segunda línea:** IgD, IgM

#### **CITOGENÉTICA Y MOLECULAR**

El estudio citogenético no es imprescindible, pero si recomendable por su utilidad en el diagnóstico diferencial. Ausencia de la t(11;14)(q13;q32), bien mediante FISH y/o cariotipo. Los cariotipos complejos son frecuentes y la del (17p) descrita en el 50% de los casos, generalmente asociada a mutaciones del TP53. La trisomía 12 es infrecuente y las deleciones del 13q14 se detectan en aproximadamente un 30% de los casos.

#### **RECOMENDACIONES**

1. El estudio de sangre periférica y/o médula ósea es el método de elección para el diagnóstico inicial de los casos con sospecha de LPL. Grado B, nivel de evidencia III.
2. La morfología prolinfocítica no es sinónimo de LPL. Puede observarse en la progresión de diferentes leucemias de linfocitos B. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. Debe excluirse linfoma manto leucémico mediante la ausencia de expresión de ciclina D1 y/o ausencia de t(11;14) mediante FISH. Grado C. Evidencia nivel IV Grado C. Evidencia nivel IV.
4. El estudio de cariotipo no es necesario en el panel diagnóstico habitual de la LPL. Grado C. Evidencia nivel IV.

#### **Bibliografía**

1. Swerdlow SH CE, H. N., Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.
2. Ruchlemer, R., N. Parry-Jones, V. Brito-Babapulle, I. Attolico, A. C. Wotherspoon, E. Matutes and D. Catovsky (2004). "B-prolymphocytic leukaemia with t(11;14) revisited: a splenomegalic form of mantle cell lymphoma evolving with leukaemia." Br J Haematol 125(3): 330-336.
3. Schlette, E., C. Bueso-Ramos, F. Giles, A. Glassman, K. Hayes and L. J. Medeiros (2001). "Mature B-cell leukemias with more than 55% prolymphocytes. A heterogeneous group that includes an unusual variant of mantle cell lymphoma." Am J Clin Pathol 115(4): 571-581.

# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B indolentes: Linfoma folicular

**Empar Mayordomo Aranda**

*empar13@hotmail.com*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario La Fe, Valencia.*

## **DEFINICIÓN**

Neoplasia linfoide de células B maduras centrofoliculares (centrocitos y centroblastos) de patrón nodular predominante.

## **FRECUENCIA Y FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS**

Es un linfoma frecuente. Representa el 20% de todos los linfomas.

Más frecuente en Europa y EE.UU. que en el resto del mundo.

Adultos (6ª década de la vida), sin diferencia entre sexos. Raro antes de los 20 años.

## **PRESENTACIÓN CLÍNICA Y EVOLUCIÓN**

### **Presentación clínica**

Adenopatías generalizadas (sólo el 30% debuta en estadios I-II), sin otra sintomatología. Es poco frecuente la aparición de síntomas B.

Frecuente afectación de la médula ósea al diagnóstico (60% de los casos) y del bazo.

Menos frecuentemente: piel, anillo de Waldeyer, tubo digestivo, mama y testículos.

Se ha descrito presentación leucémica (linfocitosis absoluta) del LF en el momento del diagnóstico, aunque varía según las series entre el 4-23% de los casos [1].

### **Curso clínico y progresión**

Curso clínico prolongado, con remisiones y recurrencias.

El 25-35% de los LF progresan a un linfoma de alto grado. Lo más frecuente es la transformación histológica a LBDCG, pero también puede hacerlo en formas más agresivas como un linfoma B de alto

grado DH/TH y con menos frecuencia a un linfoma de tipo linfoblástico. En estos casos es recomendable identificar la presencia de traslocaciones de BCL2, BCL6 y MYC.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

La **biopsia por escisión** del ganglio linfático o del tejido extraganglionar afectado es la muestra idónea para el diagnóstico de linfoma folicular. Es la única muestra que permite evaluar el tejido por completo por lo que es posible establecer el patrón y el grado con seguridad.

La biopsia con aguja gruesa (BAG) puede estar justificada en casos de adenopatías no accesibles (por ejemplo las retroperitoneales). Es posible alcanzar el diagnóstico de LF con la ayuda de la inmunohistoquímica y la biología molecular; no obstante debe advertirse mediante una nota al diagnóstico que el diagnóstico puede estar sesgado por el tipo de material remitido (particularmente el grado citológico del tumor o la presencia de áreas de patrón difuso).

La PAAF no es un procedimiento diagnóstico recomendable para el diagnóstico inicial de LF.

La biopsia de MO tampoco es un método diagnóstico adecuado porque aunque el patrón de infiltración es muy característico (patrón paratrabecular), no es exclusivo. No obstante es el método de elección para la estadificación de todos los casos de linfoma folicular. El aspirado no es suficiente para el diagnóstico dado que no nos permite evaluar el patrón de infiltración.

## MORFOLOGÍA Y GRADOS HISTOLÓGICOS

### Morfología

Borramiento de la arquitectura ganglionar normal.

Patrón nodular, con nódulos compactos, sin centro claro, con mantos ausentes o atenuados, en estrecho contacto.

Dos tipos celulares en los folículos: centroblastos (CB) y centrocitos (CC), sin presencia de macrófagos con cuerpos tingibles. La cantidad de CB establecerá el grado del LF.

De forma focal existen CC neoplásicos (generalmente más pequeños que los foliculares) entre los folículos. Este no es criterio de patrón difuso. Si la proporción es superior a 25% debe indicarse en el informe que existe un patrón difuso (de bajo grado, compuesto de forma predominante por CC).

La presencia de áreas difusas con células CB (de gran tamaño) debe reflejarse en el informe y se considera como LBDCG. De esta forma incluiremos por separado el % de cada uno de los componentes (LBDCG en % y LF en %). Estos casos son manejados clínicamente como un LBDCG.

En un pequeño porcentaje de LF se advierte un patrón de crecimiento invertido, que remeda al linfoma marginal nodal, no obstante un adecuado estudio inmunohistoquímico nos permitirá diferenciarlo. Así mismo se ha descrito diferenciación marginal, monocitoide e incluso linfoplasmocítica, fundamentalmente en la periferia de los folículos, formando parte de la población neoplásica. Dicho hallazgo no varía ni el diagnóstico, ni el grado.

## Grados histológicos

Se establece según el número de CB por campo de gran aumento, por lo que debemos contar al menos 10 campos en diferentes folículos, considerando aquellos que morfológicamente veamos de grado mayor.

Grado 1: 0-5; Grado 2: 6-15; Grado 3A: >15 (con CC presentes); Grado 3B: >15 (no hay CC).

Es imprescindible incluir el grado en el informe anatomopatológico.

## Afectación de la médula ósea

Existe frecuentemente afectación medular al diagnóstico y típicamente suele ser paratrabecular, aunque puede mostrar patrones de afectación intersticial, nodular y difuso. No es necesario el estudio inmunohistoquímico en todos los casos aunque sí recomendable.

El estudio IHQ nos permite detectar infiltrados sutiles desde el punto de vista morfológico y descartar la presencia de nódulos mixtos intramedulares reactivos. Para ello utilizaremos CD20 y CD3 y en caso de duda CD10/BCL6 y BCL2. En casos con terapia previa con antiCD20 es útil el uso de otros marcadores B como PAX5 y CD79.

## INMUNOFENOTIPO

El linfoma folicular típicamente expresa marcadores B (CD20, CD79a, CD19, OCT2 y PAX5), marcadores de centro folículo (BCL6, CD10) y BCL2. Puede resultar de ayuda el CD21 y/o CD23, que marcan las células dendríticas foliculares, para distinguir entre folículos confluentes y áreas difusas. En ocasiones se observa expresión de CD23 por las células neoplásicas.

No es necesario utilizar todos los marcadores de estirpe B, pero sí al menos 2 en aquellos casos en que el paciente haya sido tratado con rituximab porque el CD20 puede ser negativo completamente.

El linfoma folicular típicamente no expresa CD3 ni ciclina D1. En cambio se han descrito LF con expresión de CD5; así como LF CD10-MUM1+.

BCL2 se sobreexpresa en la mayoría de los casos de LF. Un porcentaje significativo de LF de grado 3 puede ser negativo para BCL2 y carecer de t(14;18). Incluso, hasta el 10% de los casos con t(14;18) pueden ser negativos para BCL2 utilizando el clon usual (clon 124). En este último caso el uso de clones alternativos (E17, SP66) puede ser de utilidad para desenmascarar la pseudonegatividad.

El índice de proliferación (Ki67) no es necesario para el diagnóstico, ni para establecer el grado, aunque puede ser de utilidad para el diagnóstico diferencial con hiperplasia linfoide reactiva y LBDCG. Generalmente en los LF de bajo grado suele ser <20% (LF de grado 1-2) y >20% en LF de alto grado (grado 3a y 3b).

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

### Diagnóstico diferencial

Hiperplasia folicular reactiva

Linfoma del manto

Linfoma linfocítico con centros de proliferación (pseudofolículos) prominentes

Linfoma de la zona marginal.

Linfoma de células grandes B con reordenamiento de IRF4.

### Causas de errores diagnósticos

BCL2 puede ser negativo o débilmente positivo en LF, particularmente en los de grado 3 (50% de los casos) y en la variante de tipo pediátrico. Por tanto, la ausencia de expresión de BCL2 no excluye el diagnóstico de LF.

El LF puede presentar patrones histológicos atípicos: afectación parcial del ganglio, afectación parcial de algunos folículos linfoides no neoplásicos, folículos irregulares serpiginosos, patrón floral, patrón invertido o patrón difuso puro (sin áreas nodulares).

El LF puede estar constituido por tipos celulares atípicos: centroblastos con núcleo lobulado, apariencia blastoide, células en anillo de sello, con diferenciación plasmocelular.

Las células del LF pueden mostrar focalmente una distribución perifolicular, con la apariencia citohistológica de un linfoma de la zona marginal.

El LF puede mostrar expresión aberrante de CD5 y CD23; y puede ser negativo para CD10.

### CITOGENÉTICA Y DATOS MOLECULARES

La translocación t(14;18) que reordena BCL2 con el gen de las inmunoglobulinas (IgH) está presente en el 90% de los LF de grado 1-2, y con menos frecuencia en los de grado 3.

Debido a la variabilidad en los puntos de ruptura del gen BCL2, el método más sensible y específico para la identificación del reordenamiento BCL2 es la FISH utilizando una sonda tipo *break apart* (tejido) o *Dual color dual fusion* (muestra MO o SP con infiltración tumoral, o células en suspensión obtenidas por disrupción mecánica de muestra de tejido). Esta técnica es suficiente para el diagnóstico de rutina de este linfoma.

El estudio de PCR para detectar reordenamientos de BCL2 no es una alternativa en el ámbito diagnóstico por su escasa sensibilidad.

El estudio citogenético con muestras estimuladas 72 horas con TPA no es imprescindible para el diagnóstico de LF, aunque si recomendable, siempre que sea posible, ya que permite identificar anomalías secundarias con potencial valor pronóstico. Los cariotipos complejos con más de seis anomalías, las translocaciones que afectan al 8q24 (MYC), las deleciones de 1p, 6q, 17p así como las ganancias del cromosoma 12 o 18p entre otros parecen asociarse a un pronóstico desfavorable.

Se recomienda el estudio del reordenamiento del gen BCL2 por FISH en los casos con inmunofenotipo aberrante y/o patrón histológico atípico.

Se recomienda el estudio de clonalidad linfoide B en los casos de linfoma B folicular de tipo pediátrico.

Otras translocaciones son raras en el LF, pero pueden ocurrir. En LF de grado 3 sin la t(14;18) es recomendable emplear la sonda *break-apart* para BCL6 (el reordenamiento de BCL6 está presente en el 5-15% de los LF). Asimismo existe un subgrupo de Linfomas B de célula grande de fenotipo GCB con reordenamientos de IRF4/MUM1 (2).

Un subgrupo de LF sin la t(14;18)(q32;q21) y caracterizado por un patrón predominantemente difuso se asocia a deleciones en 1p36 (3) y localización inguinal de las adenopatías.



La transformación a LBDCG conlleva la adquisición de alteraciones genéticas adicionales, particularmente la translocación del gen MYC y otras relacionadas con la disregulación del ciclo celular y la respuesta al daño del DNA.

## **PRONÓSTICO Y FACTORES PREDICTIVOS DE LA EVOLUCIÓN**

La extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico y el Índice Pronóstico Internacional para LF (FLIPI) son importantes factores pronósticos.

En el FLIPI-2, la afectación de la médula ósea en LF se considera de manera específica un factor pronóstico adverso, aunque su utilidad en la práctica asistencial está siendo evaluada (4,5)

El grado histológico es un buen factor pronóstico del curso de la enfermedad y del riesgo de transformación a LBDCG.

La presencia de áreas difusas en LF de grado 1-2 no influye en el pronóstico. Es esencial distinguir entre un patrón difuso de bajo grado y la presencia concomitante de LBDCG y LF.

En general, el índice de proliferación se correlaciona con el grado histológico, pero hay un subgrupo de LF grado 1-2 con un alto índice de proliferación que se comporta de un modo similar al LF de grado 3.

## **VARIANTES DEL LINFOMA FOLICULAR**

### **Neoplasia folicular in situ**

El término linfoma folicular in situ en la nueva edición de la OMS ha sido sustituido por el de neoplasia folicular in situ; en cambio sus criterios diagnósticos no han variado.

El diagnóstico se establece cuando observamos una arquitectura ganglionar o folicular extraganglionar conservada, frecuentemente con un patrón predominante de hiperplasia linfoide reactiva, pero con expresión intensa, en un número variable de folículos de CD10 y BCL2 (8, 9). Se excluyen los casos que presentan en la misma biopsia áreas que cumplen criterios de LF convencional con infiltración parcial del ganglio linfático. Es particularmente informativa, en este diagnóstico diferencial la presencia de infiltración interfolicular.

El riesgo de transformación a LF establecido de lesiones aisladas e incidentales de neoplasia folicular in situ es muy bajo. No obstante, en un porcentaje significativo de los casos los pacientes tienen LF establecido en el momento de este diagnóstico (confirmado en otra biopsia) o lo desarrollan a corto plazo. Otro subgrupo de casos se identifica en el momento del diagnóstico de otras neoplasias linfoides, no LF.

En el momento del diagnóstico de neoplasia folicular in situ es recomendable insistir en la necesidad de un adecuado despistaje clínico de linfoma establecido (estudios de imagen y biopsia de médula ósea si existe sospecha clínica de linfoma establecido) (6-11).

### **Linfoma folicular de tipo pediátrico**

Es una variante de LF que suele aparecer en varones, niños pero que ha sido descrita también en adultos. Es principalmente de localización ganglionar, aunque puede presentarse en el anillo de Waldeyer.

Morfológicamente recuerda un LF, con nódulos y células grandes, de aspecto blastoide, o difícilmente clasificable, con variable expresión de BCL2, sin reordenamiento del gen BCL2. Tampoco

se han detectado reordenamiento de BCL6, ni c-myc. Resulta por tanto necesario determinar clonalidad. Recientemente se han descrito mutaciones somáticas (MAP2K1 y TNFRSF14) distintas a las usuales en LF convencional. Clínicamente la enfermedad tiene un excelente pronóstico, por lo que el manejo clínico debe ser conservador (12).

### **LF del tracto gastrointestinal.**

LF de tipo duodenal: La región de aparición más frecuente es la segunda porción del duodeno, aunque puede aparecer en cualquier localización del tracto gastrointestinal. La presentación clínica suele ser en forma de múltiples pólipos sin sintomatología clínica específica. En ocasiones incluso inexistente. El estadiaje clínico es bajo y no tienen tendencia a progresar. El pronóstico es excelente incluso sin tratamiento específico, recomendándose una actitud conservadora. (13-14)

### **LF primario testicular**

Localización extraganglionar frecuente, no sólo en niños, sino también en adultos. Estadiaje clínico bajo (1E generalmente), afectación unilateral y pronóstico excelente. Hay que recordar que suelen no expresar BCL2, ni presentar la t(14;18). (15).

### **Linfoma folicular predominantemente difuso con delección 1p36.**

Se trata de un linfoma poco frecuente, de localización típicamente inguinal, con un patrón de crecimiento difuso, de bajo grado. El estudio inmunohistoquímico muestra expresión de marcadores de centrofolículo, expresión variable de BCL2 y, usualmente expresión de CD23. No se observan reordenamientos de BCL2, habiéndose descrito otras alteraciones moleculares como la del 1p36 (3).

### **Linfoma B centrofolicular cutáneo:**

Se discute en el capítulo de linfomas cutáneos.

## **RECOMENDACIONES**

1. El LF se presenta típicamente en la edad adulta con adenopatías generalizadas. No obstante no debemos olvidar que puede presentarse como enfermedad extraganglionar (LF de tipo duodenal), localizada (LF variante difusa), en forma leucémica y en edad temprana (LF de tipo pediátrico). Grado C. Evidencia nivel IV.
2. El grado histológico del LF debe aparecer en el informe anatomopatológico. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. La presencia de áreas difusas en las que haya >15CB por campo de gran aumento es criterio suficiente para el diagnóstico de LBDCG. En este caso se debe informar como LBDCG y Linfoma folicular del grado que corresponda, expresando los porcentajes de ambos. Grado C. Evidencia nivel IV.
4. El panel inmunohistoquímico de primera línea para el diagnóstico de LF debe incluir: CD20, CD3, BCL2, BCL6, CD10, CD5 y Ki67. Grado C. Evidencia nivel IV.
5. El panel inmunohistoquímico de segunda línea para el diagnóstico de LF puede incluir: MUM1, otros marcadores B (PAX5, OCT2), CD21, CD23, p53 y en función de CD5, ciclina D1. Grado C. Evidencia nivel IV.

6. En la biopsia de estadiaje de MO es preciso realizar estudio IHQ con CD20 y CD3 para descartar infiltrados sutiles morfológicamente. PAX5 puede ser de utilidad en pacientes previamente tratados con inmunoterapia (anti-CD20). Grado C. Evidencia nivel IV.
7. El LF in situ cambia el nombre en la última edición de la OMS, por neoplasia folicular in situ. Es conveniente incluir una nota en el informe acerca del significado de la lesión y la conveniencia de realizar un estudio clínico para descartar LF establecido u otro tipo de linfoma (técnicas de imagen, TAC y biopsia de MO). Grado C. Evidencia nivel IV.
8. El estudio citogenético no es imprescindible para el diagnóstico de LF aunque si recomendable, especialmente en los casos de morfología o fenotipo atípicos. Grado C. Evidencia nivel IV.
9. Se recomienda el estudio por FISH del reordenamiento de BCL2 con sondas de tipo *break apart* para cortes de parafina y dual fusión para extensiones. Grado C. Evidencia nivel IV.

### Bibliografía

1. Beltran, B. E., P. Quinones, D. Morales, J. C. Alva, R. N. Miranda, G. Lu, B. D. Shah, E. M. Sotomayor and J. J. Castillo (2013). "Follicular lymphoma with leukemic phase at diagnosis: a series of seven cases and review of the literature." *Leuk Res* 37(9): 1116-1119.
2. Salaverria, I., C. Philipp, I. Oschlies, C. et al. Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche, G. German High-Grade Lymphoma Study and N. H. L. t. g. Berlin-Frankfurt-Munster (2011). "Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults." *Blood* 118(1): 139-147.
3. Katzenberger, T., J. Kalla, E. Leich, H. Stocklein, E. Hartmann, S. Barnickel, S. Wessendorf, M. M. Ott, H. K. Muller-Hermelink, A. Rosenwald and G. Ott (2009). "A distinctive subtype of t(14;18)-negative nodal follicular non-Hodgkin lymphoma characterized by a predominantly diffuse growth pattern and deletions in the chromosomal region 1p36." *Blood* 113(5): 1053-1061.
4. Federico, M., M. Bellei, L. Marcheselli, S. Luminari, A. Lopez-Guillermo, U. Vitolo, B. Pro, S. Pileri, A. Pulsoni, P. Soubeyran, S. Cortelazzo, G. Martinelli, M. Martelli, L. Rigacci, L. Arcaini, F. Di Raimondo, F. Merli, E. Sabattini, P. McLaughlin and P. Solal-Celigny (2009). "Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project." *J Clin Oncol* 27(27): 4555-4562.
5. Freedman, A. (2014). "Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management." *Am J Hematol* 89(4): 429-436.
6. Cong, P., M. Raffeld, J. Teruya-Feldstein, L. Sorbara, S. Pittaluga and E. S. Jaffe (2002). "In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection." *Blood* 99(9): 3376-3382.
7. Montes-Moreno, S., Y. Castro, S. M. Rodriguez-Pinilla, J. F. Garcia, M. Mollejo, M. E. Castillo, A. Bas-Vernal, C. Barrionuevo-Cornejo, L. Sanchez-Verde, J. Menarguez, J. C. Cigudosa and M. A. Piris (2010). "Intrafollicular neoplasia/in situ follicular lymphoma: review of a series of 13 cases." *Histopathology* 56(5): 658-662.
8. Jegalian, A. G., F. C. Eberle, S. D. Pack, M. Mirvis, M. Raffeld, S. Pittaluga and E. S. Jaffe (2011). "Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma." *Blood* 118(11): 2976-2984.

9. Schmidt, J., I. Salaverria, A. Haake, I. Bonzheim, P. Adam, S. Montes-Moreno, M. A. Piris, F. Fend, R. Siebert and L. Quintanilla-Martinez (2014). "Increasing genomic and epigenomic complexity in the clonal evolution from in situ to manifest t(14;18)-positive follicular lymphoma." *Leukemia* 28(5): 1103-1112.
10. Adam, P., T. Katzenberger, M. Eifert, M. M. Ott, A. Rosenwald, H. K. Müller-Hermelink and G. Ott (2005). "Presence of preserved reactive germinal centers in follicular lymphoma is a strong histopathologic indicator of limited disease stage." *Am J Surg Pathol* 29(12): 1661-1664.
11. Bermudez G, González de Villambrosía S, Martínez-López A, Batlle A, Revert-Arce JB, Cereceda Company L, Ortega Bezanilla C, Piris MA, Montes-Moreno S (2016). Incidental and Isolated Follicular Lymphoma In Situ and Mantle Cell Lymphoma In Situ Lack Clinical Significance. *Am J Surg Pathol*. 40(7):943-9
12. Liu, Q., I. Salaverria, S. Pittaluga, A. G. Jegalian, L. Xi, R. Siebert, M. Raffeld, S. M. Hewitt and E. S. Jaffe (2013). "Follicular lymphomas in children and young adults: a comparison of the pediatric variant with usual follicular lymphoma." *Am J Surg Pathol* 37(3): 333-343.
13. Schmatz AI, Streubel B, Kretschmer-Chott E, et al. Primary follicular lymphoma of the duodenum is a distinct mucosal/submucosal variant of follicular lymphoma: a retrospective study of 63 cases. *J Clin Oncol*. 2011;29(11): 1445-1451.
14. Takata K, Sato Y, Nakamura N, et al. Duodenal follicular lymphoma lacks AID but expresses BACH2 and has memory B-cell characteristics [published correction appears in *Mod Pathol*. 2013;26(8):1152]. *Mod Pathol*. 2013;26(1): 22-31.

# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B indolentes: Linfomas de la zona marginal: Linfoma esplénico de la zona marginal

**Manuela Mollejo Villanueva**

*mmollejov@sescam.jccm.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.*

## **DEFINICION Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD.**

El linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM) es un linfoma de células pequeñas y curso clínico indolente caracterizado por infiltración del bazo, médula ósea y sangre periférica. Es poco frecuente, alrededor del 2% de los síndromes linfoproliferativos. Hay casos asociados al virus de la hepatitis C, y en Africa subsahariana se ha documentado un cuadro idéntico al LZME con linfocitos vellosos asociado con malaria. El LEZM aparece en personas de edad avanzada (media 65 años) y se manifiesta con esplenomegalia, linfocitosis y citopenias de intensidad variable, debidas principalmente a la esplenomegalia más que a la infiltración de la médula. En el 20% de los casos pueden detectarse otros fenómenos autoinmunes. En un tercio de los casos se detecta un pico monoclonal, más frecuentemente IgM. Suele haber elevación de B2M y de LDH pero no síntomas B. En un 10-13% de los casos puede haber transformación a LBDCG, que puede ocurrir en el bazo, ganglios y/o médula ósea, con elevación de LDH, afectación sistémica, síntomas B, aparición de lesiones ocupantes de espacio en el bazo y comportamiento clínico agresivo.

## **TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO**

Los criterios del diagnóstico están recogidos en el documento del «SMZL working group» y en la clasificación de las neoplasias hematológicas de la OMS de 2008. El diagnóstico se puede establecer con el estudio de los datos morfológicos, fenotípicos y moleculares de sangre periférica y médula ósea y/o estudio de la pieza de esplenectomía.

**Sangre periférica:** En la sangre periférica casi siempre se detecta una población clonal de linfocitos, que suele ser superior a  $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ , pero sin alcanzar valores superiores a  $25 \times 10^3/\mu\text{L}$ . En el frotis se observan linfocitos de pequeño y mediano tamaño, células con diferenciación plasmocitoide y se suelen identificar, aunque no siempre, linfocitos vellosos con prolongaciones polares características, aunque su proporción varía en los diferentes casos del 5% al 90% de los linfocitos.

**Biopsia médula ósea:** Infiltrado intersticial, intrasinusoidal y nódulos intertrabeculares. La médula está afectada prácticamente en todos los casos, aunque a veces es muy leve y solo se puede demostrar con tinción para CD20 que marca la infiltración intrasinusoidal e intersticial. Un rasgo útil es

la presencia de dendríticas marcados con CD23 en los nódulos linfoides, reflejando el reemplazamiento folicular como en el bazo.

**Pieza de esplenectomía:** Patrón micronodular, centrado en la pulpa blanca, con un componente interior de linfocitos pequeños que reemplaza el centro germinal con borramiento del manto normal. Este componente está rodeado por una zona periférica de células de pequeño y mediano tamaño con citoplasmas amplios y con blastos salpicados (diferenciación marginal). Se observa infiltración en la pulpa roja en una intensidad variable y con una composición celular semejante a la de la pulpa blanca. Se pueden observar histiocitos epitelioides. Como en otros linfomas de células pequeñas se puede observar diferenciación plasmacítica, con presencia de nidos de células plasmáticas en los centros.

**Ganglio linfático:** Es muy raro la afectación de ganglios periféricos por LEZM. Sin embargo, sí se suelen afectar los ganglios hilio esplénico. En esta muestra el tumor presenta un patrón nodular, con un crecimiento del linfoma alrededor de los centros, reemplazándolos y formado por una composición citológica semejante a la del bazo, pero la diferenciación marginal no es tan evidente.

Cada vez se realiza con más frecuencia el diagnóstico en sangre y/o médula porque está disminuyendo la realización de esplenectomía con fines terapéuticos al utilizarse otras opciones, como rituximab con o sin monoterapia asociada.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

Es importante tener en cuenta que este tumor no tiene un marcador propio, y que rasgos morfológicos descritos en médula, sangre y bazo pueden manifestarse en otros linfomas de células pequeñas cuando infiltran estas localizaciones.

El diagnóstico diferencial se plantea con otros linfomas de células pequeñas:

- Linfoma de células del manto, la expresión de ciclina D1 excluye el diagnóstico de LEZM.
- Linfoma folicular: la coexpresión de folículos de bcl2 y bcl6 favorece el diagnóstico de linfoma folicular. El mayor problema es de LEZM con linfoma folicular BCL2 negativo. En estos casos, el patrón de tinción con Mib1 (anular o diana) en LEZM, frente a localización en centros en LF, y la expresión en esos centros de Bcl6 ayuda al diagnóstico.
- Linfoma linfoplasmacítico. Este diagnóstico se establece principalmente en los casos de LEZM con diferenciación plasmacítica. En estos casos el estudio de mutaciones de MYD88 puede ayudar.
- LLC-B. Este diagnóstico se establece en la mayoría de las ocasiones en sangre periférica y médula ósea. La coexpresión de CD5, CD23 favorece el diagnóstico de LLC. La expresión de LEF1 es otro marcador útil para el diagnóstico de LLC-B frente a LEZM.
- El diagnóstico diferencial con otros linfomas de la zona marginal requiere correlación con los datos clínicos y localización del linfoma.

Es importante diferenciar el LEZM de las poblaciones monoclonales de linfocitos B, con un fenotipo tipo marginal, como las asociadas a hepatitis virus C, procesos autoinmunes como artritis reumatoide, lupus, etc. Para establecer un diagnóstico preciso es necesario una correlación clínico-patológica.

## PANELES DE IHQ

**Panel de primera línea CMF:** CD19, CD20/CD22, CD200, CD11c, CD25, CD123, CD103, kappa, lambda.

**Panel de primera línea IHQ:** CD20, CD3, bcl2, bcl6, SOX11, ciclina D1, CD23, Ki67.

El patrón de tinción con bcl2 y MIB1 ayudan al diagnóstico de este tumor. Bcl2 permite identificar reemplazamiento de centros bcl2 negativos por células tumorales bcl2+. Con Ki67 se puede observar el patrón en diana, con tinción en el centro de las células del centro residuales y en la zona periférica (marginal), o bien patrón anular, destacando las células proliferantes en la zona marginal, cuando se ha producido el reemplazamiento total del centro por el tumor.

No existe un marcador propio de este tumor, por lo que es necesario descartar otros linfomas de células pequeñas con marcadores relativamente específicos como SOX11 y ciclina D1 para excluir linfoma del manto, y bcl6 para excluir linfoma folicular.

**Panel de segunda línea:** Anexina 1, IgD, IGG, LEF1

## CITOGENÉTICA/MOLECULAR

El análisis del gen de las inmunoglobulinas (Ig) ha mostrado el uso selectivo de la familia IGVH1-2 aproximadamente en un tercio de los LEZM.

Los estudios citogenéticos revelan anomalías en el 70-80% de los casos, con cariotipos complejos en un 50%. Entre las anomalías más frecuentes se encuentran las trisomías totales o parciales de los cromosomas 3/3q(25%) y 12q(13%) y deleciones del 6q y del 7q. Ésta última se detecta en el 45% de los casos, siendo excepcional en otros linfomas de células pequeñas. Otras alteraciones citogenéticas descritas son anomalías de 1q, 8q, 9p, 14q, 18q, y deleciones del 17p, ésta última junto con la presencia de cariotipos complejos parecen asociarse a un pronóstico más desfavorable. Estudios de secuenciación masiva han mostrado que los genes más frecuentemente mutados son NOTCH2 en 10-25% y KLF2 en 12-44%.

La ausencia de la t(11;14)(q13;q32) y la t(14;18)(q32;q21) ayudarán a excluir linfoma del manto y linfoma folicular, especialmente cuando solo se disponga de médula ósea y/o sangre periférica. Mutaciones del gen MYD88 son poco frecuentes, hasta 19%, y las mutaciones de BRAF son excepcionales en este tumor; su estudio puede ayudar al diagnóstico diferencial con LPL y tricoleucemia, respectivamente.

## RECOMENDACIONES

1. El diagnóstico se puede establecer en el estudio de muestra de sangre periférica y médula ósea y/o pieza de esplenectomía. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. No es imprescindible el estudio del bazo para establecer el diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. El diagnóstico diferencial con otros linfomas de células pequeñas más relevante clínicamente es con el linfoma del manto, por lo que es necesario excluir este diagnóstico mediante la tinción con SOX11, ciclina D1 y/o estudio de reordenamiento de CCND1 mediante FISH. Grado C. Evidencia nivel IV.
4. La presencia de linfocitos vellosos no es exclusiva de este tumor, otros linfomas de células pequeñas pueden presentar linfocitos vellosos, como linfoma manto, folicular, linfoplasmácítico, o linfoma difuso de la pulpa roja. Grado C. Evidencia nivel IV.
5. La infiltración intrasinusoidal no es exclusiva de este tumor, se puede ver en otros linfomas. Es necesario integrar el resto de datos morfológicos y fenotípicos para hacer un diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV.
6. La diferenciación marginal observada en el bazo no es exclusiva de LEZM, otros linfomas de células pequeñas cuando infiltran el bazo pueden manifestar este aspecto morfológico, por lo

que hay que tener en cuenta otros datos morfológicos y fenotípicos. Grado C. Evidencia nivel IV.

7. En las biopsias de médula ósea es necesario realizar CD20 para detectar la infiltración, a veces no visible con la HE. Grado C. Evidencia nivel IV.
8. El estudio citogenético no es necesario, pero es recomendable dado que puede ser de ayuda en el diagnóstico diferencial. Grado C. Evidencia nivel IV.

## Bibliografía

1. Arcaini L, Rossi D, Paulli M. (2016) "Splenic marginal zone lymphoma: from genetics to management" ( 2016) *Blood* 127(17):2072-81.
2. Parry M, Rose-Zerilli MJ, Ljungström V, Gibson J, Wang J, Walewska R, Parker H, Parker A, Davis Z, Gardiner A, McIver-Brown N, Kalpadakis C, Xochelli A, Anagnostopoulos A, Fazi C, Gonzalez de Castro D, Dearden C, Pratt G, Rosenquist R, Ashton-Key M, Forconi F, Collins A, Ghia P, Matutes E, Pangalis G, Stamatopoulos K, Oscier D, Strefford JC.(2015). "Genetics and Prognostication in Splenic Marginal Zone Lymphoma: Revelations from Deep Sequencing". *Clin Cancer Res.* 21(18):4174-83.
3. Mollejo M, Menárguez J, Guisado-Vasco P, Bento L, Algara P, Montes-Moreno S, Rodríguez-Pinilla MS, Cruz MA, Casado F, Montalbán C, Piris MA. Hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders encompass a broader clinical and morphological spectrum than previously recognized: a clinicopathological study. *Mod Pathol.* 2014 Feb;27(2):281-93
4. Montalban C, Abraira V, Arcaini L, Domingo-Domenech E, Guisado-Vasco P, Iannitto E, Mollejo M, Matutes E, Ferreri AJ, Salar A, Rattotti S, Carpaneto A, Perez R, Bello JL, Hernandez M, Caballero D, Carbonell F, Piris MA; Splenic Marginal Zone Lymphoma Study Group (SMZLSG). Simplification of risk stratification for splenic marginal zone lymphoma: a point-based score for practical use. *Leuk Lymphoma.* 2014 Apr;55(4):929-31.
5. Wotherspoon AC. Extranodal and splenic small B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2013 Jan;26 Suppl 1:S29-41. Review.
6. Piris MA, Arribas A, Mollejo M. Marginal zone lymphoma. *Semin Diagn Pathol.* 2011 May;28(2):135-45. Review.
7. Manuela Mollejo, María S. Rodríguez-Pinilla, M, Santiago Montes-Moreno, Patrocinio Algara, Ahmet Dogan, Juan C. Cigudosa, Rocío Juárez, Teresa Flores, Jerónimo Forteza, Alberto Arribas, Miguel A. Piris. Splenic Follicular Lymphoma. Clinicopathologic Characteristics of a Series of 32 Cases. *Am J Surg Pathol.* 2009 May;33(5):730-8.
8. Salido M, Baro C, Oscier D, Stamatopoulos K, Dierlamm J, Matutes E et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-cell Lymphoma Group. *Blood,* 2010; 116; 1479-1488
9. Swerdlow SH, Campos E, Harris NL, et al. Pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th ed. Lyon: IARC Press, 2008.
10. Matutes E, Oscier D, Montalban C, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia,* 2008;22;487-495
11. Camacho FI, Mollejo M, Mateo MS, Algara P, Navas C, Hernandez JM, Santoja C, Sole F, Sanchez-Beato M, Piris MA. Progression to large B-cell lymphoma in splenic marginal zone lymphoma: a description of a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol* 2001 Oct;25(10):1268-76.



12. Piris MA, Mollejo M, Campo E, Menárguez J, Flores T, Isaacson PG. A marginal zone pattern may be found in different varieties of non-Hodgkin's lymphoma: the morphology and immunohistology of splenic involvement by B-cell lymphoma simulating splenic marginal zone lymphoma. *Histopathology*. 1998 Sep;33(3):230-9.
13. Mollejo M, Lloret E, Menárguez J, Piris MA, Isaacson PG. Lymph node involvement by splenic marginal zone lymphoma: morphological and immunohistochemical features. *Am J Surg Pathol*. 1997 Jul;21(7):772-80.
14. Mollejo M, Menárguez J, Lloret E, Sánchez A, Campo E, Algara P, Cristóbal E, Sánchez E, Piris MA. Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low grade B-cell lymphoma. A clinicopathological study of 13 cases. *Am J Surg Pathol*. 1995 Oct;19(10):1146-57.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B indolentes: Linfomas de la zona marginal: Linfoma de la zona marginal tipo MALT

**Manuela Mollejo Villanueva**

*mmollejov@sescam.jccm.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.*

## **DEFINICIÓN Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD.**

El linfoma de la zona marginal asociado a tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) se caracteriza por una proliferación linfoide con un patrón de crecimiento perifolicular con colonización de los centros germinales y extensión perifolicular. Está formada por linfocitos pequeños, células B monocitoides, plasmáticas en una proporción variable y aislados blastos. En mucosas, los linfocitos infiltran el epitelio y forman las llamadas lesiones linfoepiteliales. Los linfomas MALT representan un 8% de los linfomas B y un 50% de los linfomas primarios gástricos.

En muchos casos de linfomas MALT existen lesiones precursoras. Hay una historia de infiltrado inflamatorio crónico, debido a infección, proceso autoinmune o un estímulo desconocido que produce acúmulo de tejido linfoide en una localización extraganglionar, que posteriormente da lugar al linfoma MALT. Entre estas lesiones precursoras se encuentran gastritis por *Helicobacter pylori*, tiroiditis de Hashimoto o síndrome de Sjögren.

## **TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO**

Biopsia de la localización extraganglionar afecta. Localizaciones más frecuentes: tracto gastrointestinal (gástrica), pulmón, cabeza y cuello, salivar, ocular, piel.

Biopsia de médula ósea: No está indicada en la mayoría de los linfomas MALT, porque un alto porcentaje de casos se presentan en estadios localizados. Cuando hay infiltración, el patrón de infiltración puede ser intersticial, nodular o difuso.

## **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS**

El diagnóstico diferencial se establece por un lado con procesos reactivos y por otro, con otros linfomas B de células pequeñas. El linfoma B de células del manto tiene un tropismo particular por el tracto gastrointestinal y se debe considerar en el diagnóstico diferencial, particularmente si no se

observan lesiones linfoepiteliales. También el linfoma B folicular y sus variantes pueden plantear un diagnóstico diferencial en territorios extraganglionares.

Los datos favorables al diagnóstico de linfoma frente al de proceso reactivo son el patrón infiltrante del componente linfoide, anomalías fenotípicas/citogenéticas, evidencia indirecta de monoclonalidad por restricción de cadenas ligeras y/o estudio molecular de reordenamiento monoclonal de los genes de Ig.

No hay un marcador específico de este linfoma, por lo que es necesario realizar inmunohistoquímica para descartar otros linfomas de células pequeñas.

Hay que tener en cuenta la hiperplasia marginal atípica con restricción de cadenas ligeras, descrita en la infancia, que plantea diagnóstico diferencial con linfoma de la zona marginal.

## PANELES DE IHQ

**Panel de primera línea:** CD20, CD3, ciclina D1, bcl2, bcl6, Mib1, kappa, lambda

**Panel de segunda línea:** SOX11, CD38, IgD, CD23, IRTA1

## CITOGENÉTICA/MOLECULAR

Se han descrito translocaciones asociadas a linfomas MALT, incluyendo la t(11;18)(q21;q21) que implica a API2-MALT1 y las t(1;14) (p22;q32), t(14;18)(q32;q21) y la t(3;14)(p14.1;q32), que desregulan los factores de transcripción BCL10, MALT1 Y FOXP1 respectivamente. Estas alteraciones tienen cierta predisposición a producirse en determinadas localizaciones:

- La t(11;18)(q21;q21)(API2-MALT1) (15-40%) detectada especialmente en MALT gástricos (10-40%), se asocia a una pobre respuesta al tratamiento antibiótico erradicador del *H. pylori* (<5%) y por ello en estos casos debe considerarse la adición de tratamientos alternativos. Esta anomalía también se detecta en MALT pulmonares.
- La t(14;18)(q32;q21)(IGH-MALT1)(20%) se detecta principalmente en linfomas anejos oculares/órbita y glándula salival.
- La t(3;14)(p14.1;q32)( IGH-FOXP1) (<5%) asociado fundamentalmente a MALT de tiroides, anejos oculares/órbita y piel.
- La t(1;14)(p22;q32)(IGH-BCL10) (<5%), detectado fundamentalmente en los MALT gástricos y pulmonares.

Se han descrito deleciones/mutaciones de A20 en el 19%, 8% y 11 % de los linfomas MALT ocular, salival y tiroides respectivamente.

Las trisomías del cromosoma 3 y 18 y las deleciones del 6q, también son frecuentes en este tipo de linfomas, independientemente de la localización anatómica.

Se han descrito mutaciones de MYD88 en el 9%.

## RECOMENDACIONES

1. Las lesiones linfoepiteliales no son específicas de los MALT, se pueden observar en otros linfomas infiltrando epitelios y en condiciones reactivas. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. Hay que recordar que otros linfomas B de célula pequeña pueden presentarse clínicamente infiltrando localizaciones extraganglionares. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. Como otros linfomas B de célula pequeña puede presentar diferenciación plasmacítica, particularmente después de la terapia. Grado C. Evidencia nivel IV.
4. Se pueden observar células grandes salpicadas en la zona marginal, y eso no es sinónimo de linfoma B difuso de células grandes. Solo cuando se observen zonas difusas formadas por células grandes, el diagnóstico será linfoma B difuso de células grandes con un componente de linfoma MALT. Grado C. Evidencia nivel IV.
5. Por la ausencia de marcadores específicos, y por la dificultad de realizar el diagnóstico diferencial con procesos reactivos/precursores, es necesario hacer una correlación clínico-patológica para establecer el diagnóstico definitivo. Grado C. Evidencia nivel IV.
6. En casos en los que no haya evidencia indirecta de monoclonalidad mediante estudio IHQ con cadenas ligeras se recomienda realizar estudio de clonalidad de IG para demostrar objetivamente monoclonalidad. Grado C. Evidencia nivel IV.
7. Los estudios citogenéticos pueden ser de ayuda en el diagnóstico diferencial. En los linfomas MALT gástrico, se recomienda realizar el estudio de  $t(11;18)(q21;q21)(API2-MALT1)$ , ya que esta traslocación predice una pobre respuesta al tratamiento antibiótico. Grado B. Evidencia nivel III.

## Bibliografía

1. Zucca E, Bertoni F. (2016) "The spectrum of MALT lymphoma at different sites: biological and therapeutic relevance". *Blood* 127(17):2082-92.
2. Thieblemont, C., F. Bertoni, C. Copie-Bergman, A. J. Ferreri and M. Ponzoni (2014). "Chronic inflammation and extra-nodal marginal-zone lymphomas of MALT-type." *Semin Cancer Biol* 24: 33-42.
3. Suarez, F., O. Lortholary, O. Hermine and M. Lécuit (2006). "Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation." *Blood* 107(8): 3034-304.
4. Ferreri, A. J., S. Govi and M. Ponzoni (2013). "Marginal zone lymphomas and infectious agents." *Semin Cancer Biol* 23(6): 431-440.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B indolentes: Linfomas de la zona marginal: Linfoma de la zona marginal tipo ganglionar

**Manuela Mollejo Villanueva**

*mmollejov@sescam.jccm.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.*

## DEFINICIÓN Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD

El linfoma de la zona marginal tipo ganglionar (NMZL) es una neoplasia de células B que se asemeja morfológicamente a los ganglios infiltrados por linfoma de la zona marginal tipo MALT o esplénico pero sin afectación de una localización extraganglionar ni del bazo.

Es muy poco frecuente, alrededor del 1,5-1,8% de las neoplasias linfoides. Se han descrito casos asociados a virus de la hepatitis C.

Existe un subtipo clínico-patológico, el linfoma de la zona marginal pediátrico. Se suele presentar en varones, en un estadio clínico inicial y en una sola localización ganglionar. Tienen un curso excelente con baja proporción de recidivas con tratamiento conservador.

## TIPO DE MUESTRA PARA DIAGNÓSTICO

La muestra ideal para el diagnóstico es la biopsia escisional del ganglio linfático afectado. Es muy rara la afectación de médula ósea y sangre periférica.

**Biopsia ganglio:** Muestra una proliferación linfoide con un patrón perifolicular, colonizando centros y con crecimiento en las áreas interfoliculares. La composición citológica es semejante a los otros linfomas de la zona marginal: linfocitos pequeños, células plasmáticas, linfocitos con diferenciación marginal y aislados blastos. La tinción para dendríticas destaca el patrón nodular con centros residuales.

## TIPO DE ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS REQUERIDOS PARA LA ESTADIFICACIÓN

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección para la estadificación de todos los casos de LZMG. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro y estudios inmunofenotípicos y de citogenética/FISH (estos en caso de que se demuestre infiltración por citometría de flujo-morfología

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico diferencial se plantea especialmente con el linfoma folicular, linfoma linfoplasmacítico y con la infiltración ganglionar por un linfoma de la zona marginal tipo MALT o esplénico.

Por otro lado, se plantea diagnóstico diferencial con hiperplasias foliculares reactivas.

## PANELES DE IHQ

No existe un marcador propio de este linfoma, para establecer el diagnóstico hay que excluir marcadores de otros linfomas y utilizar los que destaquen el patrón arquitectural.

**Panel de primera línea:** CD20, CD3, bcl2, bcl6, ciclina D1, CD23, MIB1.

**Panel de segunda línea:** SOX11, IgD, kappa, lambda, MNDA.

## CITOGENÉTICA/MOLECULAR

No existe marcador específico de este tumor. No son frecuentes las traslocaciones descritas en los linfomas marginales MALT ni la del7q31-32 del linfoma esplénico de la zona marginal. Entre las anomalías más frecuentemente detectadas se encuentran las trisomías de los cromosomas 3, 7, 12 y 18 y las traslocaciones del cromosoma 1.

En ocasiones puede ser necesario la demostración de clonalidad por PCR para confirmar el diagnóstico de linfoma de la zona marginal y diferenciarlo de proceso reactivo.

Estudios de secuenciación masiva han identificado mutaciones del gen PTPRD (14,3%), como un nuevo marcador de este tipo de linfoma, y la presencia de mutaciones somáticas de genes descritos en LEZM como NOTCH2 (20%) y de KLF2 (14,3%).

## RECOMENDACIONES

1. La biopsia escisional del ganglio es necesaria para el diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. Por la ausencia de marcadores propios, hay que incluir en el panel de inmunohistoquímica SOX11, ciclina D1 y bcl6 para excluir linfoma del manto y linfoma B folicular. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. La presencia de folículos es constante, y la tinción para dendríticas (CD21/CD23) destacan el patrón nodular del tumor con la existencia de centros germinales reemplazados por el tumor. Grado C. Evidencia nivel IV.
4. Correlacionar con la historia clínica para descartar infiltración de órgano extraganglionar o esplénica. Grado C. Evidencia nivel IV.



5. Diferenciación marginal se puede observar en linfomas foliculares. Grado C. Evidencia nivel IV.
6. Cuando presenta diferenciación plasmacítica y plantea diagnóstico diferencial con LPL, se puede realizar un diagnóstico de linfoma B de células pequeñas con diferenciación plasmacítica y proponer las diferentes opciones. Grado C. Evidencia nivel IV.
7. El número de células grandes que se ven en los LZM ganglionares suele ser mayor que en los otros tipos, MALT y esplénico. Sin embargo, para considerarlo un linfoma B difuso de células grandes tienen observarse un patrón difuso formado por masas o nidos de células grandes sin el patrón nodular del LZM. Grado C. Evidencia nivel IV.

## Bibliografía

1. Spina V, Khiabani H, Messina M, Monti S, Cascione L, Brusca A, Spaccarotella E, Holmes AB, Arcaini L, Lucioni M, Tabbò F, Zairis S, Diop F, Cerri M, Chiaretti S, Marasca R, Ponzoni M, Deaglio S, Ramponi A, Tiacchi E, Pasqualucci L, Paulli M, Falini B, Inghirami G, Bertoni F, Foà R, Rabadan R, Gaidano G, Rossi D. (2016) "The genetics of nodal marginal zone lymphoma". *Blood* 128(10):1362-73
2. Van den Brand M, van der Velden WJ, Diets IJ, Ector GI, de Haan AF, Stevens WB, Hebeda KM, Groenen PJ, van Krieken HJ. (2016) "Clinical features of patients with nodal marginal zone lymphoma compared to follicular lymphoma: similar presentation, but differences in prognostic factors and rate of transformation". *Leuk Lymphoma* 57(7):1649-56
3. Van den Brand M, van Krieken JH. Recognizing nodal marginal zone lymphoma: recent advances and pitfalls. A systematic review. *Haematologica*. 2013 Jul;98(7):1003-13.
4. Angelopoulou MK, Kalpadakis C, Pangalis GA, Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP. Nodal marginal zone lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2013 Nov 12.
5. Dreyling M, Thieblemont C, Gallamini A, et al. ESMO Consensus conferences: guidelines on malignant lymphoma. part 2: marginal zone lymphoma, mantle cell lymphoma, peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol*, 2013; 24: 857-87
6. Traverse-Glehen A, Bertoni F, Thieblemont C, Zucca E, Coiffier B, Berger F, Salles G. Nodal marginal zone B-cell lymphoma: a diagnostic and therapeutic dilemma. *Oncology (Williston Park)*. 2012 Jan;26(1):92-9, 103-4. Review
7. Kanellis G, Roncador G, Arribas A, Mollejo M, Montes-Moreno S, Maestre L, Campos-Martin Y, Ríos Gonzalez JL, Martínez-Torrecedrera JL, Sanchez-Verde L, Pajares R, Cigudosa JC, Martín MC, Piris MA Identification of MNDA as a new marker for nodal marginal zone lymphoma. *Leukemia*. 2009 23(10):1847-57. PMID: 19474799
8. Mollejo M, Camacho FI, Algara P, Ruiz-Ballesteros E, García JF, Piris MA. Nodal and splenic marginal zone B cell lymphomas. *Hematol Oncol*. 2005 Sep-Dec;23(3-4):108-18. Review.
9. FI Camacho, P Algara, M Mollejo, JF García, C Montalbán, N Martínez, M Sánchez-Beato, MA Piris. Nodal marginal zone lymphoma: a heterogeneous tumor. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 762-771.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B indolentes: Linfoma linfoplasmacítico

**Manuela Mollejo Villanueva**

*mmollejov@sescam.jccm.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.*

## DEFINICIÓN

El linfoma linfoplasmacítico (LPL) es una neoplasia de células B maduras formada por linfocitos pequeños, plasmáticas y linfocitos plasmocitoides que no cumplen los criterios de otros linfomas B de células pequeñas, que pueden presentar diferenciación plasmacítica. Afecta médula ósea, bazo y menos frecuentemente ganglio linfático. Es frecuente la presencia de paraproteína, generalmente IgM. Macroglobulinemia de Waldenstrom (MW) se define como un LPL con infiltración de médula ósea y producción de componente monoclonal IgM, independientemente de su cantidad y de que haya o no sintomatología. Anemia, trombopenia, leucopenia puede observarse por infiltración medular y raramente por hiperesplenismo. Otros síntomas-signos que se pueden detectar en estos pacientes, en parte relacionados con la paraproteína sérica son la neuropatía, organomegalias, visceromegalias, citopenias, amiloidosis y crioglobulinemia. Hay casos asociados al virus de la hepatitis C.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se establece más frecuentemente en sangre periférica y biopsia de médula ósea y/o en ganglio linfático.

**Sangre periférica:** Frecuentemente muestra *rouleaux*. Se observan linfocitos pequeños, linfoplasmocitoides y células plasmáticas.

**Biopsia médula ósea:** Muestra un infiltrado paratrabecular, intersticial, difuso y/o nodular por linfocitos pequeños, células linfoplasmocitoides y plasmáticas. Se pueden observar cuerpos de Russell (inclusiones citoplasmáticas de Ig, PAS positivas), o cuerpos de Dutcher (inclusiones nucleares). Se pueden observar aislados blastos, pero no centros de proliferación. Se ven frecuentes mastocitos. No se suele ver ni la infiltración intrasinusoidal, como en linfomas esplénicos de la zona marginal, ni centros germinales residuales. Para establecer el diagnóstico de LPL/MW es obligado el estudio de la médula ósea (aspirado y biopsia).

**Ganglio linfático:** Proliferación linfoide con un patrón vagamente nodular, con centros germinales residuales, y formada por el mismo tipo celular que en médula ósea y sangre periférica. No es raro observar histiocitos epitelioides,

**Bazo:** Es muy raro que se realice el diagnóstico en el bazo. Presenta un infiltrado con las mismas características que en el resto de los órganos, y localizado preferentemente en la pulpa roja.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico de LPL es un diagnóstico de exclusión, ya que otros linfomas B de células pequeñas pueden mostrar diferenciación plasmácica, por tanto es necesario descartar otros linfomas antes de hacer el diagnóstico de LPL. El diagnóstico que más dificultad plantea es el linfoma de la zona marginal.

Por otro lado, el diagnóstico diferencial hay que establecerlo con las proliferaciones linfoplasmáticas monoclonales asociadas/ o no al virus de la hepatitis C (gammapatía monoclonal de significado incierto IgM). No se conocen los factores de riesgo que determinan la progresión de linfocitosis linfoplasmáticas monoclonales a evidentes linfomas.

## PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) e HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA (HIS-C).

**Panel de primera línea CMF:** CD20, CD22, CD138, CD23, CD5, CD25, CD103, sIgMlg, CD10.

**Panel de primera línea IHQ:** CD20, CD3, CD138, CD38, kappa, lambda, ciclina D1.

**Paneles de segunda línea:** CD56.

## CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

La deleción de 6q es frecuente (aprox. 30%), pero no tiene mucho impacto clínico y escaso en el diagnóstico diferencial (aunque menos frecuente, también se observa en otros síndromes linfoproliferativos).

La mutación L265P del gen MYD88 es muy frecuente en casos de MW (>95%) y GMSI-IgM (50-90%), aunque se ha descrito con muy escasa frecuencia en el resto de los LPL. Esta mutación es de gran utilidad para el diagnóstico diferencial, ya que no está presente en otras neoplasias linfoides, salvo en un 15-20% de los linfomas difusos de célula grande (especialmente de tipo no centro germinal en localizaciones extraganglionares), el 20% de los linfomas B de la zona marginal esplénico y en apenas un 2% de las leucemias linfoides crónicas. Las mutaciones del gen CXCR4 se detectan en un 25-30% de los casos de MW, y aún no han sido descritas en otras neoplasias linfoides.

En ocasiones puede ser necesario realizar FISH para t(11;14) y t(14;18) para excluir linfoma del manto y linfoma folicular respectivamente, que nunca aparecen en el LPL.

## RECOMENDACIONES

1. Cuando no se pueda establecer un diagnóstico preciso de LPL, se aconseja diagnosticarlo de linfoma B de células pequeñas con diferenciación linfoplasmocítica y establecer posibles diagnósticos diferenciales. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. La detección de la mutación MYD88/L265P se ha demostrado de utilidad en el diagnóstico diferencial de procesos linfoproliferativos B de bajo grado en muestras de MO y ganglio linfático de modo que su presencia apoya el diagnóstico de LPL y MW. Grado B, nivel de evidencia III.
3. El diagnóstico de MW requiere la identificación de un componente monoclonal IgM en suero, junto con la evidencia de infiltración medular significativa en la biopsia ósea. En las muestras de aspirado de MO se establece un punto de corte del 10% de linfoplasmocitos para el diagnóstico de LPL. La expresión sIgM, CD20, CD19, CD25 y CD22 débil con ausencia de CD5, CD23 y CD10 es altamente sugerente de LPL/MW. Grado C. Evidencia nivel IV.
4. La presencia de componente monoclonal IgM, en ausencia de infiltrado significativo en la biopsia ósea y signos o síntomas clínicos marca el diagnóstico de Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto tipo IgM. Grado C. Evidencia nivel IV.

## Bibliografía

1. Castillo JJ, Garcia-Sanz R, Hatjiharissi E, Kyle RA, Leleu X, McMaster M, Merlini G, Minnema MC, Morra E, Owen RG, Poulain S, Stone MJ, Tam C, Varettoni M, Dimopoulos MA, Treon SP, Kastritis E.(2016) "Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenström Macroglobulinaemia: A Task Force From the 8th International Workshop on Waldenström Macroglobulinaemia". *Br J Haematol.* 175(1):77-86.
2. Bassarova A, Trøen G, Spetalen S, Micci F, Tierens A, Delabie J. (2015). "Lymphoplasmacytic lymphoma and marginal zone lymphoma in the bone marrow: paratrabecular involvement as an important distinguishing feature". *Am J Clin Pathol.* 143(6):797-806.
3. Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR.(2014)"Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia". *Blood.* 123(18):2791-6.
4. Mollejo M, Menárguez J, Guisado-Vasco P, Bento L, Algara P, Montes-Moreno S, Rodríguez-Pinilla MS, Cruz MA, Casado F, Montalbán C, Piris MA. (2014) "Hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders encompass a broader clinical and morphological spectrum than previously recognized: a clinicopathological study". *Modern Pathol.* 27(2):281-93.
5. Jiménez C; Sebastián E; Del Carmen Chillón M; Giraldo P; Mariano Hernández J; Escalante F; González-López TJ; Aguilera C; de Coca AG; Murillo I; Alcoceba M; Balanzategui A; Eugenia Sarasquete M; Corral R; Marín LA; Paiva B; Ocio EM; Gutiérrez NC; González M; San Miguel JF; García-Sanz R.(2013). MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia.* 27:1722-8.
6. Gachard, N., Parrens M, Soubeyran, B, Petit B, Marfak A, Rizzo D, Devesa M, Delage-Corre M, Coste V, Laforet MP, Mascarel A, Merlio JP, Bouabdalla K, Milpied N, Soubeyral P, Schmitt A, Bordessoule D, Cogne M and Feuillard J (2013). "IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas". *Leukemia* 27(1):183-189.
7. Ondrejka S, Lin JJ, Warden DW, Durkin L, Cook JR, and Hsi ED (2013). "MYD88 L265P somatic mutation: its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders". *Am J Clin Pathol* 140 (3): 387-394.

8. Varettoni, M., L. Arcaini, S. Zibellini, E. Boveri, S. Rattotti, R. Riboni, A. Corso, E. Orlandi, M. Bonfichi, M. Gotti, C. Pascutto, S. Mangiacavalli, G. Croci, V. Fiaccadori, L. Morello, M. L. Guerrero, M. Paulli and M. Cazzola (2013). "Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms." *Blood* 121(13): 2522-2528.
9. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, Sheehy P, Manning RJ, Patterson CJ, Tripsas C, Arcaini L, Pinkus GS, Rodig SJ, Sohani AR, Harris NL, Laramie JM, Skifter DA, Lincoln SE, Hunter ZR. (2012) "MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia". *N Engl J Med.* 367(9):826-33.
10. Swerdlow SH CE, H. N., Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.

# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B indolentes: Otros procesos linfoproliferativos: Leucemia de células peludas

**Manuela Mollejo Villanueva**

*mmollejov@sescam.jccm.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.*

## DEFINICIÓN Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD

La leucemia de células peludas (LCP) es un proceso linfoproliferativo caracterizado por esplenomegalia, infiltración de médula ósea y presencia en sangre periférica y aspirados de médula ósea de células con prolongaciones citoplasmáticas «peludas». Los pacientes presentan síntomas por pancitopenia, esplenomegalia o infecciones.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se establece normalmente en muestra de sangre periférica y médula ósea.

**Sangre periférica:** Se puede observar macrocitosis, pancitopenia, y monocitopenia. Las células peludas tienen núcleos de mediano tamaño y citoplasmas amplios con prolongaciones. No muestran nucléolo prominente.

**Biopsia médula ósea:** Típicamente los aspirados son secos por la fibrosis en la médula, siendo la biopsia de la médula una localización típica para el diagnóstico. El grado de infiltración es variable, desde un infiltrado intersticial con conservación de la arquitectura y del tejido adiposo hasta una infiltración difusa con borramiento de la arquitectura normal, por una proliferación de linfocitos de pequeño-mediano tamaño con citoplasmas amplios y claros. La infiltración de la médula por LCP no suele formar nódulos como ocurre en la infiltración de la médula por otros linfomas.

**Bazo:** Se observa una infiltración difusa en la pulpa roja por una proliferación de linfocitos con citoplasmas claros y núcleos ovoideos. La pulpa blanca suele ser atrófica. Es frecuente observar lagos venosos.

**Ganglio linfático:** No suelen estar infiltrados y raramente se reciben para diagnóstico. El grado de infiltración es variable, y la morfología de las células es similar a la descrita en bazo

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico diferencial se establece principalmente con la LCP variante, el LEZM y el linfoma esplénico difuso de la pulpa roja.

El patrón de infiltración de la médula ósea más frecuente es intersticial, respetando la arquitectura, requiriendo en esas circunstancias la realización de técnicas de inmunohistoquímica para el diagnóstico (CD20).

## PANELES DE IHQ

Las células de la LCP expresan TRAP, a diferencia de los otros procesos linfoproliferativos con los que se plantea diagnóstico diferencial.

**Panel de primera línea CMF:** CD20/CD22, CD11c, CD25, CD103, CD123, kappa y lambda.

**Panel de primera línea IHQ:** CD20, CD3, Anexina1, BRAFV600E (clon VE1).

**Panel de segunda línea:** IgD, DBA44, ciclina D1.

## CITOGENÉTICA/MOLECULAR

Se ha descrito la presencia de la mutación V600E en casi el 100% de los casos de LCP. Esta mutación es un marcador diagnóstico en la LCP y un potencial marcador de selección de terapia dirigida.

## RECOMENDACIONES

1. El estudio de sangre periférica y médula ósea son las localizaciones donde se realiza normalmente el diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. CD11c, CD25, CD103, CD123 son recomendados cuando se sospecha LCP. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. El estudio de la presencia de la mutación de BRAF es recomendable aunque no imprescindible en el momento actual para el diagnóstico de LCP. Grado C. Evidencia nivel IV.
4. La morfología de las células con citoplasmas amplios y claros hace sospechar el diagnóstico de LCP. Grado C. Evidencia nivel IV.
5. Las prolongaciones citoplasmáticas se observan en los extendidos de sangre periférica, pero no en los realizados de médula ni de bazo. Grado C. Evidencia nivel IV.
6. La fuerte expresión de TRAP es casi exclusiva de la LCP. Grado C. Evidencia nivel IV.
7. En relación a la valoración de la expresión de Anexina 1 en la médula ósea hay que tener en cuenta que también marca células mieloides y algunos linfocitos T, pero no se ha descrito en otros linfomas B. Grado C. Evidencia nivel IV.



## Bibliografía

1. Grever MR, Abdel-Wahab O, Andritsos LA, Banerji V, Barrientos J, Blachly JS, Call TG, Catovsky D, Dearden C, Demeter J, Else M, Forconi F, Gozzetti A, Ho AD, Johnston JB, Jones J, Juliusson G, Kraut E, Kreitman RJ, Larratt L, Lauria F, Lozanski G, Montserrat E, Parikh SA, Park JH, Polliack A, Quest GR, Rai KR, Ravandi F, Robak T, Saven A, Seymour JF, Tadmor T, Tallman MS, Tam C, Tiaci E, Troussard X, Zent CS, Zenz T, Zinzani PL, Falini B. (2016) "Consensus guidelines for the diagnosis and management of patients with classic hairy cell leukemia". *Blood* 2016. Nov 30. pii: blood-2016-01-689422
2. Robak T, Matutes E, Catovsky D, Zinzani PL, Buske C; ESMO Guidelines Committee. "Hairy cell leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up". *Ann Oncol.* 2015 Sep;26 Suppl 5:v100-7.
3. Shao H, Calvo KR, Grönborg M, Tembhare PR, Kreitman RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. *Leuk Res.* 2013
4. Jones G, Parry-Jones N, Wilkins B, Else M, Catovsky D; British Committee for Standards in Haematology. Revised guidelines for the diagnosis and management of hairy cell leukaemia and hairy cell leukaemia variant\*. *Br J Haematol.* 2012 Jan;156(2):186-95.
5. Summers TA, Jaffe ES. Hairy cell leukemia diagnostic criteria and differential diagnosis. *Leuk Lymphoma.* 2011 Jun;52 Suppl 2:6-10.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B indolentes: Otros procesos linfoproliferativos: Linfoma B esplénico de células pequeñas, difuso de la pulpa roja

**Manuela Mollejo Villanueva**

*mmollejov@sescam.jccm.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.*

## DEFINICIÓN Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD

El linfoma B de células pequeñas esplénico difuso de la pulpa roja (LEDPR) es una entidad provisional incluida en la última edición de la clasificación de linfomas de la OMS. Es un linfoma que afecta médula ósea, sangre periférica y bazo. Es un linfoma muy poco frecuente, representa menos del 10% de los linfomas B diagnosticados en el bazo. Se caracteriza por una infiltración de la pulpa roja por una población monótona de linfocitos pequeños B.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

Como el propio nombre indica, el diagnóstico estándar requiere el examen del bazo, pero por las características de la infiltración de la médula y en sangre periférica se puede sugerir el diagnóstico.

**Sangre periférica:** Se observa una población linfoide homogénea de linfocitos de pequeño-mediano tamaño, con núcleos redondo u oval y citoplasmas basófilos con prolongaciones «vellosas». Los nucléolos no son prominentes. Se observan células linfoplasmocitoides y ocasionalmente linfocitos grandes con nucléolos prominentes en casos de progresión/transformación

**Médula ósea:** Típicamente se observa una infiltración intrasinusoidal, acompañada con un infiltrado intersticial y/o nodular de variable intensidad.

**Bazo:** Morfológicamente el bazo muestra una infiltración difusa en la pulpa roja, a nivel sinusoidal y cordonal, de linfocitos pequeños. La pulpa blanca suele estar atrófica.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico diferencial se establece básicamente con el LEZM, LCP y con la LCP variante.

La infiltración de la médula y de la sangre periférica puede ser semejante al LEZM. Sin embargo, el examen del bazo es diferente, no observándose ni citología bifásica, ni diferenciación marginal ni reemplazamiento folicular.

El diagnóstico diferencial con la LCP se basa en la morfología (diferente patrón de prolongaciones vellosas, ausencia de fibrosis en médula), fenotipo (ausencia de anexina1, CD25, TRAP en el difuso) y molecular (ausencia de mutaciones de BRAF).

El diagnóstico diferencial con la LCP variante se basa básicamente en la ausencia de nucléolo en el LEDPR y menor grado de linfocitosis. En cualquier caso, hay cierto solapamiento entre ambas entidades.

Recientemente se ha descrito que la ciclina D3 es expresada en la mayoría de los LEDPR, siendo un marcador útil para realizar el diagnóstico de esta entidad.

## PANELES DE IHQ

**Panel primera línea CMF:** CD20/CD22, CD25, CD103, CD123.

**Panel primera línea IHQ:** CD20, CD3, IgG, ciclina D1.

**Panel de segunda línea:** Anexina 1, IgD, BRAFV600E (clonVE1), ciclina D3.

## CITOGENÉTICA/MOLECULAR

No hay alteraciones citogenéticas ni moleculares propias de este tumor. Se ha descrito alteraciones de TP53 con aumento de la expresión proteica en un 29% de los casos. A diferencia del LEZM, solo es ocasional la presencia de del7q. Los estudios de secuenciación masiva han mostrado mutaciones somáticas de MAP2K1, p53, NOTCH2 y CCND3 en esta entidad.

## RECOMENDACIONES

1. En caso de duda de diagnóstico, es preferible denominarlo linfoma esplénico B, no clasificable. Grado C. Evidencia nivel IV.

## Bibliografía

1. Curiel-Olmo S, Mondejar R, Almaraz C, Mollejo M, Cereceda L, Mares R, Derdak S, Campos-Martin Y, Batlle A, Gonzalez de Villambrosia S, Gut M, Blanc J, Traverseglehen A, Verney A, Baseggio L, Camacho FI, Wotherspoon A, Stamatopoulos K, Xochelli A, Papadaki T, Kanellis G, Ponzoni M, Garcia-Cosio M, Vaque JP, Beltran S, Gut I, Piris MA, Martinez N. Splenic diffuse red pulp small-B cell lymphoma displays increased expression of cyclin D3 and recurrent CCND3 mutations. *Blood* 2017.
2. Ponzoni M, Kanellis G, Pouliou E, Baliakas P, Scarfò L, Ferreri AJ, Doglioni C, Bikos V, Dagklis A, Anagnostopoulos A, Ghia P, Stamatopoulos K, Papadaki T. Bone marrow histopathology in the diagnostic evaluation of splenic marginal-zone and splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: a reliable substitute for spleen histopathology? *Am J Surg Pathol*. 2012 Nov;36(11):1609-18
3. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Salles G, Coiffier B, Felman P, Berger F. Splenic diffuse red pulp small-B cell lymphoma: toward the emergence of a new lymphoma entity. *Discov Med*. 2012 Apr;13(71):253-65. Review.

4. Kanellis G, Mollejo M, Montes-Moreno S, Rodriguez-Pinilla SM, Cigudosa JC, Algara P, Montalban C, Matutes E, Wotherspoon A, Piris MA. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: revision of a series of cases reveals characteristic clinico-pathological features. *Haematologica*. 2010 Jul;95(7)
5. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC, Morel D, Gazzo S, Ffrench M, Verney A, Rolland D, Thieblemont C, Magaud JP, Salles G, Coiffier B, Berger F, Felman P. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood*. 2008
6. Mollejo M, Algara P, Mateo MS, Sánchez-Beato M, Lloret E, Medina MT, Piris MA. Splenic small B-cell lymphoma with predominant red pulp involvement: a diffuse variant of splenic marginal zone lymphoma? *Histopathology*. 2002 Jan;40(1):22-30.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B indolentes: Otros procesos linfoproliferativos: Leucemia de células peludas, variante

**Manuela Mollejo Villanueva**

*mmollejov@sescam.jccm.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Virgen de la Salud, Toledo.*

## DEFINICIÓN Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD

La Leucemia de células peludas variante (LCPv) es una proliferación linfoide B que recuerda a la LCP pero que difiere en que muestra células con prominente nucléolo (variante prolinfocítica de LCP), son CD25-, TRAP -, anexina 1- y no responden a la terapia habitual de la LCP con cladribina. A pesar del nombre, ambas entidades no están relacionadas biológicamente. Está incluida en la OMS como una entidad provisional. Es un proceso linfoproliferativo muy poco frecuente, que afecta sangre periférica, médula ósea y bazo. Suele presentar leucocitosis.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se realiza en sangre periférica.

**Sangre periférica:** La mayoría de las células son grandes, con prolongaciones, y nucléolos prominentes, que semejan prolinfocitos. El fenotipo por CMF es CD25-, CD103-, CD11c+, CD123+ (40%), con un score CLL de 0-1.

**Médula ósea:** El infiltrado de la médula ósea es intersticial e intrasinusoidal, requiriendo la realización de inmunohistoquímica (CD20) para su diagnóstico.

**Bazo:** El patrón de infiltración es en la pulpa roja, con atrofia de la pulpa blanca.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico diferencial se establece con la LCP, LEDPR y LEZM.

A diferencia de la LCP los aspirados de la médula ósea no son secos por la ausencia de fibrosis reticulínica.

## PANELES DE IHQ

Marcadores positivos son DBA44, CD11c, Inmunoglobulinas de superficie (frecuentemente IgG), CD103 y FMC7.

**Panel de primera línea CMF:** CD20, CD103, CD123, CD25, CD11c

**Panel de primera línea IHQ:** CD20, CD3, Anexina1, BRAFV600E

**Panel de segunda línea:** IgD, IgG, DBA44

## CITOGENÉTICA/MOLECULAR

No se conocen alteraciones citogenéticas/moleculares específicas de este tumor. Se han descrito mutaciones de TP53 en un 30% de los casos y mutaciones de MAP2K1 en un 50% de LCPv. La mutación BRAFV600E descrita en la LCP no se da en la LCPv.

## RECOMENDACIONES

1. Es una enfermedad excepcional, que a pesar del nombre, no está relacionada con la leucemia de células peludas. La presencia de nucléolo prominente es un rasgo distintivo de esta entidad. Aunque en algunos casos sean nucléolos pequeños, se observan en todos los casos. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. Para su diagnóstico es preciso demostrar un fenotipo atípico para LCP. Grado B. Nivel de evidencia III.
3. Es necesario realizar estudio IHQ con Anexina1 y BRAFV600E para descartar una LCP clásica.

## Bibliografía

1. Waterfall JJ, Arons E, Walker RL, et al. High prevalence of MAP2K1 mutations in variant and IGHV4-34-expressing hairy-cell leukemias. *Nat Genet* 2014; 46:8–10.
2. Shao H, Calvo KR, Grönborg M, Tembhare PR, Kreitman RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. *Leuk Res.* 2013 Apr;37(4):401-9
3. Jones G, Parry-Jones N, Wilkins B, Else M, Catovsky D; British Committee for Standards in Haematology. Revised guidelines for the diagnosis and management of hairy cell leukaemia and hairy cell leukaemia variant\*. *Br J Haematol.* 2012 Jan;156(2):186-95
4. Hockley SL, Else M, Morilla A, Wotherspoon A, Dearden C, Catovsky D, Gonzalez D, Matutes E. The prognostic impact of clinical and molecular features in hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma. *Br J Haematol.* 2012 Aug;158(3):347-54.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B agresivos: Linfoma de Burkitt

**Santiago Montes Moreno**

*santiago.montes@scsalud.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

## DEFINICIÓN

El linfoma de Burkitt (LB) es un linfoma B compuesto de células de tamaño mediano, monomorfo que se suele presentar en localizaciones extraganglionares y pacientes en edad pediátrica (30-50% de los linfomas de la infancia, 1-2% de los linfomas en nuestro medio [1]) y jóvenes o inmunodeprimidos. Este tipo de neoplasia se caracteriza molecularmente por traslocaciones aisladas de MYC (habitualmente con IGH o cadenas ligeras, IGL (22q11) o IGK (2p12)) que constituye un requisito para el diagnóstico [1].

El LB es una enfermedad potencialmente curable, especialmente las formas endémicas y esporádicas. Después del tratamiento con quimioterapia de combinación intensiva a altas dosis las tasas de curación alcanzan el 80-90% incluso en pacientes con enfermedad diseminada. Son marcadores de mal pronóstico la afectación del SNC y MO, masas >10 cm no resecables y LDH sérica muy elevada [1].

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA ESTABLECER EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección.

**Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la aproximación a utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo *Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico*.

## TIPO DE ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS REQUERIDOS PARA LA ESTADIFICACIÓN

**Análisis de LCR:** Debe de realizarse siempre. El SNC se encuentra afecto por LB en aproximadamente un 20% de los casos de LB. El diagnóstico en LCR requiere excluir contaminación por SP y la demostración por CMF de una población B clonal [2].

**Biopsia-cilindro aspirado de médula ósea:** Es el método de elección para la estadificación de todos los casos de LB. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en

estos casos y se requiere una biopsia cilindro además de estudios inmunofenotípicos y de citogenética/FISH.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

Los casos de LB plantean el diagnóstico diferencial con neoplasias hematolinfoides y no linfoides, especialmente en edades pediátricas (Sarcoma de Ewing, por ejemplo). Entre las neoplasias hematolinfoides es esencial establecer el diagnóstico diferencial con leucemia/linfoma linfoblástico de precursores B o T, leucemia mieloide aguda indiferenciada o mínimamente diferenciada, linfoma B de células del manto (variante blastoide), linfoma B de alto grado doble/triple hit, Linfoma B Difuso de Células grandes con reordenamientos aislados de MYC y linfoma B con alteraciones en 11q (ganancias intersticiales en 11q23.2-23.3 y pérdidas de 11q24.1-ter y usualmente ausencia de traslocación de MYC, que presenta morfologías Burkitt-like, de alto grado y de tipo LBDCG convencional) [3].

## PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) E HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA (HIS-C)

El linfoma de Burkitt se caracteriza por mostrar un fenotipo B con expresión uniforme de marcadores de fenotipo centro germinal como CD10 y BCL6. Se observa expresión de IgM de superficie y negatividad para BCL2 y TdT. El índice proliferativo es virtualmente del 100% pero las condiciones de procesamiento de tejido pueden artefactar la cuantificación de la expresión de este marcador [2]. La sobreexpresión de C-MYC en un porcentaje significativo de la celularidad tumoral es la norma en LB y se asocia con la presencia de traslocaciones del gen, tanto en LB como en LBDCG [4,5]. Así, la sobreexpresión de c-Myc en más del 70% de la celularidad neoplásica tiene una sensibilidad y valor predictivo negativo del 100% y una especificidad del 93% con valor predictivo positivo del 85% en relación con la presencia de traslocaciones de MYC en linfomas B agresivos [4]. En el mismo sentido, la ausencia de expresión de LMO2 se ha relacionado con la presencia de traslocaciones de MYC en linfomas B de alto grado, con elevada sensibilidad y especificidad [6].

**Panel de primera línea IHQ:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, Ki-67, BCL2, BCL6, TdT, C-MYC.

**Panel de primera línea CMF:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, CD5, CD19, TdT, kappa, lambda [7].

**Panel de segunda línea:** HIS para EBV-EBER.

## CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

La detección de reordenamientos de MYC mediante FISH con sondas de tipo BA es de elección para el diagnóstico de LB. En casos negativos para este gen mediante sondas BA se recomienda realizar DF FISH para detectar el reordenamiento [2]. Existe no obstante un porcentaje de casos (<10%) de LB típico en los que no se detecta reordenamiento de MYC mediante FISH [1].

El estudio de traslocaciones de BCL2 y BCL6 debe hacerse en todos los linfomas sugestivos de Burkitt del adulto. La ausencia de reordenamientos de BCL2 y BCL6 es un requisito para el diagnóstico de LB. También debe realizarse FISH de BCL2 y BCL6 en los pacientes con histologías y/o fenotipos atípicos, incluso en edad pediátrica, tales como aquellos que presentan expresión inmunohistoquímica de BCL2. En estos casos se requiere la demostración de un reordenamiento aislado de MYC, sin que simultáneamente presenten reordenamiento de BCL2 o BCL6, para el diagnóstico de LB.

El estudio de cariotipo debe intentar realizarse siempre que exista muestra suficiente, especialmente en aquellos casos con histologías dudosas. Los cariotipos en el LB suelen ser **NO complejos**. En el 40% de los casos la traslocación IG-MYC es la única anomalía citogenética. En el resto de los casos se detectan anomalías adicionales siendo las más frecuentes las ganancias del 1q, 7q y

pérdidas del 6q,13q32-34 y 17p. Cariotipos complejos deben hacernos dudar del diagnóstico de LB. Se ha descrito un perfil molecular del linfoma de Burkitt basado en análisis de la expresión génica [8,9]. El linfoma de Burkitt molecular se caracteriza por sobreexpresión de genes relacionados con c-Myc y cariotipos simples con translocaciones de MYC como única anomalía citogenética. La correlación del perfil molecular con la morfología es baja y actualmente no se aplica para diagnóstico rutinario. Recientemente se han descrito mutaciones somáticas en MYC, ID3, GNA13, RET, PIK3R1, ARID1A y SMARCA4 entre otros [10]. La presencia de mutaciones en ID3 (en el 34% de los casos) no se encuentra en casos de DLBCL. No obstante, la utilidad de estos marcadores para el diagnóstico, pronóstico o selección de terapia está por determinar.

## RECOMENDACIONES

1. En todos los pacientes debe hacerse biopsia de médula ósea y estudio del LCR para estadiaje. (Grado B, nivel de evidencia III).
2. Panel de primera línea IHQ: CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, Ki-67, BCL2, BCL6, TdT, c-Myc. (Grado C, nivel de evidencia IV).
3. Panel de primera línea CMF: CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, CD5, CD19, TdT, kappa, lambda. (Grado C, nivel de evidencia IV).
4. Panel de segunda línea: HIS para EBV-EBER. (Grado C, nivel de evidencia IV).
5. La detección de reordenamientos de MYC mediante FISH con sondas de tipo BA es de elección para el diagnóstico de LB. En casos negativos se recomienda realizar el estudio de reordenamiento IGH-MYC con sondas DF FISH para detectar el reordenamiento. (Grado C, nivel de evidencia IV).
6. El estudio de traslocaciones de BCL2 y BCL6 debe hacerse en todos los linfomas sugestivos de Burkitt del adulto y casos con hallazgos histopatológicos y fenotípicos atípicos. (Grado C, nivel de evidencia IV).
7. Se requiere la demostración de un reordenamiento aislado de MYC, sin que simultáneamente presenten reordenamiento de BCL2 o BCL6, para el diagnóstico de LB. (Grado C, nivel de evidencia IV).
8. El estudio de cariotipo puede ser útil para el diagnóstico diferencial del LB y ocasionalmente para identificar reordenamientos no detectados por FISH. Los cariotipos complejos deben hacernos dudar del diagnóstico de LB.

## Bibliografía

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.; 2008.
2. Parker A, BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting; 2012.
3. Gonzalez-Farre B, Ramis-Zaldivar JE, Salmeron-Villalobos J, et al. Burkitt-like lymphoma with 11q aberration: A germinal center derived lymphoma genetically unrelated to Burkitt lymphoma. *Haematologica*. 2019.
4. Green TM, Nielsen O, de Stricker K, Xu-Monette ZY, Young KH, Moller MB. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(4):612-619.

5. Ruzinova MB, Caron T, Rodig SJ. Altered subcellular localization of c-Myc protein identifies aggressive B-cell lymphomas harboring a c-MYC translocation. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(6):882-891.
6. Colomo L, Vazquez I, Papaleo N, et al. LMO2-negative Expression Predicts the Presence of MYC Translocations in Aggressive B-Cell Lymphomas. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(7):877-886.
7. NCCN. NCCN Guidelines, Non Hodgkin Lymphomas; 2013.
8. Dave SS, Fu K, Wright GW, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med.* 2006;354(23):2431-2442.
9. Hummel M, Bentink S, Berger H, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med.* 2006;354(23):2419-2430.
10. Love C, Sun Z, Jima D, et al. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat Genet.* 2012;44(12):1321-1325.

# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B agresivos: Linfoma B difuso de célula grande

**Santiago Montes Moreno**

*santiago.montes@scsalud.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

## DEFINICIÓN

El linfoma B difuso de células grandes es una neoplasia de células linfoides B de tamaño grande (núcleo igual o mayor que el de un macrófago o tamaño superior al doble de un linfocito normal) que tiene un patrón de crecimiento puramente difuso en las secciones histopatológicas [1]. Existen una serie de variantes morfológicas, moleculares y fenotípicas, así como entidades específicas compuestas de células B grandes. En este apartado se trata del LBDCG NOS de forma general con anotaciones específicas para los subtipos/entidades de LBDCG.

El LBDCG NOS constituye del 25-30% de los linfomas B no Hodgkin en el mundo occidental. Es más frecuente en pacientes añosos, pero puede aparecer a cualquier edad [1]. Algunas formas pediátricas [2] y las asociadas a edad avanzada [3] e infección por EBV [1,4,5] tienen rasgos clínicopatológicos y moleculares característicos.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección.

**Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la aproximación que se debe utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo *Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico*.

## TIPO DE ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS REQUERIDOS PARA LA ESTADIFICACIÓN

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Estudio requerido para la estadificación de todos los casos de LBDCG. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro. La médula ósea puede estar infiltrada de forma concordante (morfología de linfoma B difuso de células grandes), discordante (afectación por linfoma B de células pequeñas) o no infiltrada. El significado pronóstico de la infiltración discordante es limitado [6,7] y en una minoría de casos representa una situación de linfoma B indolente en progresión a Linfoma B de células grandes [8].

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

Los casos de LBDCG plantean diagnóstico diferencial histopatológico con una amplia variedad de procesos neoplásicos no linfoides y linfoides (Linfoma de Hodgkin y Linfoma T periférico, principalmente). La aproximación diagnóstica inicial debe incluir un estudio morfológico con hematoxilina-eosina (HE) y un panel básico con marcadores de línea linfoide (CD45, ALC), B (CD20) y T (CD3). Una vez determinada la naturaleza linfoide B del infiltrado de células grandes el diagnóstico diferencial debe tener en cuenta:

- Linfoma B de células del manto (variante pleomórfica).
- Linfoma B de alto grado (Linfoma B de alto grado DH/TH/NOS).
- Linfomas B con rasgos intermedios entre Linfoma de Hodgkin y Linfoma B Difuso de Células grandes.
- Subtipos específicos de linfomas B de células grandes: Linfoma B rico en células T e histiocitos, Linfoma B de células grandes EBV positivo NOS, Linfoma B difuso primario cerebral, Linfoma B Difuso primariamente cutáneo (tipo piernas), Linfoma B difuso primario mediastínico, Linfoma plasmablástico, Linfoma B ALK positivo, Linfoma B HHV-8 NOS, Linfoma B primario de cavidades, granulomatosis linfomatoide, linfoma B difuso asociado con inflamación crónica.

Este diagnóstico diferencial debe tener en cuenta características clínicas de la enfermedad (localización de las lesiones) y del paciente (edad), así como rasgos morfológicos específicos de la neoplasia (morfología Hodgkin-like, morfología plasmablástica) e inmunofenotípicos.

## PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) e HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA (HIS-C).

Se reconocen al menos dos variantes moleculares de LBDCG NOS, el subtipo centro germinal (GCB) y el subtipo activado (ABC). Estas variantes moleculares se definen en función del perfil de expresión génica determinada mediante análisis de expresión de ARNm, de modo que la mayoría de las series publicadas asignan un porcentaje de casos al tipo ABC entre el 46 y 48% [2,9,10]. Se han desarrollado varios algoritmos inmunohistoquímicos que son subrogados imperfectos del perfil de expresión génica con tasas de concordancia variables en torno al 90% [9-11]. Ya que la IHQ es un método factible para la subclasificación de estos casos se recomienda incluir, al menos, el fenotipado según el algoritmo de Hans en los casos de LBDCG [11]. Es preciso incluir en el informe el porcentaje estimado de células positivas para cada marcador analizado. Adicionalmente hay evidencia de que la coexpresión mediante inmunohistoquímica de C-MYC y BCL2 en casos de LBDCG (C-MYC  $\geq$ 40%, BCL2  $\geq$ 70%) identifica un subgrupo de LBDCG de conducta clínica especialmente agresiva [12-14]. Se recomienda incluir la determinación de la expresión de C-MYC y BCL2, identificando el porcentaje estimado de células positivas. Asimismo, la expresión de CD30 en casos de LBDCG se asocia con rasgos clinicopatológicos y moleculares específicos [15]. La potencial disponibilidad de terapias específicas frente esta molécula hace aconsejable identificar la positividad y el porcentaje estimado de células positivas para CD30 en cada caso de LBDCG. Otro marcador que se ha relacionado con pronóstico en LBDCG es CD5. Se ha demostrado en series retrospectivas multicéntricas que la expresión de CD5 se asocia con características clínico-patológicas particulares y peor pronóstico tras R-CHOP en LBDCG [16].

En cualquier caso, este tipo de subdivisiones pronósticas independientes del índice IPI no tienen hoy mucha aplicabilidad clínica fuera de los ensayos clínicos, ya que no se utilizan estrategias terapéuticas diferentes para los distintos subgrupos de pacientes.

Existe un conjunto de subtipos de linfomas B de células grandes con morfología inmunoblástica y plasmablástica que se asocian con rasgos clinicopatológicos distintivos. Para su identificación precisa se requiere un panel que permita la identificación de un fenotipo específico (pérdida de marcadores

de línea B y adquisición de marcadores de diferenciación terminal) asociado con marcadores propios de las diferentes entidades (EBV-EBER y C-MYC en el caso de linfomas plasmablasticos, HHV-8 en el caso de linfomas de cavidades, por ejemplo). Se recomienda el uso de un panel específico de segunda línea en estos casos para subclasificar adecuadamente la neoplasia.

Algunas entidades específicas incluyen en su definición la demostración de la presencia de EBV en las células neoplásicas. Entre estas se encuentran además de los ya citados, los casos de Linfoma B Difuso de Células Grandes asociado a EBV NOS (incluyendo aquí casos en pacientes de cualquier edad [17]), los casos de granulomatosis linfomatoide y casos de desorden linfoproliferativo post-trasplante de tipo LBDCG. En estos casos la demostración de EBV-EBER mediante ISH-C es un requisito para el diagnóstico. En su defecto una inmunotinción positiva para EBV-LMP1 es un subrogado adecuado. La negatividad para EBV-LMP1 no descarta la presencia de EBV, siendo la ISH EBV-EBER la técnica de sensibilidad óptima en tejido adecuadamente fijado.

**Panel de primera línea:** CD45 (ALC), CD20, CD3. En caso de terapia previa con antiCD20 es útil el uso de otros marcadores de línea B como PAX5, OCT2, CD79.

**Paneles de segunda línea:**

- Necesario en casos con el probable diagnóstico de LBDCG NOS: CD10, BCL6, MUM1, BCL2, C-MYC, Ki67, ciclinaD1.
- Aconsejable en casos con el probable diagnóstico de LBDCG NOS: CD30, CD5.
- Necesario en casos con morfología inmunoblástica/plasmablastica: CD138, CD38, Ki67, MUM1, C-MYC, HHV-8, ALK, EBV-EBER (en su defecto EBV-LMP1).
- Necesario en casos con sospecha de linfoma B EBV positivo: EBV-EBER (en su defecto EBV-LMP1).

**CITOGENÉTICA Y MOLECULAR**

El estudio de FISH para la detección de reordenamientos de MYC, BCL2 y BCL6 utilizando sondas de tipo BA es de utilidad para identificar casos con alteraciones citogenéticas múltiples asociadas con mal pronóstico clínico y potenciales candidatos a terapias no estándar [18]. De hecho, **la presencia concurrente y simultánea de traslocaciones de MYC y BCL2 y/o BCL6 en un caso de linfoma B difuso indica el diagnóstico de Linfoma B de alto grado DH/TH, en lugar del de LBDCG**. Existe evidencia preliminar de que el impacto pronóstico adverso se limita a los casos que presentan reordenamientos de MYC con inmunoglobulina (Ig-MYC) [19,20].

La presencia de traslocaciones en estos genes, particularmente en MYC y BCL2 se asocia estrechamente con la sobreexpresión de la proteína en porcentajes significativos de la celularidad neoplásica y en casos con fenotipo GCB [12,13,21].

Los métodos de cribado mediante inmunohistoquímica tienen una sensibilidad insuficiente para la selección de estos casos, por lo que se considera recomendable la realización de FISH en todo caso con morfología de tipo Linfoma B difuso de célula grande y morfología de alto grado para la identificación de los casos con DH/TH. Si se encuentra MYC reordenado, con o sin reordenamiento de BCL2 mediante FISH, es de utilidad identificar el posible reordenamiento de BCL6 [22].

Cerca de un 2% de los casos de LBDCG sobreexpresan ciclinaD1 mediante IHQ [23]. Si se observa la sobreexpresión homogénea e intensa de ciclinaD1 mediante IHQ es necesario realizar FISH de CCND1 para descartar una forma pleomórfica de LCM.

La presencia de traslocaciones de MYC y ALK está descrita en algunos subtipos de linfoma B de células grandes de morfología inmunoblástica/plasmablastica [24,25]. La demostración de estas alteraciones mediante sondas FISH de tipo BA es aconsejable pero no estrictamente necesaria para un diagnóstico.

Se ha descrito un subgrupo de Linfomas B de fenotipo centrogerminal (LBDCG y LF) con traslocaciones de MUM1/IRF4. Este subgrupo supone el 5% de los casos de LBDCG y afecta principalmente a pacientes jóvenes, en localización cervical (p. ej. anillo de Waldeyer) y gastrointestinal. Se caracteriza molecularmente por la presencia de la traslocación Ig-IRF4, usualmente en ausencia de reordenamientos en MYC y BCL2 [2]. Desde el punto de vista fenotípico suelen presentar sobreexpresión de BCL6 y MUM1, con un patrón de crecimiento, difuso o nodular y difuso.

#### **Análisis de clonalidad linfoide (reordenamientos de Ig) mediante PCR y electroforesis capilar.**

En contadas ocasiones (abundancia de necrosis, mala calidad de la muestra, aberraciones inmunofenotípicas inesperadas) puede ser necesaria la ayuda de un estudio molecular que confirme la clonalidad B de la muestra. Para ello, la técnica recomendada es la amplificación de la región variable de los genes de las inmunoglobulinas y su estudio por análisis del tamaño de los fragmentos o su secuenciación [26,27]. Este estudio es siempre complementario al estudio morfológico e inmunohistoquímico de la muestra, y nunca debe utilizarse en solitario para asignar un diagnóstico.

#### **RECOMENDACIONES**

1. Panel de primera línea: CD45 (ALC), CD20, CD3. En caso de terapia previa con antiCD20 es útil el uso de otros marcadores de línea B como PAX5, OCT2, CD79. (Grado C, nivel de evidencia IV).
2. Paneles de segunda línea: Necesario en casos con el probable diagnóstico de LBDCG NOS: CD10, BCL6, MUM1, BCL2, C-MYC, Ki67, CD30, ciclinaD1. (Grado C, nivel de evidencia IV).
3. Se recomienda incluir en el diagnóstico la subclasificación en GCB-ABC según el algoritmo de Hans, especificando en el informe el porcentaje de células positivas para cada marcador evaluado. (Grado C, nivel de evidencia IV).
4. Se recomienda incluir la determinación de la expresión de C-MYC y BCL2, identificando el porcentaje estimado de células positivas para cada marcador. (Grado C, nivel de evidencia IV).
5. Se aconseja identificar la positividad y el porcentaje estimado de células positivas para CD30 y CD5 en cada caso de LBDCG. (Grado C, nivel de evidencia IV).
6. Paneles de segunda línea: Necesario en casos con morfología inmunoblástica/plasmablástica: CD138, CD38, Ki67, MUM1, C-MYC, HHV-8, ALK, EBV-EBER (en su defecto EBV-LMP1). (Grado C, nivel de evidencia IV).
7. Paneles de segunda línea: Necesario en casos con sospecha de linfoma B EBV positivo: EBV-EBER (en su defecto EBV-LMP1). (Grado C, nivel de evidencia IV).
8. FISH de MYC y BCL2 en todos los casos de LBDCG. Si se encuentra MYC reordenado mediante FISH es de utilidad identificar el posible reordenamiento de BCL6. (Grado C, nivel de evidencia IV).
9. La presencia de un doble hit genético (reordenamientos concurrentes de IGH-BCL2/t(14;18)(q32;q21) y MYC(8q24) o BCL6(3q27) y MYC se debe hacer constar en el informe anatomopatológico e indica el diagnóstico de Linfoma B de alto grado DH/TH. (Grado C, nivel de evidencia IV).
10. Si se observa la sobreexpresión homogénea e intensa de ciclinaD1 mediante IHQ es necesario realizar FISH de CCND1 para descartar una forma pleomórfica de LCM. (Grado C, nivel de evidencia IV).



11. La demostración de alteraciones de MYC y ALK en casos de morfología inmunoblástica/plasmablástica mediante sondas FISH de tipo BA es aconsejable pero no estrictamente necesaria para un diagnóstico. (Grado C, nivel de evidencia IV).
12. La demostración de traslocaciones de MUM1/IRF4 mediante sondas FISH de tipo BA es aconsejable para el diagnóstico de la entidad asociada con este reordenamiento. (Grado C, nivel de evidencia IV).
13. El estudio de cariotipo no es necesario pero si recomendable en caso de existir muestra suficiente en el panel diagnóstico habitual del LBDCG. (Grado C, nivel de evidencia IV).

## Bibliografía

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.; 2008.
2. Salaverria I, Philipp C, Oschlies I, et al. Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood*. 2011;118(1):139-147.
3. Klapper W, Kreuz M, Kohler CW, et al. Patient age at diagnosis is associated with the molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2012;119(8):1882-1887.
4. Nakamura S, JE, Swerdlow SH. EBV positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. Lyon; 2008.
5. Santiago Montes-Moreno LO, Julio Alexander Diaz-Perez, Ana Batlle Lopez, Sonia Gonzalez de Villambrosía, Francisco Mazorra, Maria E. Castillo, Mar Lopez, Raquel Pajares, Juan F. García, Manuela Mollejo, Francisca I. Camacho, Carmen Ruiz-Marcellán, Magdalena Adrados, Nazario Ortiz, Renato Franco, Carlos Ortiz-Hidalgo, Ana Suarez-Gauthier, Ken H Young, Miguel A. Piris. EBV-positive Diffuse Large B Cell Lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B cell neoplasm characterized by prominent Nuclear Factor-kB activation.: *Modern Pathology*; 2012.
6. Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1452-1457.
7. Chung R, Lai R, Wei P, et al. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood*. 2007;110(4):1278-1282.
8. Parker A, BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. *Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting*; 2012.
9. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia*. 2012;26(9):2103-2113.
10. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):200-207.

11. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-282.
12. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. MYC/BCL2 protein co-expression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013.
13. Green TM, Young KH, Visco C, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3460-3467.
14. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3452-3459.
15. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, et al. CD30 expression defines a novel subset of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013.
16. Xu-Monette ZY, Tu M, Jabbar KJ, et al. Clinical and biological significance of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Oncotarget*. 2015;6(8):5615-5633.
17. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390.
18. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(8):2319-2331.
19. Rosenwald A, Bens S, Advani R, et al. Prognostic Significance of MYC Rearrangement and Translocation Partner in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol*. 2019;37(35):3359-3368.
20. Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood*. 2015;126(22):2466-2474.
21. Ruzinova MB, Caron T, Rodig SJ. Altered subcellular localization of c-Myc protein identifies aggressive B-cell lymphomas harboring a c-MYC translocation. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(6):882-891.
22. Pillai RK, Sathanoori M, Van Oss SB, Swerdlow SH. Double-hit B-cell lymphomas with BCL6 and MYC translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct from BCL2 double-hit B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(3):323-332.
23. Ok CY, Li L, Xu-Monette Z, et al. Prevalence and Clinical Implications of Epstein-Barr Virus Infection in de novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Western Countries. *Clin Cancer Res*. 2014.
24. Valera A, Balagué O, Colomo L, et al. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(11):1686-1694.
25. Valera A, Colomo L, Martinez A, et al. ALK-positive large B-cell lymphomas express a terminal B-cell differentiation program and activated STAT3 but lack MYC rearrangements. *Mod Pathol*. 2013;26(10):1329-1337.

26. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012;26(10):2159-2171.
27. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-2317.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B agresivos: Linfoma B de alto grado doble hit/triple hit/NOS

**Santiago Montes Moreno**

*santiago.montes@scsalud.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

## DEFINICIÓN

Esta categoría diagnóstica en la actual clasificación de la OMS es un grupo de neoplasias que no cumplen con los criterios diagnósticos establecidos para LB o LBDCG [1, 2]. Las características morfológicas constituyen el primer requisito para el diagnóstico de este tipo de neoplasias. Así estos tumores muestran morfología de alto grado que incluye 1) una morfología atípica para LB con áreas con una celularidad mixta de tamaño intermedio y grande, mitosis, patrón en cielo estrellado (morfologías de tipo intermedio entre linfoma de Burkitt y LBDCG, semejantes a LB o LB-like), 2) una morfología de aspecto blastoide. Otros tumores, sin embargo, presentan una morfología de linfoma B difuso de célula grande convencional. Si el caso tiene una morfología uniforme concordante con LBDCG se incluirá en esta categoría en el caso de que se demuestre doble o triple reordenamiento de los genes MYC, BCL2 y/o BCL6 [3]. En caso de que el caso presente morfología de LBDCG y un reordenamiento aislado de MYC se seguirá considerando LBDCG. Si el caso presenta una morfología de alto grado pero carece de reordenamientos concurrentes de MYC y BCL2/BCL6 se denominará Linfoma B de alto grado NOS.

Un porcentaje de estos casos representan la transformación de un Linfoma B Folicular de bajo grado previo [4, 5]. Se reconoce que un porcentaje de casos de linfoma B folicular transformado pueden presentar una morfología y fenotipo equivalentes a linfoma B linfoblástico, junto con DH genético. Estos casos se excluyen de la categoría de Linfoma B de alto grado, según la OMS [3], aunque su conducta biológica no es equivalente a la del Linfoma B linfoblástico.

Este tipo de neoplasias son relativamente infrecuentes, pero como grupo son más frecuentes que el linfoma de Burkitt en pacientes adultos. Habitualmente muestran rasgos clínicos de alto riesgo (IPI intermedio-alto, estadios avanzados [6-8]) y un pronóstico muy adverso [4-6, 8]. En la actualidad no existe una terapia definida y cada caso debe tratarse en función de los factores clínicos al diagnóstico, incluyendo el IPI [1, 8].

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección.

**Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la aproximación a utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo *Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico*.

## TIPO DE ESTUDIOS REQUERIDOS PARA LA ESTADIFICACIÓN

**Análisis de LCR:** El diagnóstico en LCR requiere excluir contaminación por SP y la demostración por CMF de una población B clonal [9].

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro y estudios inmunofenotípicos y de citogenética/FISH.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

Los casos de Linfoma B de alto grado DH/TH/NOS plantean el diagnóstico diferencial con leucemia/linfoma linfoblástico de precursores B, linfoma B de células del manto (variante blastoide), Linfoma B Difuso de Células grandes y linfoma de Burkitt. Se debe considerar también en este diagnóstico diferencial el Linfoma B con alteraciones en 11q.

## PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) E HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA (HIS-C)

Estos casos suelen mostrar un fenotipo de tipo centro germinal con expresión habitual de CD10 y BCL6 y expresión variable de BCL2 (~50%) [8, 10]. En algunas series publicadas la sobreexpresión intensa de BCL2 se encuentra en hasta el 79% de los casos [8] y es un marcador útil en la distinción con LB. Otras alteraciones como la ausencia de expresión de CD10 también ayudan a identificar un fenotipo atípico para LB y apoyan el diagnóstico [11]. El índice proliferativo con Ki67 es habitualmente homogéneo y mayor del 90%. Aproximadamente la mitad de los casos muestran sobreexpresión de C-MYC en al menos el 50% de la celularidad neoplásica [7, 8]. La expresión franca de TdT por parte de la neoplasia es un criterio en contra el diagnóstico de Linfoma B de alto grado DH/TH. La ausencia de expresión de LMO2 se ha relacionado con la presencia de traslocaciones de MYC en linfomas B de alto grado, con elevada sensibilidad y especificidad.

**Panel de primera línea IHQ:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, Ki-67, BCL2, BCL6, TdT, C-MYC, ciclinaD1.

**Panel de primera línea CMF:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, CD5, CD19, TdT, kappa, lambda.

## CITOGENÉTICA

El análisis de FISH es necesario para demostrar la presencia de traslocaciones de MYC, BCL2 y BCL6. Esta categoría aglutina casos con DH/TH y morfología diversa (con rasgos intermedios entre LB/LBDCG, blastoide y LBDCG) con casos con morfología intermedia entre LB/LBDCG o blastoide sin presencia de DH/TH (Linfoma B de alto grado NOS). Los linfomas con doble hit son el subgrupo mejor caracterizado de estos casos y se definen por la presencia de reordenamientos concurrentes de IGH-BCL2/t(14;18)(q32;q21) y reordenamientos de MYC/8q24 [6]. Infrecuentemente se reordena /BCL6 (3q27) [10]. Un porcentaje variable de estos casos (15-30%) representan la transformación de un

Linfoma B folicular de bajo grado (G1, G2) previo [4, 5]. Es destacable, no obstante, que entre el 30%-67% de los casos con morfología intermedia entre LB y LBDCG puede no tener traslocaciones de MYC [7, 8], considerándose Linfomas B de alto grado NOS.

Así, la detección de reordenamientos de MYC, BCL2 y BCL6 mediante FISH con sondas de tipo BA debe hacerse en todos los linfomas con patrones morfológicos de linfoma B con rasgos intermedios entre LB/LBDCG, linfoma B blastoide y LBDCG convencional (particularmente en aquellos con fenotipo GCB). La presencia de reordenamientos aislados de MYC debe hacer considerar la posibilidad de un LB de morfología atípica si el fenotipo es de tipo LB (CD10+BCL6+BCL2-). El estudio del cariotipo no es necesario pero recomendable, dado su potencial utilidad en el diagnóstico diferencial y para la identificación de anomalías secundarias.

## RECOMENDACIONES

1. Panel de primera línea IHQ: CD45 (ALC), CD20, CD3, CD10, Ki-67, BCL2, BCL6, TdT, C-MYC, ciclinaD1. (Grado C, nivel de evidencia IV).
2. El diagnóstico de linfoma B de alto grado se puede establecer en el caso de que se observe un patrón morfológico de alto grado, esto es: linfoma B intermedio entre LB y LBDCG o un patrón morfológico blastoide, una vez excluido linfoma B linfoblástico. Si el caso presenta DH/TH se diagnosticará como Linfoma B de alto grado DH/TH. Si no se identifica DH/TH se diagnosticará como Linfoma B de alto grado NOS.
3. El diagnóstico de Linfoma B de alto grado DH/TH requiere de la demostración de reordenamientos de MYC y BCL2 o MYC y BCL6 o MYC/BCL2 y BCL6. Se excluyen casos que cumplen con criterios de linfoma B folicular (en ausencia de un componente difuso de alto grado) y linfomas B linfoblásticos (TdT positivos).
4. Una morfología típica de LBDCG puede presentar DH/TH. Estos casos, en su gran mayoría presentan un fenotipo GCB. (Grado C, nivel de evidencia IV).
5. Se recomienda hacer constar en el informe si el caso de Linfoma B de alto grado se desarrolla en el contexto de un linfoma B folicular previo. (Grado C, nivel de evidencia IV).
6. Una morfología de LB atípico con un fenotipo de LB (CD10+BCL6+BCL2-) y un reordenamiento aislado de MYC (demostrada la ausencia de alteraciones en BCL2 y BCL6) debe considerarse LB atípico.
7. La detección de reordenamientos de MYC, BCL2 y BCL6 mediante FISH con sondas de tipo BA debe realizarse en todos los linfomas sugestivos de linfoma B de alto grado e idealmente en todos los casos con morfología de LBDCG. En caso de ausencia de detección de reordenamiento de MYC con sondas de tipo BA se debe considerar el uso complementario de sondas de tipo DF (Grado C, nivel de evidencia IV).
8. La presencia de un doble hit genético (reordenamientos concurrentes de IGH-BCL2/t(14;18)(q32;q21) y MYC(8q24) o /BCL6(3q27) y MYC se debe hacer constar en el informe anatomopatológico. (Grado C, nivel de evidencia IV).

## Bibliografía

1. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May;117(19):5019-32.

2. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
3. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375-90.
4. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, Hsu JJ, Ackerman AM, Dal Cin P, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):327-40.
5. Li S, Lin P, Fayad LE, Lennon PA, Miranda RN, Yin CC, et al. B-cell lymphomas with MYC/8q24 rearrangements and IGH@BCL2/t(14;18)(q32;q21): an aggressive disease with heterogeneous histology, germinal center B-cell immunophenotype and poor outcome. *Mod Pathol*. 2012 Jan;25(1):145-56.
6. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011 Feb;117(8):2319-31.
7. Cook JR, Goldman B, Tubbs RR, Rimsza L, Leblanc M, Stiff P, et al. Clinical Significance of MYC Expression and/or "High-grade" Morphology in Non-Burkitt, Diffuse Aggressive B-cell Lymphomas: A SWOG S9704 Correlative Study. *Am J Surg Pathol*. 2014 Apr;38(4):494-501.
8. Perry AM, Crockett D, Dave BJ, Althof P, Winkler L, Smith LM, et al. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and burkitt lymphoma: study of 39 cases. *Br J Haematol*. 2013 Apr.
9. Parker A BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. *Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting*. 2012.
10. Pillai RK, Sathanoori M, Van Oss SB, Swerdlow SH. Double-hit B-cell lymphomas with BCL6 and MYC translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct from BCL2 double-hit B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2013 Mar;37(3):323-32.
11. Haralambieva E, Boerma EJ, van Imhoff GW, Rosati S, Schuurin E, Müller-Hermelink HK, et al. Clinical, immunophenotypic, and genetic analysis of adult lymphomas with morphologic features of Burkitt lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2005 Aug;29(8):1086-94.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Linfomas B agresivos: Linfoma B de células del manto

**Santiago Montes Moreno**

*santiago.montes@scsalud.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

## DEFINICIÓN

El linfoma de células del manto (LCM) es un linfoma B compuesto de células de tamaño mediano, monomorfo, con núcleos irregulares, que se caracteriza molecularmente por la traslocación de CCND1 [1]. El LCM supone del 3 al 10% de los LNH y suele afectar a pacientes de edad media-avanzada. La afectación ganglionar es la presentación más habitual. La localización extraganglionar más frecuente es el tracto aerodigestivo (tracto gastrointestinal y anillo de Waldeyer).

Se han descrito variantes histopatológicas agresivas (LCM blastoide y pleomórfico) y otras de curso indolente, con variable presentación clínica, frecuente afectación leucémica y extraganglionar, hipermutación somática de IgVH y expresión disminuida de SOX11 [2-4].

Igualmente existe un subgrupo de casos, clínicamente equivalentes a LCM clásico, que carecen de la traslocación de CCDN1 y presentan traslocaciones en CCDN2 [5]. El LCM in situ es una forma muy inhabitual de linfocitosis ganglionar de fenotipo LCM con t(11;14) restringida a la capa interna de la zona del manto. Su incidencia es <1% en ganglios linfáticos sin sospecha clínica de linfoproliferativo y su riesgo de transformación a LCM establecido muy limitado [6-8].

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección.

**Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la aproximación a utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo *Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico*.

## TIPO DE ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS REQUERIDOS PARA LA ESTADIFICACIÓN

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección para la estadificación de todos los casos de LCM. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro y estudios inmunofenotípicos y de citogenética/FISH (estos últimos en caso de que se demuestre infiltración por citometría de flujo-morfología).

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

Los casos de LCM clásico plantean el diagnóstico diferencial histopatológico con otras formas de Linfoma B como Linfoma B folicular de bajo grado, Linfoma B de la zona marginal y leucemia linfocítica crónica B/ Linfoma linfocítico de linfocitos B pequeños. Las formas de linfoma del manto blastoide plantean el diagnóstico diferencial con Linfoma de Burkitt, Linfoma B Difuso de células grandes, linfoma B de alto grado y linfoma B linfoblástico. El linfoma del manto pleomórfico plantea el diagnóstico diferencial con Linfoma B folicular y Linfoma B difuso de células grandes. Existe un subgrupo (<5%) de LBDCG que muestran sobreexpresión de CCDN1 no asociada con traslocación del gen [9].

## PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) E HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA (HIS-C)

El LCM clásico se caracteriza por la expresión de CD20, CD5, CD43, BCL2 y CICLINAD1. No se suele observar expresión de CD23 (<10%). Habitualmente se observa restricción de cadenas ligeras lambda. Se pueden observar fenotipos anómalos con expresión de CD10 y BCL6, especialmente en las formas agresivas (p. ej. manto pleomórfico), así como negatividad para CD5.

La detección de la expresión de SOX11 mediante IHQ es de utilidad en las formas de LCM ciclinaD1 negativos [5]. En estos casos se suele encontrar sobreexpresión de CCDN2 así como negatividad para p27 [5, 10, 11].

Los estudios de perfil de expresión génica identifican la firma molecular de proliferación como un marcador pronóstico significativo [12]. El índice proliferativo cuantificado con Ki67 es un marcador subrogado de esta firma y tiene valor pronóstico en LCM [13, 14], al igual que el recuento mitótico [1, 14].

**Panel de primera línea IHQ:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD5, CD23, Ki-67, CICLINAD1.

**Panel de segunda línea IHQ:** SOX11, p27, p53, CCDN2.

## CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

La detección de reordenamientos de CCDN1 mediante FISH con sondas de tipo BA es de elección para el diagnóstico de LCM. Habitualmente la positividad mediante IHQ con el anticuerpo contra CCDN1 hace innecesaria la confirmación mediante FISH. Una indicación de FISH son los casos con tinción heterogénea y de intensidad variable para CCDN1 ya que cerca del 2% de LBDCG pueden sobreexpresar CCDN1, sin asociar traslocación del gen [9]. Los casos de LCM CCDN1 negativos pueden presentar reordenamientos de CCDN2 que es recomendable pero no necesario identificar para el diagnóstico si el perfil IHQ es concordante con LCM (CD20+CD5+SOX11+, p27-).

El estudio del cariotipo en muestras estimuladas con TPA 72 horas no es necesario en el proceso diagnóstico habitual, pero si recomendable, ya que permite detectar anomalías asociadas, algunas de las cuales se asocian a un pronóstico desfavorable (cariotipos complejos y/o tetraploides, traslocaciones de MYC, deleciones de 17p, 13q33 entre otras y/o ganancias de 3q26, etc). Estas anomalías también pueden ser detectadas mediante FISH y/o *arrays* (CGH o SNPs), si bien no existen recomendaciones clínicas establecidas en este sentido.

## RECOMENDACIONES

1. Panel de primera línea IHQ: CD45 (ALC), CD20, CD3, CD5, CD23, Ki-67, CICLINAD1. (Grado C, nivel de evidencia IV).
2. Panel de segunda línea IHQ: SOX11, p27, p53, CCDN2. (Grado C, nivel de evidencia IV).
3. La detección de la expresión de SOX11 mediante IHQ es necesaria en las formas de LCM ciclinaD1 negativos. (Grado C, nivel de evidencia IV).
4. La detección de reordenamientos de CCDN1 mediante FISH con sondas de tipo BA es el método de elección complementario al diagnóstico de LCM.
5. Una indicación de FISH para detectar traslocación de CCDN1 son los casos con tinción heterogénea y de intensidad variable para CCDN1. La expresión uniforme e intensa mediante IHQ de CICLINAD1 es suficiente para el diagnóstico en los casos de LCM típico (Grado C, nivel de evidencia IV).
6. Los casos de LCM CCDN1 negativos presentan traslocaciones de CCDN2 que es recomendable pero no necesario identificar para el diagnóstico si el perfil IHQ es concordante con LCM (CD20+CD5+SOX11+, p27-). (Grado C, nivel de evidencia IV).
7. El análisis de cariotipo no es necesario pero sí recomendable en el proceso diagnóstico habitual del LCM. (Grado C, nivel de evidencia IV).
8. No es necesario realizar la tinción de CCDN1 en los casos con patrón histopatológico de hiperplasia linfoide reactiva sin sospecha clínica de proceso linfoproliferativo. (Grado C, nivel de evidencia IV).

## Bibliografía

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
2. Navarro A, Clot G, Royo C, Jares P, Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, et al. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res.* 2012 Oct 15;72(20):5307-16.
3. Fernandez V, Salameró O, Espinet B, Sole F, Royo C, Navarro A, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2010 Feb 15;70(4):1408-18.
4. Ondrejka SL, Lai R, Smith SD, Hsi ED. Indolent mantle cell leukemia: a clinicopathological variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica.* 2011 Aug;96(8):1121-7.
5. Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A, Clot G, Navarro A, Valera A, et al. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood.* 2013 Feb 21;121(8):1394-402.
6. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011 May;117(19):5019-32.
7. Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, Pittaluga S, Royo C, Song JY, et al. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica.* 2011 Nov.

8. Bermudez G, González de Villambrosía S, Martínez-López A, Batlle A, Revert-Arce JB, Cereceda Company L, et al. Incidental and Isolated Follicular Lymphoma In Situ and Mantle Cell Lymphoma In Situ Lack Clinical Significance. *Am J Surg Pathol*. 2016 Mar.
9. Ok CY, Xu-Monette ZY, Tzankov A, O'Malley DP, Montes-Moreno S, Visco C, et al. Prevalence and clinical implications of cyclin D1 expression in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) treated with immunochemotherapy: A report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Cancer*. 2014 Mar 19.
10. Quintanilla-Martinez L, Thieblemont C, Fend F, Kumar S, Pinyol M, Campo E, et al. Mantle cell lymphomas lack expression of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *The American journal of pathology*. 1998 Jul;153(1):175-82.
11. Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 2005 Dec 15;106(13):4315-21.
12. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2003 Feb;3(2):185-97.
13. Katzenberger T, Petzoldt C, Holler S, Mader U, Kalla J, Adam P, et al. The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3407.
14. 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. *Br J Haematol*. 2005 Oct;131(1):29-38.

# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas B no Hodgkin: Plasmocitoma/Gammapatía monoclonal de significado incierto/Mieloma múltiple

**Santiago Montes Moreno**

*santiago.montes@scsalud.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla/IDIVAL, Santander.*

## DEFINICIÓN

Las neoplasias de células plasmáticas derivan de la expansión de un clon de células terminalmente diferenciadas, que han realizado el cambio de clase (de IgM/IgD a IgG, o IgA y más raramente IgE) o *switching*, y (usualmente) secretan inmunoglobulina monoclonal (paraproteína o componente M). Se discute aquí el diagnóstico histopatológico de la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), mieloma múltiple y plasmocitoma óseo y extraóseo. El diagnóstico definitivo de estas entidades descansa en la combinación de los hallazgos histopatológicos con los hallazgos clínicos y de laboratorio (paraproteína sérica, anemia, lesiones líticas, daño renal, hipercalcemia). En ausencia de estos datos, se debe emitir un diagnóstico genérico de tipo neoplasia de células plasmáticas que se deberá valorar en el contexto clínico y de laboratorio.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Aspirado de MO:** Es un método habitual para el diagnóstico de GMSI/mieloma múltiple, que exige tanto la presencia de infiltrado por células plasmáticas como su clonalidad [1].

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es un método complementario en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con GMSI/mieloma múltiple.

El examen morfológico del aspirado puede ser suficiente para el diagnóstico de las neoplasias de células plasmáticas si se acompaña de los datos clínicos, inmunofenotípicos (IHQ, CMF), citogenéticos o moleculares necesarios. No obstante, el estudio de la biopsia de MO con inmunohistoquímica permite aumentar la sensibilidad y precisión en la estimación de la infiltración por células plasmáticas, y se sigue recomendando [1-5].

La infiltración plasmocitaria de la médula ósea se basará en el examen convencional tanto del aspirado como de la biopsia de médula ósea. Dicha estimación no debería hacerse por ahora con citometría de flujo, ya que los estudios que determinarán si tal enumeración es factible están aún en desarrollo. Si al enumerar las células plasmáticas hay una discrepancia entre la estimación del aspirado y la de la biopsia, se deberá utilizar el número más elevado que se obtenga [1].

**Biopsia escisional/incisional del tejido extramedular afectado:** Es el método de elección y debe de ser el método utilizado siempre en los casos de lesiones (plasmocitomas) accesibles.

**Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** Es la alternativa que se utilizaría en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional. Véase capítulo *Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico*.

Si se utiliza sólo punción aspiración con aguja (fina o gruesa), es obligado el empleo de técnicas complementarias como Inmunohistoquímica, Citometría de Flujo, Hibridación In Situ o Biología Molecular.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

El primer diagnóstico diferencial a valorar en los casos de biopsia de MO en paciente con sospecha de discrasia de células plasmáticas es la distinción entre plasmocitosis reactiva, GMSI y mieloma. El segundo diagnóstico diferencial a plantear es con linfoma B linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldenström si existe una población mixta, linfoide y plasmocelular.

Las células plasmáticas en la MO normal se disponen de localización perivascular, aisladas o en pequeños grupos, sin reacción estromal y sin mostrar inmunofenotipos aberrantes, restricción de cadenas ligeras o anomalías citogenéticas o moleculares. Los casos de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) muestran un incremento significativo de la cantidad de plasmáticas en el tejido, de localización intersticial, con evidente restricción de cadenas ligeras mediante IHQ. Si se utilizan técnicas de citometría de flujo es posible distinguir células con fenotipo aberrante e incluso con anomalías genéticas, incluyendo traslocaciones cromosómicas. En estos casos se pueden observar pequeños grupos (<5 células MUM1/CD138 positivas) de plasmáticas intersticiales, sin formar grandes grupos, sábanas o distorsión arquitectural con reacción estromal. El aspirado de las MO con GMSI no muestra más de un 10% de células plasmáticas clonales y el componente M es inferior a 30 g/L. Además, desde el punto de vista clínico, el diagnóstico de GMSI exige la ausencia de repercusiones fisiopatológicas (ausencia de anemia, lesión ósea, lesión renal o hipercalcemia debidas a la presencia del clon de células plasmáticas anómalas). En el caso del mieloma múltiple (quiescente o sintomático) la biopsia de MO suele mostrar un infiltrado de grupos densos (>5 células MUM1/CD138+), con distorsión arquitectural y atipia celular (plasmáticas atípicas, con inclusiones nucleares y otras alteraciones morfológicas). El patrón del infiltrado puede ser intersticial, nódulo-intersticial o difuso. El estudio IHQ y de CMF es de gran utilidad para demostrar infiltrados mielomatosos ocultos. En ocasiones el porcentaje de células plasmáticas atípicas es inferior al 10% en el aspirado y la infiltración tisular sutil. En estos casos es necesaria la presencia del resto de criterios clínicos para el diagnóstico de mieloma múltiple (componente monoclonal >30 g/L y ausencia de consecuencias fisiopatológicas –criterios CRAB- para el mieloma quiescente, o cualquier componente si hay alguna de las consecuencias fisiopatológicas para el mieloma sintomático) [1].

El espectro morfológico de los casos de mieloma es amplio con formas con atipia mínima y otras de aspecto linfoplasmocitoide, plasmablástico o anaplásico. La atipia morfológica puede ser el único dato si el infiltrado es sutil. En estos casos es esencial el estudio IHQ y de CMF.

Hay que considerar el diagnóstico diferencial con metástasis de neoplasias no hematológicas en los casos de morfología anaplásica o con linfomas B no Hodgkin de alto grado en los casos de morfología inmunoblástica/plasmablástica, aunque en estos casos la ausencia del componente monoclonal ayuda mucho en la diferenciación

En casos de plasmocitoma extramedular (por ejemplo de localización en tracto digestivo) también hay que plantear el diagnóstico diferencial con linfomas B de bajo grado con diferenciación plasmocítica (linfoma B de la zona marginal, linfoma B linfoplasmocítico).

## PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) E HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA (HIS-C) [6-9]

**Panel de primera línea IHQ:** CD138, CD56, kappa, lambda.

**Panel de primera línea CMF:** CD45, CD19, CD138, CD38, beta-2-microglobulina, CD56, Clg-kappa, Clg-lambda.

La ratio normal de expresión de cadenas ligeras en células plasmáticas es de 2-4 células kappa por cada célula lambda. Una ratio de 8 o más células kappa es concordante con monotipia kappa. Inversamente una ratio de 4 o más células lambda por cada célula kappa es un marcador indirecto de monoclonalidad lambda [7]. Mediante citometría de flujo estos números varían, ya que es posible distinguir pequeños números de células plasmáticas aberrantes. Si se encuentran estas células y el porcentaje de aberrantes respecto al de plasmáticas totales no supera el 95%, estaremos muy probablemente ante una GMSI, mientras que en el caso del mieloma ese porcentaje se supera (habitualmente es >99%).

**Panel de segunda línea IHQ:** MUM1, CD38, VS38, HIS para kappa y lambda, ciclinaD1, MYC, IgM, IgG, IgD, IgA, IgE.

**Panel de segunda línea CMF:** CD27, CD28, CD81 y CD117.

## CITOGÉNICA Y MOLECULAR

No son esenciales para el diagnóstico [1,7]. No obstante, la evidencia disponible demuestra un claro valor pronóstico de las alteraciones genéticas evaluadas mediante cariotipo y/o FISH en los casos de mieloma múltiple [10]. Excepcionalmente, cuando la demostración de clonalidad no se ha podido hacer en suero o en orina, y en el tejido ha fallado la IHQ y la CMF, el estudio molecular (presencia de monoclonalidad) o la FISH (presencia de anomalías cromosómicas) puede descartar la existencia de cuadros reactivos.

## RECOMENDACIONES

1. En caso de sospecha de neoplasia de células plasmáticas se debe hacer un aspirado y biopsia de médula ósea. El estudio de CMF y citogenética es conveniente. Si con los datos del aspirado y biopsia, junto a los datos clínico-biológicos no se llega a un diagnóstico definitivo, se deben añadir técnicas moleculares. (Grado C, nivel de evidencia IV).
2. En la biopsia de MO, realizar siempre un estudio IHQ con panel de primera línea. (Grado C, nivel de evidencia IV).
3. En casos de infiltración medular significativa por plasmáticas clonales, en ausencia del resto de datos clínicos para el diagnóstico de mieloma múltiple, hay que plantear un diagnóstico genérico de neoplasia de células plasmáticas proporcionando el porcentaje y patrón de infiltración para permitir diferenciar entre GMSI y MM quiescente (Grado C, nivel de evidencia IV).
4. En casos de morfología plasmablástica o anaplásica, valorar el diagnóstico diferencial con infiltración por LNH y metástasis de proceso no hematológico respectivamente.
5. En casos de morfología linfoplasmocitoide o mixta linfoide y plasmocelular, valorar el diagnóstico diferencial con linfoma B linfoplasmacítico y otros linfomas B indolentes.
6. Valorar el diagnóstico diferencial con linfomas de célula B en casos de plasmocitoma extraóseo.

## Bibliografía

1. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014 Nov;15(12):e538-e48.
2. Joshi R, Horncastle D, Elderfield K, Lampert I, Rahemtulla A, Naresh KN. Bone marrow trephine combined with immunohistochemistry is superior to bone marrow aspirate in follow-up of myeloma patients. *J Clin Pathol.* 2008 Feb;61(2):213-6.
3. Stifter S, Babarovic E, Valkovic T, Seili-Bekafigo I, Stemberger C, Nacinovic A, et al. Combined evaluation of bone marrow aspirate and biopsy is superior in the prognosis of multiple myeloma. *Diagnostic pathology.* 2010;5:30.
4. NCCN. Multiple Myeloma v2.2015. 2015.
5. Al-Quran SZ, Yang L, Magill JM, Braylan RC, Douglas-Nikitin VK. Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry. *Hum Pathol.* 2007 Dec;38(12):1779-87.
6. Cao W, Goolsby CL, Nelson BP, Singhal S, Mehta J, Peterson LC. Instability of immunophenotype in plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol.* 2008 Jun;129(6):926-33.
7. Parker A BB, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, Rooney N, Ross F, Wilkins B, Wotherspoon A, Ramsay A. *Best Practice in Lymphoma Diagnosis and Reporting.* 2012.
8. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica.* 2008 Mar;93(3):431-8.
9. Mateo G, Castellanos M, Rasillo A, Gutierrez NC, Montalban MA, Martin ML, et al. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2005 May 15;11(10):3661-7.
10. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia.* 2009 Dec;23(12):2210-21.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfoma de Hodgkin y linfoma de la zona gris (linfoma B inclasificable con rasgos intermedios entre LBDCG y LHC)

**Juan Fernando García**

*jfgarcia@mdanderson.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital MD Anderson, Madrid.*

## **LINFOMAS DE HODGKIN**

El linfoma de Hodgkin (LH) es una neoplasia clonal, en la mayoría de los casos derivada de células linfoides B [1,2], caracterizada por la presencia de muy escasas células neoplásicas acompañadas de un abundante microambiente celular de características inflamatorias [3]. Se reconocen dos entidades clinicopatológicas diferenciadas: el LH de tipo predominio linfocítico nodular (LHPLN) y el LH clásico (LHc) [4].

El LHPLN es una neoplasia clonal derivada de células linfoides B [5], caracterizada por la presencia de las células de PL ó L&H (variantes linfocítica-histiocítica), con expresión de marcadores fenotípicos B (CD20, CD79a, BCL6, PAX5, OCT2) y EMA, [6-7] acompañadas de grandes agregados de linfocitos B maduros e histiocitos, en un patrón de crecimiento nodular o nodular y difuso, y característicamente rodeadas de linfocitos T con fenotipo TFH (PD1+) [8]. Este tumor no está asociado a infección por virus de Epstein-Barr (VEB) [4,6].

El LHc se define por la presencia de las características células de Hodgkin y de Reed-Sternberg (HRS), con expresión de CD30 y CD15 y con expresión ausente o defectiva de marcadores fenotípicos B en la mayoría de casos (CD20-/+, CD79a-, OCT2-/+) acompañadas de un fondo reactivo rico en linfocitos T, histiocitos, eosinófilos, neutrófilos, células plasmáticas, etc. (1). El patrón de crecimiento puede ser nodular o difuso. La composición del microambiente reactivo y la presencia de esclerosis define los subtipos histológicos: LHc rico en linfocitos (LHCRL), esclerosis nodular (EN), celularidad mixta (CM), y depleción linfocitaria (DL). El LHc está asociado a infección por VEB en un porcentaje variable de casos (30-70%) [9].

El LH constituye el 25-30% de todos los linfomas, siendo mucho más frecuente las formas de LHc (95%) que las formas de LHPLN (5%).

## **LINFOMA B INCLASIFICABLE, CON RASGOS INTERMEDIOS ENTRE LBDCG Y LHc**

En la clasificación de la OMS 2016, se mantiene como entidad definida por la presencia de rasgos morfológicos y fenotípicos intermedios o superponibles entre LHc y LBDCG, habitualmente linfoma B difuso primario mediastínico; los casos muestran hiper celularidad, presencia de típicas células HRS,

CD30+, CD15 variable, muy numerosas y con patrones difuso o nodular y expresión intensa de marcadores de línea B (CD20, CD79a, PAX5, OCT2, CD19). Se acepta la expresión débil o ausencia de expresión de algún marcador B (p. ej. CD20) si otros marcadores B son positivos. [3,10]. La mayoría de los casos se presentan en el mediastino en varones jóvenes. Son tumores agresivos con incidencia de recaída mayor que en cada una de las entidades «puras». Aunque aún deben definirse estrategias óptimas de tratamiento, los datos actuales sugieren que terapia agresiva tipo linfoma B primario mediastínico (EPOCH, DA-EPOCH) asociado a Rituximab puede obtener una alta tasa de remisiones [11].

Linfomas compuestos y linfomas secuenciales (HLc en una biopsia y linfoma B difuso primario mediastínico en la recaída, o viceversa) son fenómenos relacionados con esta entidad. Se excluye de este concepto tumores agresivos resultado de la transformación de linfomas de bajo grado, así como la presencia de células tipo RS en otros tipos de linfomas B y T reconocibles.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección. Punción biopsia con aguja gruesa (BAG): se puede utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo *Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico*.

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección imprescindible para la estadificación de todos los casos de LH. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

Los casos de LHPLN plantean diagnóstico diferencial histopatológico con LHc y con linfomas B difusos de células grandes (LBDCG), en particular las formas de Linfoma B rico en células T e histiocitos, así como procesos reactivos (en particular hiperplasia folicular reactiva con transformación progresiva de centros germinales) [3].

Los casos de LHc plantean diagnóstico diferencial histopatológico con una amplia variedad de procesos neoplásicos no linfoides y linfoides, así como procesos reactivos. Es particularmente trascendente la diferenciación con linfomas B difusos de células grandes (LBDCG), en particular las formas de Linfoma B rico en células T e histiocitos [7], y con Linfomas de células T (linfoma T periférico, linfoma T angioinmunoblástico y linfoma anaplásico ALK+) [3].

En el diagnóstico inicial debe incluir un estudio morfológico adecuado con hematoxilina –eosina (HE). El diagnóstico se establece por la presencia de las células de HRS y sus variantes, en el apropiado contexto celular reactivo. El panel inmunofenotípico básico debe incluir marcadores de línea linfoide (CD45), línea B (CD20, CD79a) y línea T (CD3), además de CD30 y CD15. Adicionalmente, en el diagnóstico diferencial se debe tener en cuenta:

- LHPLN: morfología característica y expresión normal de marcadores de línea B; puede ser complementado con PAX5 y OCT2; la celularidad acompañante son linfocitos B maduros IgD+, formando nódulos (al menos focalmente). Se distinguen varios patrones morfológicos con impacto pronóstico.
- LHc: morfología característica y presencia de células de HRS típicas en todas las formas de la enfermedad; expresión de CD30 (en virtualmente todos los casos) y CD15 (75%); expresión defectiva de CD45, CD20, CD79a; las células de HRS expresan habitualmente PAX5 y OCT2; la celularidad acompañante es variada según subtipos histológicos:
  - LHcRL: imagen semejante a LHPLN, con nódulos de linfocitos B maduros, pero con células neoplásicas de HRS en lugar de células L&H [12].

- LHc subtipo EN: nódulos neoplásicos rodeados de esclerosis con abundantes linfocitos T, histiocitos y eosinófilos; variantes «lacunares» de células de HRS.
- LHc subtipo CM: patrón difuso o nodular; puede haber fibrosis intersticial fina; fondo celular muy heterogéneo, con abundantes histiocitos (incluso granulomas), células plasmáticas y eosinófilos; variantes «momificadas» de células de HRS.
- LHc subtipo DL: predominio de abundantes células tumorales, HRS y variantes mononucleares; escaso fondo reactivo con fibrosis intersticial.
- Linfomas B inclasificable, con rasgos intermedios entre LBDCG y LHc: se define por la presencia de rasgos morfológicos y fenotípicos intermedios o superponibles entre LHc y LBDCG, habitualmente linfoma B difuso primario mediastínico; presencia de típicas células HRS, CD30+, muy numerosas y con patrones difuso o nodular y expresión intensa de marcadores de línea B [3].
- LBDCG asociado a EBV y edad avanzada, granulomatosis linfomatoide y casos de desorden linfoproliferativo post-trasplante de tipo LH: pueden presentar rasgos morfológicos de LHc; es imprescindible la evaluación de EBV y considerar expresión normal de marcadores de línea B [3].
- En determinados casos, se debe considerar en el diagnóstico diferencial subtipos específicos de linfomas T.

Estos diagnósticos diferenciales deben tener en cuenta características clínicas de la enfermedad (localización de las lesiones) y del paciente (edad), rasgos morfológicos e inmunofenotípicos.

## PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

En los casos característicos y ante una presentación clínica típica, un adecuado estudio morfológico de la biopsia y un panel IHQ básico serán suficientes para el diagnóstico:

### Panel de primera línea:

- Linfoma de Hodgkin clásico: CD45 (ALC), CD20, CD3, CD30, CD15, PAX5.  
Es necesario determinar la presencia de EBV mediante IHQ para EBV-LMP1.
- Linfoma de Hodgkin de tipo Predominio Linfocítico Nodular: CD20, OCT2, CD3, PD1, BCL2.

### Paneles de segunda línea:

- Ante sospecha de LHPLN y en casos conflictivos es recomendable el uso de EMA, IGD y otros marcadores de línea B como CD79 y BCL6.
- Existe evidencia de que la expresión incrementada de proteína BCL2 en casos de LHc, puede asociarse a falta de respuesta a terapia habitual (nivel de evidencia III) [13,14].
- Ante el diagnóstico diferencial de subtipos específicos de linfomas T, se deben incluir marcadores fenotípicos dirigidos: CD4, CD8, PD1, ALK.
- Conveniente si se sospecha LBDCG asociado a EBV y edad avanzada, granulomatosis linfomatoide y desorden linfoproliferativo post-trasplante: hibridación in situ para EBV-EBER.

## CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

En general, el análisis de clonalidad linfoide B (reordenamientos de IGH) mediante PCR y electroforesis capilar no es necesario para el diagnóstico de LHc.

En contadas ocasiones, en especial ante la expresión anormal de marcadores fenotípicos T, o dificultad en el diagnóstico diferencial con linfomas T, puede ser útil el análisis de clonalidad linfoide T (reordenamientos de TCR) [15].

Los estudios citogenéticos y/o de cariotipo no están recomendados en el diagnóstico del LH.

## RECOMENDACIONES

1. Panel de primera línea Linfoma de Hodgkin clásico: CD45 (ALC), CD20, CD3, PAX5, CD30, CD15, EBV-LMP1.  
  
Panel de primera línea Linfoma de Hodgkin de tipo Predominio Linfocítico Nodular: CD20, OCT2, CD3, PD1, BCL2. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. Paneles de segunda línea: CD79, BCL6, EMA, IGD, CD4, CD8, ALK, hibridación in situ para EBV-EBER. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. Estudios de clonalidad linfoide B y T mediante PCR y electroforesis capilar en casos seleccionados. Grado C. Evidencia nivel IV.
4. Los estudios citogenéticos/cariotipo no están recomendados en el diagnóstico del LH. Grado C. Evidencia nivel IV.

## Bibliografía

1. Hummel M, Marafioti T, Stein H. Clonality of Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1999;340(5):394-395.
2. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, et al. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood.* 2000;95(4):1443-1450.
3. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008.
4. Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, et al. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood.* 2000;96(5):1889-1899.
5. Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, et al. Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med.* 1997;337(7):453-458.
6. Mason DY, Banks PM, Chan J, et al. Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. A distinct clinicopathological entity. *Am J Surg Pathol.* 1994;18(5):526-530.
7. Fraga M, Sánchez-Verde L, Forteza J, García-Rivero A, Piris MA. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma is a disseminated aggressive neoplasm: differential diagnosis from Hodgkin's lymphoma. *Histopathology.* 2002;41(3):216-229.
8. Nam-Cha SH, Roncador G, Sanchez-Verde L, et al. PD-1, a follicular T-cell marker useful for recognizing nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(8):1252-1257.

9. Khan G. Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: a cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma? *Exp Hematol.* 2006;34(4):399-406.
10. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375-2390.
11. Evens AM, Kanakry JA, Sehn LH, et al. Gray zone lymphoma with features intermediate between classical Hodgkin lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: characteristics, outcomes, and prognostication among a large multicenter cohort. *Am J Hematol.* 2015;90(9):778-783.
12. Nam-Cha SH, Montes-Moreno S, Salcedo MT, Sanjuan J, Garcia JF, Piris MA. Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: distinctive tumor and microenvironment markers. *Mod Pathol.* 2009;22(8):1006-1015.
13. Garcia JF, Camacho FI, Morente M, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood.* 2003;101(2):681-689.
14. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, et al. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood.* 2002;100(12):3935-3941.
15. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia.* 2012;26(10):2159-2171.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas T y T/NK: Leucemias/Linfomas linfoblásticos (T y B)

**Máximo Fraga**

*maximo.fraga@usc.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela.*

## DEFINICIÓN

La OMS (2008) las define como neoplasias de células precursoras (linfoblastos) comprometidas hacia estirpe B o T. Como contrapartida normal se postulan células *stem* hematopoyéticas o células progenitoras B en el primer caso y células progenitoras T o linfocitos tímicos en el segundo.

Morfológicamente constan de células blásticas de pequeño o mediano tamaño, con citoplasmas escasos y núcleos irregulares o redondeados que generalmente muestran cromatina finamente punteada y nucleolo poco aparente.

Se trata de una enfermedad típica de la infancia: el 75% de los pacientes tiene menos de 6 años. Se estima una incidencia mundial de entre 1-4,75 cada 100.000 personas/año.

La misma enfermedad puede presentarse como linfoma (lesión de tipo masa) o como leucemia (afectación de médula ósea y sangre periférica). Si coexisten ambos tipos de afectación, la denominación es puramente arbitraria, aunque en protocolos terapéuticos suele emplearse un umbral del 25% de blastos para considerarlo leucemia. Entre los casos de fenotipo B, lo habitual es la presentación leucémica, mientras que las neoplasias precursoras T suelen ser linfomas con masa mediastínica.

La clasificación actual de la OMS (2008) las divide en:

- Linfoma/leucemia linfoblástica B (no específica)
- Linfoma/leucemia linfoblástica B con anomalías citogenéticas recurrentes
- Linfoma/leucemia linfoblástica T

De acuerdo con ello, basta el estudio morfológico e inmunohistoquímico para establecer el diagnóstico de linfoma/leucemia linfoblástica (LLB) y distinguir entre LLB de fenotipo B (LLB-B) y fenotipo T (LLB-T). En cambio, se requerirán estudios citogenéticos para saber si un caso de LLB-B presenta alteraciones cromosómicas características que permitan subclasificarlo.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia de médula ósea:** La médula ósea se encuentra siempre infiltrada, por definición, en los casos leucémicos. La infiltración suele ser difusa en la presentación, pero en las recaídas puede ser focal. Salvo en casos de médula «empaquetada» o fibrosis reticulínica, el aspirado medular y/o la

sangre periférica pueden aportar información muy valiosa para el diagnóstico, con el inmunofenotipo por citometría de flujo y los estudios citogenéticos.

**Biopsia escisional/incisional de adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección siempre que no exista afectación medular. En el linfoma LB-B, los tejidos más frecuentemente afectados son piel, tejidos blandos, hueso y ganglios linfáticos. En el linfoma LB-T suele haber una masa mediastínica anterior y, a menudo, adenopatías, aunque la presentación puede incluir también otras localizaciones.

**Punción-biopsia con aguja gruesa (BAG):** En casos sin afectación medular y en los que la biopsia escisional/incisional esté contraindicada por la localización de la lesión y/o la situación clínica del paciente.

**Punción-aspiración con aguja fina (PAAF):** No debe utilizarse para el diagnóstico inicial; su uso solo sería admisible, en ciertos casos, para el seguimiento de la enfermedad.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico diferencial de LLB se debe realizar, en primer lugar, con otras proliferaciones de morfología de tipo blástico. En algunas ocasiones, determinadas características morfológicas que pueden aparecer, como imagen «en cielo estrellado» o una arquitectura multinodular («pseudofolicular»), pueden plantear también problemas con linfoma de Burkitt o linfoma folicular, respectivamente. También deben ser considerados tumores no hematolinfoides que presentan una morfología semejante.

En concreto, los diagnósticos diferenciales que se pueden plantear son:

- Leucemia mieloide aguda (LMA) y sarcoma mieloide (SM)
- Leucemia aguda de estirpe ambigua
- Neoplasia de célula dendrítica blástica plasmocitoide
- Linfoma del manto blastoide
- Linfoma de Burkitt
- Linfoma folicular
- Linfoma B difuso de células grandes
- Timo ectópico
- Timoma rico en linfocitos
- Tumores de células redondas y azules (sarcoma de Ewing, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma embrionario, meduloblastoma)
- Hematogonias (precursores normales de células B en médula ósea)

Con respecto a la diferenciación entre LLB-B, LLB-T y LMA/SM, una fuente de error pueden ser las positivities «aberrantes», es decir, la expresión de marcadores que son más propios de otras estirpes celulares que de la verdadera estirpe tumoral. Hay que recordar que LLB-T puede expresar antígenos B (p. ej. CD79a en un 10% de casos), y viceversa. Los LLB -B y -T también pueden expresar algunos antígenos mieloides (CD13, CD15, CD33), así que esto no supone automáticamente un diagnóstico de LMA/SM o que se trate de una neoplasia bifenotípica. Para el diagnóstico de leucemia aguda de estirpe ambigua deben seguirse los criterios de la OMS (2008).

## PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

**Panel de primera línea:** CD79a, PAX5, CD3, CD7, CD10, TdT, mieloperoxidasa.



### Paneles de segunda línea:

- LLB-B: CD19, CD22, CD24, CD25, CD15, CD13, IgM.
- LLB-T: CD2, CD5, CD4, CD8, CD34, CD1a.

El panel de primera línea tiene como objetivo confirmar el diagnóstico de LLB y asignar la estirpe más probable con anticuerpos relativamente comunes. El segundo panel confirma la estirpe tumoral y ofrece información adicional para subclasificar la enfermedad en función de su grado de diferenciación, lo que parece tener trascendencia clínica; en el caso de LLB-B, algunos de los marcadores propuestos se relacionan con alteraciones citogenéticas recurrentes (v. siguiente apartado). Existe un pequeño porcentaje de casos de LLB y T que muestran expresión limitada o negatividad para TdT.

### CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

En la categoría de **LLB-B no específica** existen alteraciones genéticas que se correlacionan con pronóstico adverso: la amplificación intracromosómica del gen AML1 en el cromosoma 21 (iAMP21) y la muy rara t(17;19).

En la **LLB-B con anomalías citogenéticas recurrentes** se reconocen las siguientes alteraciones genéticas asociadas a una biología distintiva de la enfermedad:

- t(9;22)(q33;q11.2); BCR-ABL1 (fenotipo característico: expresión de CD19, CD10, CD25, CD13 y CD33): adultos, pronóstico infausto, tratamiento adicional con imatinib mejora la supervivencia libre de evento.
- t(v;11q23); reordenamiento de MLL (fenotipo característico: CD19+, CD10-, CD15+): alto recuento leucocitario, afectación de sistema nervioso central.
- t(12;21)(p13;q22); TEL-AML1 (fenotipo característico: CD19+, CD10+, CD13+): buena respuesta a tratamiento estándar.
- hiperdiploidía cromosómica (CD19+, CD10+; otros, variables): buena respuesta a tratamiento estándar.
- hipodiploidía (CD19+, CD10+; otros, variables): mal pronóstico.
- t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH (CD19+, CD10+; otros, variables): eosinofilia reactiva inducida por IL-3, blastos pueden ser menos del 20% en médula ósea e indetectables en sangre periférica.
- t(1;19)(q23;p13.3); E2A-PBX1 (fenotipo característico: CD19+, CD10+, IgMc): no presenta asociación significativa con la respuesta a protocolos terapéuticos actuales, pero sus peculiares fenotipo y genética sustentan su reconocimiento como una entidad aparte.

En **LLB-T**, aunque existen numerosas alteraciones citogenéticas recurrentes, no son necesarias para el diagnóstico y su relevancia pronóstica es controvertida. Se trata habitualmente de translocaciones, que involucran a la región reguladora de uno de los loci TCR y a genes como HOX11, MYC, TAL1, LYL1, HOX11L2, NOTCH1, etc.

Con respecto a los genes de receptores de antígenos (IgH y TCR), prácticamente todos los casos muestran reordenamiento clonal de los mismos, pero es frecuente la denominada «infidelidad de estirpe»: hasta un 70% de LLB-B pueden presentar clonalidad adicional para TCR; en el caso de LLB-T, un 20% pueden presentar también clonalidad para IgH.

### RECOMENDACIONES

1. Debe tenerse siempre en cuenta, para interpretar los datos inmunohistoquímicos, que no hay ningún marcador absolutamente específico para una entidad. Como en cualquier otro campo de la patología, el diagnóstico debe establecerse en función de la morfología, con un panel de anticuerpos adecuado, y de acuerdo con el contexto clínico del paciente. Por ejemplo,

- TdT, aunque muy característico de LLB, puede ser positivo también en casos de LMA/SM. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. Debe recordarse que los LLB, además de los marcadores de estirpe «propios», pueden expresar marcadores de la otra estirpe linfoide o incluso marcadores mieloides, aunque generalmente de forma más débil o restringida. Los diagnósticos de «estirpe ambigua» deben ceñirse a los criterios establecidos en la clasificación de la OMS (2008). Grado C. Evidencia nivel IV.
  3. En tejidos parafinados, los marcadores más sensibles y específicos de estirpe B y T se consideran PAX5 y CD3 respectivamente, teniendo en cuenta las salvedades del apartado anterior (PAX5, por ejemplo, puede ser positivo también en algunas LMA, especialmente las que portan t(8;21)). De acuerdo con el panel IHQ de primera línea propuesto, se puede sustentar un diagnóstico de LLB de acuerdo con los siguientes perfiles resultantes:
  4. LLB-B: CD79a+, PAX5+, CD10+, TdT+, CD3-, CD7-, mieloperoxidasa-. Grado C. Evidencia nivel IV.
  5. LLB-T: CD3+, CD7+, TdT+, CD10- (puede ser+), CD79a-, PAX5-, mieloperoxidasa-. Grado C. Evidencia nivel IV.
  6. El panel IHQ de segunda línea ayuda a establecer la estirpe tumoral en casos dudosos. También, aunque esto es opcional, permite especificar el grado de diferenciación de los LLB. Grado C. Evidencia nivel IV.
  7. A la hora de valorar una masa mediastínica, debe recordarse que la mera presencia de células T con fenotipo inmaduro (TdT, CD1a, CD99 y CD3 +) no es sinónimo de LBL-T, ya que tanto en timo normal como en hiperplasias tímicas y timomas, existen poblaciones normales con inmunofenotipo similar. Grado C. Evidencia nivel IV.
  8. De igual manera, la presencia de células CD19+, CD10+ en médula ósea no implica necesariamente un diagnóstico de LBL-B, ya que puede tratarse de hematogonias, precursores normales de células B. Grado C. Evidencia nivel IV.
  9. En LLB los reordenamientos de IgH y TCR no son útiles para la asignación de estirpe B o T, dada la frecuente «infidelidad de estirpe». Es útil la demostración de clonalidad linfoide para apoyar un diagnóstico de proceso linfoproliferativo. Grado C. Evidencia nivel IV.

#### Bibliografía

1. Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla. Martínez L. Hematopathology. Second Edition. Saunders, 2017.
2. McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol* 2012; 29 (1): 2-11.
3. Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 2012; 26(3):123-35.
4. Savage NM, Johnson RC, Natkunam Y. The spectrum of lymphoblastic, nodal and extranodal T-cell lymphomas: characteristic features and diagnostic dilemmas. *Hum Pathol* 2013; 44 (4): 451-71.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. IARC: Lyon 2008.

# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas T y T/NK: Linfomas T ganglionares: Linfoma de células T periférico (NOS)

**Máximo Fraga**

*maximo.fraga@usc.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela.*

## DEFINICIÓN

Los linfomas T ganglionares constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias, tanto por su patogenia como por sus características histológicas e inmunofenotípicas; habitualmente cursan con una clínica agresiva y pobre respuesta a terapia.

Se distinguen las siguientes categorías: el linfoma de células T periférico no específico (NOS) (LCTP), Linfomas ganglionares de células T con fenotipo *follicular helper* (LCTFH) y el linfoma de células grandes T anaplásico (LCGAT) ALK+ y ALK-. Los LCTFH incluyen el linfoma T angioinmunoblástico (LTAI), el linfoma de células T folicular (LTF) y otros linfomas T ganglionares con fenotipo *follicular helper* no específicos (LCTFH NOS).

El linfoma de células T periférico (LCTP) es una neoplasia clonal derivada de células linfoides T maduras. La OMS define la entidad como un grupo heterogéneo de linfomas T, mayoritariamente ganglionares, que no cumple los criterios diagnósticos de alguna de las otras categorías de linfoma T. Es por tanto un diagnóstico de exclusión en la mayoría de los casos.

El LTP es más común en poblaciones sin alta incidencia de infección por EBV (Norteamérica y Europa). La presentación es predominantemente ganglionar, pero puede existir extensión extraganglionar; a menudo es una enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico. Puede haber incluso presentaciones extraganglionares (piel, tracto gastrointestinal...), pero en este caso deben descartarse primero entidades específicas. El curso clínico es muy agresivo, con escasa respuesta al tratamiento.

La morfología puede ser extremadamente variable y los subtipos morfológicos no tienen valor pronóstico. Las células neoplásicas pueden ser de tamaño medio-grande, con pleomorfismo, o pequeñas, con núcleos irregulares, en los que la atipia puede ser muy sutil.

El patrón de infiltración es con mayor frecuencia difuso, aunque no siempre (p. ej. variante «zona T», con patrón perifolicular).

El acompañamiento vascular e inflamatorio también es variable. Puede haber abundantes grupos de histiocitos epitelioides («variante linfoepitelioides» o «de Lennert», que tiende a permanecer más tiempo localizada en ganglios y a tener mejor pronóstico).

Un subgrupo de LCTP («LCTP citotóxico NOS») puede presentar fenotipo citotóxico, con expresión de uno o más marcadores de este tipo: TIA1, perforina, granzima B (GZB). Son más frecuentes en Asia y parecen tener peor pronóstico, salvo cuando se asocian a histología tipo «linfoma de Lennert».

Puede existir proliferación B asociada en el 20% de casos (linfocitos B maduros o células plasmáticas). Es necesario recordar que evidencia de clonalidad B mediante PCR no es criterio suficiente para el diagnóstico de linfoma B, ya que puede detectarse en procesos linfoproliferativos T.

### TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección.

**Punción biopsia con aguja gruesa (BAG):** se puede utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo *Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico*.

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección imprescindible para la estadificación de todos los casos. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro.

### DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

Los casos de LCTP plantean diagnóstico diferencial histopatológico con una gran variedad de procesos:

Otros linfomas:

- Linfoma T angioinmunoblástico.
- Linfoma de células grandes T anaplásico.
- Linfomas extranodales T/NK de tipo nasal
- Linfoma B rico en células T e histiocitos
- Linfoma de Hodgkin, tanto formas clásicas como de tipo predominio linfocítico

Linfadenopatías no neoplásicas

- Hiperplasia linfoide paracortical (zona T)
- Linfadenitis virales, en particular mononucleosis infecciosa
- Linfadenitis por fármacos
- Linfadenopatía dermatopática
- Linfadenitis por toxoplasma
- Enfermedades granulomatosas
- Linfadenitis en el síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS)
- Linfadenitis de Kikuchi-Fujimoto

El estudio diagnóstico inicial debe incluir un estudio morfológico adecuado con hematoxilina-eosina (HE). El panel inmunofenotípico básico debe incluir marcadores de línea linfoide (CD45), línea T (CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7), línea B (CD20, CD79a) y CD30. La expresión anormal de marcadores T es útil en el reconocimiento de procesos neoplásicos (pérdida de antígenos T, expresión intensa de CD56...). También es conveniente incluir marcadores citotóxicos (TIA1 y/o GZB y/o perforina). Adicionalmente, en el diagnóstico diferencial se debe tener en cuenta:

- En el diagnóstico diferencial con linfoma T angioinmunoblástico y otros linfomas ganglionares con fenotipo TFH («T *follicular helper*») se deben incluir marcadores de células dendríticas foliculares (CD23 y/o CD21) y marcadores de linfocitos TFH (como PD1, CD10,

BCL6, ICOS y/o CXCL13), así como estudio de EBV mediante hibridación in situ para EBER (la inmunohistoquímica para LMP1 tiene numerosos falsos negativos en esta situación).

- En el diagnóstico diferencial con linfoma de Hodgkin clásico se deben incluir CD30, CD15 y PAX5 u OCT2.
- En el diagnóstico diferencial con Linfoma T anaplásico se deben incluir CD30, EMA, ALK.
- En el diagnóstico diferencial con otros linfomas T se deben incluir marcadores inmunofenotípicos adicionales (p. ej. CD56 para linfoma T/NK extraganglionar de tipo nasal o un tipo de linfoma T asociado a enteropatía).
- En muchas ocasiones se precisa el análisis de clonalidad linfoide T (reordenamientos de TCR) y B (reordenamientos de IGH) como datos coadyuvantes al diagnóstico. La presencia de clonalidad linfoide T en un contexto morfológico y fenotípico apropiado (fenotipo aberrante) favorece el diagnóstico de proceso linfoproliferativo. Se pueden encontrar reordenamientos monoclonales de IgH en un subgrupo de casos de linfoma T, tanto LCTP como LTAI (*v. más adelante*).

Estos diagnósticos diferenciales deben tener en cuenta características clínicas de la enfermedad (síntomas sistémicos, localización de las lesiones) y del paciente (edad), además de rasgos morfológicos, inmunofenotípicos y moleculares.

### PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Todos los procesos linfoproliferativos T precisan estudio inmunofenotípico completo y, en la mayoría de las ocasiones, estudio molecular complementario.

**Panel de primera línea:** CD20, CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD30, CD56.

#### Paneles de segunda línea:

- Marcadores citotóxicos.
- Hibridación in situ para EBERs.
- Paneles específicos para diagnóstico diferencial con LH y linfomas B: dirigidos.
- Ante el diagnóstico diferencial con subtipos específicos de linfomas T, se deben incluir marcadores fenotípicos específicos: PD1, CD10, BCL6, ICOS, CXCL13, ALK, TCRbF1, TCR Gamma, TIA1, perforina, GZB.

### CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

Se recomienda análisis de clonalidad linfoide T y B (reordenamientos de TCR e IGH) mediante PCR y electroforesis capilar. La presencia de clonalidad linfoide T en un contexto morfológico y fenotípico apropiado (fenotipo aberrante) favorece el diagnóstico de proceso linfoproliferativo. Hay que recordar, sin embargo, que en algunos casos se puede observar clonalidad B.

Los estudios citogenéticos y/o de cariotipo no son necesarios para diagnóstico rutinario. Con frecuencia se detectan alteraciones cariotípicas complejas que ayudan a establecer clonalidad, pero no son significativas para el diagnóstico o pronóstico. Es interesante señalar, sin embargo, que dichas alteraciones son diferentes a las que se observan en otros linfomas T, como el linfoma T angioinmunoblástico y el linfoma anaplásico de células grandes T.

Se están identificando mutaciones en diversos genes (mediadores epigenéticos, vías señaladoras y supresores tumorales) que en el futuro podrán mejorar la clasificación de estos tumores o suponer nuevas dianas terapéuticas.

## RECOMENDACIONES

1. Panel de primera línea: CD20, CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD30, CD56. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. Paneles de segunda línea dirigidos (PAX5, CD15, PD1, CD10, BCL6, ICOS, CXCL13, CD21, CD23, ALK, TIA1, PERFORINA, GZB, TCR bF1, TCR Gamma), hibridación in situ para EBV-EBER. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. Estudios de clonalidad linfoide B y T mediante PCR y electroforesis capilar en casos seleccionados. Grado C. Evidencia nivel IV.

## REFERENCIAS:

1. Asano N, Suzuki R, Kagami Y, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of cytotoxic molecule expression in nodal peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:1284-1293.
2. Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martínez L. *Hematopathology. Second Edition.* Saunders, 2017.
3. Savage KJ. *Blood Rev. Peripheral T-cell lymphomas.* 2007 Jul;21(4):201-16.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition.* IARC: Lyon 2008.
5. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375-90.
6. Tan BT, Warnke RA, Arber DA. The frequency of B- and T-cell gene rearrangements and Epstein-Barr virus in T-cell lymphomas: a comparison between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified with and without associated B-cell proliferations. *J Mol Diagn.* 2006 Sep;8(4):466-75.
7. Warnke RA, Jones D, Hsi ED. Morphologic and immunophenotypic variants of nodal T-cell lymphomas and T-cell lymphoma mimics. *Am J Clin Pathol.* 2007 Apr;127(4):511-27.

# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas T y T/NK: Linfomas T ganglionares: Linfomas ganglionares de células T con fenotipo *follicular helper*

**Máximo Fraga**

*maximo.fraga@usc.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela.*

## DEFINICIÓN

La característica común de esta categoría es la expresión por parte de las células T neoplásicas de un fenotipo FH, definido como la expresión de al menos 2 de los siguientes marcadores: PD1 (CD279), CD10, BCL6, CXCL13, ICOS, SAP y CCR5. Además de un fenotipo común, en estos tumores se observan alteraciones moleculares y citogenéticas compartidas (alteraciones que en un futuro podrían tener relevancia terapéutica).

Sin embargo, entre los tipos de linfomas englobados en esta categoría existen diferencias clinicopatológicas que justifican un diagnóstico más específico. Debemos distinguir, por tanto, entre linfoma T angioinmunoblástico (LTAI), linfoma de células T folicular (LTF) y linfomas T ganglionares con fenotipo *follicular helper* no específicos (LCTFH NOS). Los dos últimos se incorporan a la clasificación de la OMS de 2016 como entidades provisionales.

## LINFOMA T ANGIOINMUNOBLÁSTICO

El linfoma T angioinmunoblástico (LTAI) es una neoplasia de probable origen en células T del centro germinal, CD4+, caracterizado por un infiltrado celular polimorfo con una característica proliferación de vénulas de endotelio alto y células dendríticas foliculares.

Se presenta habitualmente como enfermedad sistémica (estadio III/IV) con síntomas constitucionales asociados (fiebre, rash cutáneo prurítico, edema...), anomalías analíticas (anemia, hipergammaglobulinemia policlonal...), esplenomegalia y otros desórdenes inflamatorios o autoinmunes (artritis, vasculitis, pleuritis, anemia hemolítica). Pronóstico semejante a LCTP, NOS.

Son criterios diagnósticos:

- Pérdida de la arquitectura ganglionar normal
- Centros germinales atróficos o ausentes.
- Prominente proliferación arborizante de vénulas de endotelio alto.
- Patente seno subcapsular.

- Infiltrado polimorfo paracortical que incluye linfocitos, inmunoblastos, células plasmáticas, histiocitos y eosinófilos. Proliferación de células dendríticas fuera de los centros germinales y alrededor de las vénulas de endotelio alto.
- La población T neoplásica habitualmente está enmascarada y es poco patente: usualmente células de tamaño pequeño o intermedio, con citoplasma claro y contorno nuclear irregular. Con frecuencia agrupadas alrededor de las vénulas.

Se describe una forma asociada a folículos hiperplásicos con centros germinales reactivos.

Muchos casos presentan expansión B acompañante, con frecuencia positiva para EBV-EBER. Estas células B pueden adoptar una morfología semejante a células de Hodgkin y Reed-Sternberg, incluso con positividad para CD30 y CD15, que puede ser causa de error diagnóstico.

El diagnóstico de linfoma B de células grandes asociado (frecuentemente EBV+) requiere la existencia de grandes grupos cohesivos de células B atípicas. De igual forma, el diagnóstico de plasmocitoma requiere grupos extensos de células plasmáticas monoclonales. La evidencia molecular (PCR) de clonalidad B no es suficiente para el diagnóstico de neoplasia B asociada.

### TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección. Punción biopsia con aguja gruesa (BAG): se puede utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo *Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico*.

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección imprescindible para la estadificación de todos los casos. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro.

### DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

Otros linfomas

- LCTP
- Linfomas B, en particular linfoma B de la zona marginal, nodal, y linfoma folicular.
- Linfoma B rico en células T e histiocitos
- Linfoma de Hodgkin, tanto formas clásicas como de tipo predominio linfocítico

Linfadenopatías no neoplásicas

- Hiperplasia linfoide paracortical (zona T)
- Linfadenitis virales, en particular mononucleosis infecciosa
- Linfadenitis por fármacos
- Linfadenitis por toxoplasma
- Enfermedad de Castleman, tipo plasmocelular

El diagnóstico inicial debe incluir un estudio morfológico adecuado con hematoxilina-eosina (HE). El panel inmunofenotípico básico debe incluir marcadores de línea linfoide (CD45), línea T (CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7) y línea B (CD20, cadenas ligeras kappa y lambda). Se deben incluir también marcadores de células foliculares dendríticas (CD23 y/o CD21), marcadores de linfocitos TFH (PD1, CD10, BCL6 y/o CXCL13), así como estudio de EBV mediante hibridación in situ para EBER (la inmunohistoquímica para LMP1 tiene numerosos falsos negativos en esta situación).



- En el diagnóstico diferencial con linfoma de Hodgkin clásico se deben incluir CD30, CD15 y PAX5 u OCT2.
- En el diagnóstico diferencial con linfoma anaplásico se deben incluir CD30 y ALK.
- En el diagnóstico diferencial con otros linfomas T se debe incluir marcadores inmunofenotípicos adicionales.
- En muchas ocasiones se precisa el análisis de clonalidad linfoide T (reordenamientos de TCR) y B (reordenamientos de IGH).

Estos diagnósticos diferenciales deben tener en cuenta características clínicas de la enfermedad (con especial atención a la presencia de síntomas sistémicos y anomalías analíticas en virtualmente todos los casos) y rasgos morfológicos e inmunofenotípicos.

### **PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)**

Todos los procesos linfoproliferativos T precisan estudio inmunofenotípico completo, y en la mayoría de las ocasiones estudio molecular complementario.

**Panel de primera línea:** CD20, CD3, CD4, CD8, CD30, cadenas ligeras kappa y lambda, marcadores de células TFH (PD1, CD10, BCL6, ICOS y/o CXCL13), marcadores de células foliculares dendríticas (CD23 y/o CD21) e hibridación in situ para EBERs.

**Paneles de segunda línea:** Paneles específicos para diagnóstico diferencial con LH, otros linfomas T y linfomas B: dirigidos: CD56, PAX5, CD15, ALK, TIA1, PERFORINA, GZB, TCR bF1, TCR Gamma.

### **CITOGENÉTICA Y MOLECULAR**

Se recomienda análisis de clonalidad linfoide T y B (reordenamientos de TCR e IGH) mediante PCR y electroforesis capilar.

Los estudios citogenéticos y/o de cariotipo (trisomía 3, trisomía 5, cromosoma X adicional) no son necesarios para diagnóstico rutinario: Tampoco se requieren estudios mutacionales, que descubren con frecuencia mutaciones de TET2, RHOA, DNMT3A e IDH2; gran parte de estas alteraciones, a excepción quizá de IDH2, parecen ser compartidas por las entidades provisionales que se describen a continuación.

### **ENTIDADES PROVISIONALES: LINFOMA DE CÉLULAS T FOLICULAR (LTF) Y LINFOMAS T GANGLIONARES CON FENOTIPO FOLLICULAR HELPER NO ESPECÍFICOS (LCTFH NOS)**

El LTF se caracteriza por crecimiento folicular o perifolicular de células neoplásicas con fenotipo TFH. Carece del infiltrado difuso polimorfo y la prominente vascularización del LTAI. Como este último, también puede presentar células blásticas B, a menudo EBV+. Se suele presentar de forma más localizada y con menor sintomatología general.

El LCTFH NOS comprendería casos que presentan fenotipo FTH pero carecen de las características histológicas descritas en los tipos precedentes.

### **RECOMENDACIONES**

1. Panel de primera línea: CD20, CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD30, PD1, CD10, bcl6, ICOS, CXCL13, CD23, hibridación in situ para EBV-EBER. Grado C. Evidencia nivel IV.

2. Paneles de segunda línea dirigidos: CD56, PAX5, CD15, ALK, TIA1, PERFORINA, GZB, TCR bF1, TCR Gamma, ICOS. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. Estudios de clonalidad linfoide B y T mediante PCR y electroforesis capilar en casos seleccionados. Grado C. Evidencia nivel IV.

## Bibliografía

1. Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, Munson P, Liu H, Du MQ, Isaacson PG, Dogan A. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood*. 2002 Jan 15;99(2):627-33.
2. Bruggemann M, White H, Gaulard P, Garcia-Sanz R, Gameiro P, Oeschger S, Jasani B, Ott M, Delsol G, Orfao A, Tiemann M, Herbst H, Langerak AW, Spaargaren M, Moreau E, Groenen PJ, Sambade C, Foroni L, Carter GI, Hummel M, Bastard C, Davi F, Delfau-Larue MH, Kneba M, van Dongen JJ, Beldjord K, Molina TJ. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. *Leukemia*. 2007 Feb;21(2):215-21.
3. Dupuis J, Boye K, Martin N, et al. Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T cells. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:490-494.
4. Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martínez L. *Hematopathology*. Second Edition. Saunders, 2017.
5. Kojima M, Nakamura S, Itoh H, Motoori T, Sugihara S, Shinkai H, Masawa N. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma with hyperplastic germinal centers: a clinicopathological and immunohistochemical study of 10 cases. *APMIS*. 2001 Oct;109(10):699-706
6. Merchant SH, Amin MB, Viswanatha DS. Morphologic and immunophenotypic analysis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: Emphasis on phenotypic aberrancies for early diagnosis. *Am J Clin Pathol*. 2006 Jul;126(1):29-38.
7. Quintanilla-Martinez L, Fend F, Moguel LR, Spilove L, Beaty MW, Kingma DW, Raffeld M, Jaffe ES. Peripheral T-cell lymphoma with Reed-Sternberg-like cells of B-cell phenotype and genotype associated with Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol*. 1999 Oct;23(10):1233-40.
8. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Fourth Edition. IARC: Lyon 2008.
9. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
10. Tan BT, Warnke RA, Arber DA. The frequency of B- and T-cell gene rearrangements and Epstein Barr virus in T-cell lymphomas: a comparison between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified with and without associated B-cell proliferations. *J Mol Diagn*. 2006 Sep;8(4):466-75.
11. Warnke RA, Jones D, Hsi ED. Morphologic and immunophenotypic variants of nodal T-cell lymphomas and T-cell lymphoma mimics. *Am J Clin Pathol*. 2007 Apr;127(4):511-27.

# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas T y T/NK: Linfoma de células grandes T anaplásico, ALK+ y ALK-

**Máximo Fraga**

*maximo.fraga@usc.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela.*

## DEFINICIÓN

El linfoma de células grandes T anaplásico (LCGTA) es una neoplasia sistémica habitualmente compuesta de grupos cohesivos de células grandes atípicas, CD30+, con abundante citoplasma y núcleos pleomórficos. Alrededor del 70% expresan la kinasa del linfoma anaplásico (ALK1) y constituyen una entidad claramente definida, el LCGTA ALK+.

En la nueva clasificación de la OMS de 2016 se incorpora también el LCGTA ALK- como entidad clínica que incluye subtipos citogenéticos con implicaciones pronósticas (p. ej. reordenamientos de IRF4/DUSP22 en 6p25 y reordenamientos de TP63)

Criterios diagnósticos:

- Grupos cohesivos de células grandes atípicas, CD30+, con abundante citoplasma y núcleos pleomórficos.
- «*Hallmark cells*»: células grandes características con núcleos en U, en C, arriñonados o «en donut», rodeando un área de Golgi eosinófila.
- Frecuente patrón intrasinusoidal y/o distribución perivascular.
- Numerosas variantes morfológicas:
  - Variante común o clásica, con las características antes mencionadas bien patentes
  - Variante de células pequeñas
  - Variante linfocítica
  - Variantes ricas en neutrófilos, con células gigantes, con células en «anillo de sello», sarcomatoide, «Hodgkin-like» con esclerosis nodular.
- Inmunofenotipo T o «*null*».
- Ausencia de marcadores de línea B o inmunofenotipo clásico de LH.
- Inmunopositividad para ALK1 y translocación de ALK presentes por definición en los LCGTA ALK+

Los LCGTA ALK+ son más frecuentes en niños y pacientes jóvenes y presentan mejor pronóstico. Los criterios diagnósticos de los casos ALK1 negativos son controvertidos; en general se admiten como tales aquellos casos que muestran las características morfológicas de la variante común e intensa positividad para CD30, frecuentemente acompañada de EMA. No obstante, en muchos casos se discute su posible clasificación como LCTP, NOS.

La expresión de ALK1 no es exclusiva de LCGTA; otros tumores, entre los que se encuentra un subtipo de linfoma B de células grandes y una variante inhabitual de histiocitosis infantil autolimitada grandes pueden expresarlo.

Además de con afectación ganglionar, el LCGTA puede presentarse también con afectación de localizaciones extraganglionares, tejidos blandos y piel; con menor frecuencia, hueso y tracto gastrointestinal.

La infiltración de médula ósea puede ser muy sutil y siempre requiere estudio inmunohistoquímico para CD30 y ALK1.

Los LCGTA ALK- pueden mostrar, como los ALK+, un amplio espectro morfológico. De hecho, morfológicamente han de ser indistinguibles. No se reconoce, sin embargo, una variante de células pequeñas entre los ALK-, ya que no existen marcadores fenotípicos ni moleculares que permitan distinguirlos de LCTP NOS que expresen CD30. Los criterios mínimos para diagnosticar LCGTA ALK-son: presencia de células «*hallmark*», patrón de crecimiento cohesivo y expresión intensa y uniforme de CD30. Otras características indicativas, aunque no imprescindibles, son la pérdida parcial de marcadores T, fenotipo citotóxico, positividad para EMA y crecimiento intrasinusoidal.

Se distingue una forma de Linfoma T anaplásico ALK negativo asociado a implante mamario, con características clínico-patológicas distintivas.

#### TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

**Biopsia escisional/incisional de la adenopatía o tejido extraganglionar afecto:** Es el método de elección. Punción biopsia con aguja gruesa (BAG): se puede utilizar en caso de que no se pueda realizar una biopsia incisional/escisional por la situación clínica del paciente. Véase capítulo *Obtención de las muestras para diagnóstico hematopatológico*.

**Biopsia-cilindro de médula ósea:** Es el método de elección imprescindible para la estadificación de todos los casos. El examen morfológico del aspirado no es suficiente para el diagnóstico en estos casos y se requiere una biopsia cilindro.

#### DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

- Carcinoma (debe recordarse la frecuente positividad para EMA del LCGTA)
- Melanoma
- Linfoma B difuso de células grandes ALK+
- Variantes de linfoma B difuso de células grandes con morfología anaplásica (ALK-).
- Formas clásicas de linfoma de Hodgkin, que a veces pueden ser muy ricas en células tumorales
- Linfoma de células grandes anaplásico, primario cutáneo.

El diagnóstico inicial debe incluir un estudio morfológico adecuado con hematoxilina–eosina (HE). El panel inmunofenotípico básico debe incluir marcadores de línea linfoide, línea T (CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7), línea B (CD20, PAX5), CD30, EMA y ALK.

En algunas ocasiones se precisa el análisis de clonalidad linfoide T (reordenamientos de TCR) y B (reordenamientos de IGH).

## PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

**Panel de primera línea:** CD45, CD43, CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD20, PAX5, CD30, EMA, ALK1.

**Paneles de segunda línea:** Marcadores citotóxicos (TIA1 y/o Granzima B o perforina). Paneles específicos para diagnóstico diferencial con LH y linfomas B

## CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

El **LCGTA ALK+** muestra características citogenéticas distintivas. La expresión inmunohistoquímica de ALK1 que lo define se correlaciona con una translocación del gen ALK, que puede mostrar diversas variantes. La demostración formal de la traslocación es mediante FISH con sondas de tipo BA.

La translocación más frecuente en el LCGTA ALK+ es la t(2;5) (alrededor del 80% de los casos), que involucra a los genes ALK y NPM («*nucleophosmin*»). Dicha translocación se asocia con una positividad de ALK1 de distribución nuclear y citoplasmática.

En aproximadamente un 20% de casos el reordenamiento de ALK es diferente y se asocia con una positividad de ALK1 fundamentalmente citoplasmática (p. ej. t(1;2), que produce la fusión TPM3-ALK).

No se precisa en la mayoría de los casos análisis de clonalidad linfoide (reordenamientos de TCR e IGH) mediante PCR y electroforesis capilar, excepto en los casos con fenotipo «nulo» y para descartar neoplasias B.

Con respecto al **LCGTA ALK-**, se distinguen dos grupos con características citogenéticas y clinicopatológicas diferentes: uno con reordenamientos de DUSP22 (DUSP22-IRF4 en 6p25, ≈30% de los casos), que tiende a ser más monomorfo, sin gránulos citotóxicos y con mejor pronóstico, y otro con reordenamientos de TP63, menos frecuente (≈10%) y muy agresivo.

## RECOMENDACIONES

1. Recordar que no todos los LCGAT ALK+ muestran la gran cantidad de células «*hallmark*» típicas de la variante clásica. Por ello, debido a la gran variabilidad morfológica de estos tumores, no se ha de dudar en incluir ALK1 en el panel de estudio IHQ cuando exista alguna posibilidad de estar ante un LCGAT. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. Ante una alta sospecha diagnóstica de LCGTA ALK+ variante clásica (patrón cohesivo, abundantes células «*hallmark*», positividad para CD30 y EMA), si ALK1 resulta negativo es aconsejable, antes de realizar el diagnóstico de LCGTA ALK-, repetir la inmunotinción (idealmente con otro anticuerpo frente a ALK) y/o realizar FISH con sonda *breakapart* para el gen ALK. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. Panel de primera línea: CD45, CD43, CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD20, PAX5, CD30, EMA, ALK1. Grado C. Evidencia nivel IV.
4. Estudios de clonalidad linfoide B y T mediante PCR y electroforesis capilar en casos seleccionados. Grado C. Evidencia nivel IV.
5. Los criterios mínimos para diagnosticar LCGTA ALK- son: presencia de células «*hallmark*», patrón de crecimiento cohesivo y expresión intensa y uniforme de CD30. De todas formas, es recomendable remitir estos casos a centros con larga trayectoria y experiencia en el diagnóstico de neoplasias hematolinfoides. Grado C. Evidencia nivel IV.

## Bibliografía

1. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* 1998; 91: 2076.
2. Feldman AL, Dogan A, Smith DI, et al. Massively parallel mate pair DNA library sequencing for translocation discovery recurrent t(6;7)(p25.3, q32.3) translocations in ALK negative anaplastic large cell lymphomas. *Blood* 2010; 116: 278.
3. Lamant L, McCarthy K, d'Amore E, et al. Prognostic impact of morphologic and phenotypic features of childhood ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma: results of the ALCL99 study. *J Clin Oncol*. 2011
4. Lamant-Rochaix L, Feldman AL, Delsol G, et al. Anaplastic large cell lymphoma, ALK positive and ALK negative. En: Jaffe ES, Arber DA, Campo E, et al. *Hematopathology*. Second Edition. Saunders, 2017: 673-691.
5. Delsol G, Jaffe ES, Falini B, et al. Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), ALK-negative En: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (Eds.). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Fourth Edition. IARC: Lyon 2008: 317-319.
6. Mason DY, Campo E, Harris NL, et al. Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), ALK-positive En: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (Eds.). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Fourth Edition. IARC: Lyon 2008: 312-316.
7. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127: 2375.
8. Jaffe E, Ashar BS, Clemens MW et al. Best Practices Guideline for the Pathologic Diagnosis of Breast Implant-Associated Anaplastic Large-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2020 Apr 1;38(10):1102-1111.

# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas T y T/NK: Leucemia de linfocitos grandes granulares, leucemia prolinfocítica, linfoma hepatoesplénico, leucemias NK, linfomas enteropáticos y síndromes linfoproliferativos T pediátricos asociados a VEB

**Antonio Martínez**

*antonmar@clinic.cat*

*Unidad de Hematopatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic, Barcelona.*

## **DEFINICIÓN Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD.**

En este capítulo no se describe una sola entidad, sino un grupo de síndromes linfoproliferativos de presentación extranodal y que, aunque pueden afectar la piel no son primariamente cutáneos. Las entidades clínico-patológicas incluidas en este capítulo son muy poco frecuentes representando entre el 2-5% de los síndromes linfoproliferativos y el diagnóstico preciso es importante por las implicaciones pronósticas y terapéuticas que conlleva. Como en todos los linfomas T, la forma de presentación clínica forma parte esencial de la definición de la entidad y debe orientar todo el proceso diagnóstico. Así, la presencia de una marcada hepatoesplenomegalia es característica de la leucemia prolinfocítica T y del linfoma T hepatoesplénico mientras que la leucemia de linfocitos grandes granulares se manifiesta con baja carga tumoral sin organomegalia o con una esplenomegalia leve, citopenias y frecuentemente asociada a enfermedad autoinmune. La presencia de adenopatías junto con afectación cutánea, en este contexto, favorecería el diagnóstico de leucemia prolinfocítica T o de una leucemia linfoma T del adulto. La afectación de sangre periférica, con linfocitosis, es común a la leucemia prolinfocítica T, la leucemia de linfocitos grandes granulares, las formas aguda y crónica de las leucemia/linfoma T del adulto y a los procesos derivados de linfocitos NK mientras que es excepcional en el linfoma T hepatoesplénico y en el enteropático; en este último es característica la presencia de enteropatía, especialmente en enfermos celíacos. La hipercalcemia es típica de la leucemia/linfoma T del adulto. El origen geográfico del paciente puede ser también útil en la aproximación al diagnóstico. Así, los síndromes linfoproliferativos T de la infancia, se observan fundamentalmente en niños de Asia y América del Sur (especialmente en Méjico) mientras que la leucemia linfoma T del adulto es más frecuente en pacientes emigrantes de Japón, Caribe, América del Sur (Chile y Brasil principalmente), África central e Irán. No obstante, los movimientos migratorios

recientes influyen en la distribución de estas entidades, las cuales pueden también afectar a pacientes que no proceden de esas áreas geográficas.

Por la complejidad del diagnóstico y el tratamiento de este grupo de neoplasias, la recomendación es que ante la sospecha de que nos enfrentamos a un proceso de este grupo, el diagnóstico debe realizarse en un centro con experiencia y con posibilidad de realizar un estudio completo genético, inmunofenotípico y molecular, y que preferentemente disponga de experiencia en el tratamiento de estos pacientes.

### **TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO**

El tipo de muestra adecuada para el diagnóstico depende de la forma de presentación de la enfermedad. El estudio citomorfológico e inmunofenotípico por citometría de flujo de los linfocitos en sangre periférica y médula ósea, y la biopsia de médula ósea con inmunohistoquímica son mandatorios, en especial en las formas con linfocitosis y en los que no disponemos de una muestra tisular tal como el bazo para el estudio histológico. Mientras que en la leucemia prolinfocítica T, la infiltración medular suele ser difusa o mixta (nodular e intersticial), en la leucemia de linfocitos granulares y el linfoma hepatoesplénico es predominantemente intrasinusoidal. En estas dos últimas entidades y en especial en la leucemia de linfocitos granulares la infiltración puede ser mínima por lo que el estudio inmunohistoquímico es esencial para ponerla de manifiesto. Aunque la esplenectomía se realiza en algunos pacientes con fines diagnósticos y terapéuticos y la histología esplénica permite diferenciar claramente la leucemia prolinfocítica T de la leucemia de linfocitos granulares, no siempre se dispone de ella. La afectación cutánea se halla presente en el 40% de casos de leucemia/linfoma T del adulto y hasta el 25% de leucemias prolinfocíticas T. La biopsia cutánea puede ser de ayuda en el diagnóstico diferencial ya que permite distinguir la leucemia prolinfocítica T de linfomas cutáneos T, especialmente del síndrome de Sézary, puesto que en la primera no se aprecia nunca epidermotropismo. Sin embargo, el 50% de casos de leucemia/linfoma T del adulto muestra epidermotropismo y en estos casos, la biopsia cutánea por sí sola no permite distinguirla de linfomas primarios cutáneos T. El estudio serológico para el virus HTLV-1 es mandatorio para establecer el diagnóstico de leucemia/linfoma T del adulto y se recomienda éste en todos los pacientes emigrantes de zonas endémicas para este retrovirus a los que se diagnostica de linfoma T en la piel o de linfoma T periférico en el ganglio linfático. El título de inmunoglobulinas frente antígenos del virus de Epstein-Barr (EBV), o la carga viral en suero, además del estudio de hibridación in situ para el RNA del virus en el tejido son imprescindibles en el diagnóstico de los síndromes linfoproliferativos pediátricos asociados a EBV así como en el de los linfomas T/NK y las leucemias agresivas de células NK, que a diferencia de las proliferaciones crónicas de células NK son con frecuencia EBV positivas.

### **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS.**

El diagnóstico diferencial de estos procesos se plantea esencialmente con proliferaciones reactivas y con otros síndromes linfoproliferativos T.

#### **Linfadenitis reactivas**

Algunas formas de presentación pueden imitar un proceso reactivo. La leucemia prolinfocítica, cuando afecta el ganglio, puede remedar un patrón de hiperplasia parafolicular preservando los folículos linfoides. Por ello es esencial disponer de información clínica y del análisis morfológico e inmunofenotípico de los linfocitos de sangre periférica.

De igual manera, los síndromes linfoproliferativos T del niño asociados a EBV pueden preservar exquisitamente la arquitectura del ganglio o de la amígdala. En estos casos, sólo la hibridación in situ para EBERs del EBV destaca una masiva proliferación perifolicular de células T positivas para este virus.



### **Dermatitis reactivas**

La leucemia/linfoma T del adulto en su forma indolente o «*smoldering*» puede manifestarse con un «*rash*» cutáneo exfoliativo con infiltración linfoide muy poco atípica citológicamente que puede confundirse con un proceso inflamatorio o si muestra epidermotropismo con un linfoma T primario cutáneo especialmente con la afectación cutánea por el Síndrome de Sézary o una Micosis Fungoides.

### **Mucositis reactivas**

El diagnóstico del linfoma T/NK nasal se retrasa frecuentemente porque las biopsias muestran solo tejido necrótico desvitalizado o material fibrinoleucocitario, dado que las lesiones son altamente angioinvasivas y producen necrosis. Sólo biopsias profundas pueden demostrar la lesión diagnóstica característica sobre tejido viable.

### **Otros síndromes linfoproliferativos**

La leucemia/ linfoma T del adulto en su forma linfomatosa puede presentar una histología ganglionar que no puede distinguirse de los linfomas periféricos T NOS.

Asimismo, la biopsia de medula ósea en la leucemia de linfocitos granulares puede mostrar además de la infiltración leucémica intrasinusoidal o intersticial, nódulos linfoides reactivos compuestos en su mayoría por linfocitos pequeños B CD20+ que pueden dar lugar a un diagnóstico erróneo de linfoma B de bajo grado.

### **Síndromes linfoproliferativos de infiltración intrasinusoidal**

La infiltración intrasinusoidal en una biopsia hepática afecta por linfoma T hepatoesplénico puede ser sutil, con mínima atipia citológica sobre un hígado que muestra la arquitectura preservada. De igual forma, la infiltración intrasinusoidal en el bazo o en la médula ósea de una leucemia de linfocitos grandes granulares o una leucemia crónica de células NK pueden pasar desapercibidas a un patólogo no experto si no se realiza un estudio inmunohistoquímico completo. El estudio de clonalidad del receptor de células T (RCT) mediante técnicas de PCR es mandatorio para descartar proliferaciones de linfocitos granulares reactivas y confirmar el diagnóstico de leucemia ya que las características citológicas e inmunofenotípicas son muy similares en los procesos clonales y los reactivos. Recientemente se han descrito procesos NK indolentes del tracto gastrointestinal que no deben ser confundidos con linfomas NK. Por todo ello, es imprescindible una correcta sospecha clínica en el momento de interpretar la biopsia. Todo caso discordante debería ser revisado por un experto.

### **PANELES DE IHQ**

El abordaje de las neoplasias linfoides T requiere de un número amplio de marcadores, algunos de los cuales solo están disponibles para técnicas de citometría de flujo. En general, el poder definir la línea linfoide vs NK; linfoide T CD8+, CD4+ o doble negativo o doble positivo ayuda a orientar el proceso. La expresión de cadenas del TCR en superficie o citoplasma excluye línea NK, aunque algunos linfomas de tipo NK nasal pueden tener un genotipo y fenotipo T. En los últimos años disponemos de anticuerpos que funcionan en tejido parafinado para identificar células T alfa/beta y gamma/delta. Otros marcadores imprescindibles son CD25, CD56, CD57 y anticuerpos que detectan las granulaciones citotóxicas (TIA-1, Granzima B, Perforina). Además, es imprescindible el uso de hibridación para EBER que, en la mayoría de los casos, no es reemplazable por otros antígenos de latencia del EBV como la proteína LMP1.

En la tabla 1 se describen los anticuerpos disponibles para tejido en parafina y en la tabla 2 se resumen las características inmunofenotípicas de los diversos procesos linfoproliferativos T incluidos en este capítulo.

**Tabla 1.** Lista de marcadores que pueden aplicarse en tejido en parafina para el diagnóstico de linfomas T, NK y T/NK.

Grupo	Marcadores
<b>Célula T</b>	CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD52, TCRBeta, TCRGamma, TCRdelta
<b>Citotóxico</b>	TIA1, granzima B, perforina
<b>Treg</b>	FoxP3, CD25, CD152
<b>NK</b>	CD16, CD56, CD57
<b>IEL*</b>	CD103
<b>Th1</b>	T-Bet
<b>Th2</b>	GATA3
<b>Activación</b>	CD25, CD30
<b>Proliferación</b>	Ki67
<b>EBV</b>	EBER ISH (hibridación in situ), LMP1, EBNA2

\*IEL: linfocitos intraepiteliales (*Intraepithelial lymphocyte*).

**Tabla 2.** Resumen de las características inmunofenotípicas

Entidad	CD3	CD5	CD7	CD4	CD8	CD25	CD16	CD56	CD57	CD52	Gránulos	TCR	EBER
PLL*	+	+	+	60%	15%	25%	-	-	-	+	-	αβ	-
LGL**	+	+/-	+/-	-	85%	-	+	-/+	+	+	activados	αβ	-
cNK***	+citop	-	-	-	+/-	-	+	+	-	?	activados	-	-
aNK	+citop	-	-	-	-	-	+débil	+	+	?	activados	-	+
NK/T***	+citop	-	?	-	-	30%	-/+	+	-/+	25%	activados	-	+
EBV-TLPD pediátrico	+	+	-/+	-	+	-/+	+/-	-	-	?	Tia-1	αβ	+
HSTL	+	-	-	-	-/+	-	+	+/-	-	-/+	incompleto	γδ>αβ	-/+
ATLL	+	+	-	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	αβ	-
EATL tipo I	+	+	-	-	+	25%	+/-	+	+/-	?	activados	αβ	-

\*Coexpresión de CD4 y CD8 en el 25% de los casos y ausencia de expresión de CD3 y RCT en la membrana en el 20% de los casos. Una expresión elevada de Tcl-1 es frecuente pero no exclusiva de esta enfermedad

\*\*Expresan gránulos citotóxicos TIA-1, granzima B y perforina independientemente de que la proliferación sea de linfocitos CD8+ o la menos frecuente CD4+

\*\*\*Expresan gránulos citotóxicos TIA-1, perforina y Granzima B

### ESTUDIO CITOGÉNICO/MOLECULAR

El estudio de clonalidad es de gran utilidad en las neoplasias linfoides T dada la ausencia de algún marcador subrogado por inmunohistoquímica, similar a las cadenas ligeras en los linfomas B, que pueda usarse en la rutina diagnóstica. Un inmunofenotipo aberrante con pérdida de expresión de antígenos T es sugestivo pero no definitivo de un proceso clonal. En las proliferaciones de linfocitos granulares deberá determinarse siempre la clonalidad mediante el análisis del reordenamiento de las cadenas Beta o Gamma del RCT mediante PCR. Mediante citometría de flujo, la expresión de un mismo receptor de tipo inhibidor de células NK (KIR) se puede usar como sinónimo de clonalidad en la leucemia de linfocitos granulares T y NK aunque solo permite obtener información en una proporción de casos. Recientemente mutaciones de STAT3 se han implicado en la patogénesis de la leucemia de linfocitos granulares T y NK hallándose presente en alrededor del 20-23% de pacientes. Hay alteraciones genéticas características y recurrentes en algunos de estos procesos en especial en la leucemia prolinfocítica T que muestra alteraciones recurrentes tales como inv(14)(q11;q32) que involucra el reordenamiento del oncogén TCL1 (80% casos) e iso(8q) (60% de casos). Si bien la

citogenética o FISH no son imprescindibles en casos francamente leucémicos y con morfología típica de prolinfocítica T, sí que son de ayuda y corroboran el diagnóstico en las variantes morfológicas y/o en formas de bajo voltaje de leucemia prolinfocítica. La presencia de isocromosoma 7 que puede estudiarse mediante técnica de FISH en parafina puede sustentar el diagnóstico de linfoma T hepatoesplénico. Estos estudios sólo están disponibles en unidades de diagnóstico hematopatológico especializado.

## RECOMENDACIONES

1. El grupo de neoplasias que se discuten en este capítulo son entidades clínico-patológicas muy poco frecuentes que requieren para su diagnóstico definitivo la integración de datos clínicos y de laboratorio y de unidades de hematopatología expertas en estos procesos y con gran variedad de técnicas disponibles. Grado C. Evidencia nivel IV
2. El informe final del patólogo debe incluir una descripción detallada de la citología, patrón de infiltración tisular, inmunofenotipo y a ser posible anomalías genéticas/moleculares, especialmente en casos problemáticos con dificultades para establecer un diagnóstico final. Grado C. Evidencia nivel IV
3. Es recomendable referir las muestras a centros de referencia nacionales con experiencia en este tipo de enfermedades en fases iniciales del proceso para un diagnóstico y manejo adecuado del paciente. Grado C. Evidencia nivel IV

\*Los autores desean agradecer a los Dres Blanca González y Estella Matutes su colaboración en la redacción de este capítulo.

## Bibliografía

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
2. Garcia-Herrera A, Song JY, Chuang SS, Villamor N, Colomo L, Pittaluga S, Alvaro T, Rozman M, de Anda Gonzalez J, Arrunategui AM, Fernandez E, Gonzalvo E, Estrach T, Colomer D, Raffeld M, Gaulard P, Campo E, Jaffe ES, Martinez A. Nonhepatosplenic  $\gamma\delta$  T-cell lymphomas represent a spectrum of aggressive cytotoxic T-cell lymphomas with a mainly extranodal presentation. *Am J Surg Pathol.* 2011 Aug;35(8):1214-25. doi:10.1097/PAS.0b013e31822067d1. PubMed PMID: 21753698; PubMed Central PMCID: PMC3136885.
3. Osuji N, Beiske K, Randen U, Matutes E, Tjonnfjord G, Catovsky D, Wotherspoon A. Characteristic appearances of the bone marrow in T-cell large granular lymphocyte leukaemia. *Histopathology.* 2007 Apr;50(5):547-54. PubMed PMID:17394489.
4. Osuji N, Matutes E, Catovsky D, Lampert I, Wotherspoon A. Histopathology of the spleen in T-cell large granular lymphocyte leukemia and T-cell prolymphocytic leukemia: a comparative review. *Am J Surg Pathol.* 2005 Jul;29(7):935-41. Review. PubMed PMID: 15958859.
5. Jerez A1, Clemente MJ, Makishima H, Koskela H, Leblanc F, Peng Ng K, Olson T, Przychodzen B, Afable M, Gomez-Segui I, Guinta K, Durkin L, Hsi ED, McGraw K, Zhang D, Wlodarski MW, Porkka K, Sekeres MA, List A, Mustjoki S, Loughran TP, Maciejewski JP. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood.* 2012 Oct 11;120(15):3048-57. doi: 10.1182/blood-2012-06-435297. Epub 2012 Aug 2

6. Dungarwalla M, Matutes E, Dearden CE. Polymphocytic leukaemia of B- and T-cell subtype: a state-of-the-art paper. *Eur J Haematol.* 2008 Jun;80(6):469-76. doi: 10.1111/j.1600-0609.2008.01069.x. Epub 2008 Mar 10. Review. PubMed PMID:18331594.
7. Asano N, Kato S, Nakamura S. Epstein-Barr virus-associated natural killer/T-cell lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2013 Mar;26(1):15-21. doi:10.1016/j.beha.2013.04.002. Epub 2013 May 25. Review. PubMed PMID: 23768637.
8. Suzuki R, Takeuchi K, Ohshima K, Nakamura S. Extranodal NK/T-cell lymphoma: diagnosis and treatment cues. *Hematol Oncol.* 2008 Jun;26(2):66-72. doi:10.1002/hon.847. Review. PubMed PMID: 18283711.
9. Semenzato G, Marino F, Zambello R. State of the art in natural killer cell malignancies. *Int J Lab Hematol.* 2012 Apr;34(2):117-28. doi:10.1111/j.1751-553X.2011.01374.x. Epub 2011 Sep 6. Review. PubMed PMID: 21895989.
10. Ohshima K. Pathological features of diseases associated with human T-cell leukemia virus type I. *Cancer Sci.* 2007 Jun;98(6):772-8. Epub 2007 Mar 27. Review. PubMed PMID: 17388788.
11. Matutes E. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. *J Clin Pathol.* 2007 Dec;60(12):1373-7. Review.
12. Vega F, Medeiros LJ, Gaulard P. Hepatosplenic and other gammadelta T-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 2007 Jun;127(6):869-80. PubMed PMID: 17509984.
13. Wlodarska I, Martin-Garcia N, Achten R, De Wolf-Peeters C, Pauwels P, Tulliez M, de Mascarel A, Brière J, Patey M, Hagemeyer A, Gaulard P. Fluorescence in situ hybridization study of chromosome 7 aberrations in hepatosplenic T-cell lymphoma: isochromosome 7q as a common abnormality accumulating in forms with features of cytologic progression. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002 Mar;33(3):243-51. PubMed PMID: 11807981.
14. Swerdlow SH, Jaffe ES, Brousset P, Chan JK, de Leval L, Gaulard P, Harris NL, Pileri S, Weiss LM; International Lymphoma Study Group. Cytotoxic T-cell and NK-cell lymphomas: current questions and controversies. *Am J Surg Pathol.* 2014 Oct;38(10):e60-71. doi: 10.1097/PAS.0000000000000295. Review. PubMed PMID:25025449.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Linfomas primarios cutáneos

**Socorro María Rodríguez Pinilla**

*smrodriguez@fd.es*

*Servicio de Anatomía Patológica, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.*

Linfoma primario cutáneo es el que infiltra de forma primaria la piel. Tanto los linfomas B como los linfomas T sistémicos pueden infiltrar secundariamente la piel y adoptar cualquier patrón morfológico de infiltración por lo que siempre deben ser excluidos mediante un adecuado estudio clínico.

## LINFOMAS T PRIMARIOS CUTÁNEOS

Representan el 70% de los linfomas primarios cutáneos, siendo la micosis fungoides (MF) y sus variantes el tipo más frecuente (~40%) (tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de los linfomas T y NK primario cutáneos según la WHO-EORTC. \*La frecuencia dada se refiere a la totalidad de los linfomas primarios cutáneos B y T.

Linfomas T/NK primario cutáneos	Frecuencia (%)*
<b>Curso clínico indolente:</b>	
Micosis fungoides	44
Subtipos y variantes de Micosis fungoides	6
Linfoma primario cutáneo de linfocitos T CD4-positivos de pequeño-mediano tamaño	1
Linfoma NK/T tipo hydroa vacciniforme	2
Desordenes linfoproliferativos CD30+ primario cutáneos	<1
-Linfoma anaplásico de células grandes CD30+ primario cutáneo	8
-Papulosis Linfomatoide.	12
<b>Curso clínico agresivo:</b>	
Síndrome de Sézary	3
Linfoma primario cutáneo de células NK/T de tipo nasal	<1
Linfoma T citotóxico CD8-epidermotropo agresivo primario cutáneo	<1
Linfoma T primario cutáneo gamma/delta	<1
Linfoma T periférico no especificado primario cutáneo	2

## LINFOMAS T PRIMARIOS CUTÁNEOS: MICOSIS FUNGOIDES (MF)

El diagnóstico de MF debe restringirse a aquellos pacientes que cursen con historia de lesiones en forma de mancha, placa y finalmente en algunos casos nódulos/tumores. Es más frecuente en adultos, generalmente varones, aunque se ha descrito en niños. El curso clínico es variable, aunque por lo general, prolongado produciéndose ocasionalmente en estadios avanzados afectación ganglionar y visceral (hígado, bazo, pulmón y sangre periférica, principalmente).

Histológicamente se caracteriza por un infiltrado epidermotropo de linfocitos pequeños con escasa atipia citológica que forman cúmulos intraepidérmicos (abscesos de Pautrier). Los linfocitos tumorales suelen expresar CD4 y en la mayoría de los casos hay pérdida de CD7. Se han descrito casos con expresión de CD8, que suelen presentarse en forma de manchas o placas hipo o hiperpigmentadas así como casos con expresión de CD56, TCRgamma y otros con ausencia de expresión de CD4 y CD8. Estos subtipos inmunofenotípicos no suelen presentar diferente comportamiento biológico.

En estadios iniciales el infiltrado linfoide se dispone principalmente en banda en dermis superficial y tanto la atipia citológica como el epidermotropismo pueden ser muy sutiles haciendo muy complicado el diagnóstico. No suele observarse pérdida de expresión de marcadores T ni reordenamientos clonales del gen TCR. A medida que las lesiones se vuelven más tumorales, se pierde el epidermotropismo, el infiltrado dérmico es más denso y difuso y disminuye el componente de células reactivas mientras que las tumorales aumentan en número. Puede observarse transformación histológica, definida como la presencia de más de un 25% de células grandes de aspecto blástico. Estas células pueden ser CD30-positivas o CD30-negativas. Esto es más común en fases tumorales de MF. Puede adquirirse la expresión de marcadores citotóxicos. En casos de positividad para CD30 se requiere hacer el diagnóstico diferencial con otras entidades del espectro de los desórdenes linfoproliferativos cutáneos CD30 positivos.

Variantes de MF:

- **MF folículotropo:** No siempre se observa mucinosis folicular. Se asocia a curso clínico más agresivo.
- **MF granulomatosa:** Se asocia con granulomas de tipo sarcoideo o con patrones de infiltración tipo granuloma anular. Las células multinucleadas gigantes destruyen y fagocitan las fibras elásticas. No siempre se observa epidermotropismo (50%). Curso clínico más agresivo que la variante clásica.
- **Síndrome de piel laxa granulomatosa:** Histológicamente es indistinguible de la MF granulomatosa y se caracteriza por la aparición de una piel laxa y colgante en los grandes pliegues cutáneos y por un curso clínico muy benigno.
- **Reticulosis pagetoide:** El término se restringe a lesiones únicas en placa de crecimiento lento y progresivo. Se observa un llamativo epidermotropismo por linfocitos con halo claro. Se han descrito casos con expresión de CD4, CD8 e incluso CD30. El pronóstico es muy bueno.

## LINFOMAS T PRIMARIOS CUTÁNEOS: SÍNDROME DE SÉZARY (SS)

Es una forma rara de linfoma T primario cutáneo (representa el 3% de todos los linfomas primario cutáneos). Se caracteriza clínicamente por la presencia de eritrodermia, alopecia, hiperqueratosis palmo-plantar y linfadenopatías. Tan sólo en un 40% de los casos se observan imágenes de linfocitos atípicos con epidermotropismo por lo que la biopsia cutánea no siempre es del todo útil para el diagnóstico. La mayoría de los autores coinciden en que es necesaria la presencia de >1000 células atípicas con núcleos cerebriformes (células de Sézary o células de Lutzner) en sangre periférica para hacer el diagnóstico de SS; si bien, aún no existen criterios diagnósticos consensuados. El pronóstico es muy malo, con una supervivencia media de 2-4 años.



## **LINFOMAS T PRIMARIOS CUTÁNEOS: PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS PRIMARIO CUTÁNEOS CD30-POSITIVOS**

Incluye un espectro clinicopatológico en el que la clasificación de la WHO-EORTC reconoce tres subgrupos:

### **Linfoma anaplásico de células grandes primario cutáneo (LACGPC)**

Aparece principalmente en pacientes varones adultos, aunque está descrita en niños. Normalmente se trata de una lesión única o de lesiones múltiples localizadas en forma de pápulas o nódulos que frecuentemente se ulceran. A veces regresan espontáneamente tras un periodo medio de 2 meses (23-44% de los casos). Ocasionalmente pueden presentar recidivas cutáneas (~39% de los casos). La presencia de lesiones multifocales se ha descrito en el 20% de los pacientes. La afectación ganglionar locorregional se observa en un 10% de los casos y no parece tener implicaciones pronósticas. El pronóstico es muy bueno, con una supervivencia global a los 5 años del 76-96%.

Morfológicamente se caracterizan por una proliferación difusa de células grandes anaplásicas que afecta la dermis y en muchas ocasiones el tejido celular subcutáneo con expresión de CD30 en más de un 75% de las mismas. Es rara la presencia de epidermotropismo. El infiltrado linfo-leucocitario reactivo acompañante es muy escaso.

La mayoría de los casos expresa CD4 y marcadores citotóxicos (TIA-1, granzima, perforina) y suelen perder CD2, CD5, CD7 y/o CD3. Un 5% de los casos expresa CD8. De forma ocasional se han descrito casos doble CD4/CD8 negativos.

### **Papulosis linfomatoide (PL)**

La PL se define como un proceso crónico, recurrente y autolimitado de afectación cutánea y en ocasiones de mucosas constituido por una proliferación de células grandes, anaplásicas, de aspecto inmunoblástico o de tipo Hodgkin con abundante infiltrado inflamatorio. Aparece principalmente en adultos de sexo masculino aunque también ha sido descrita en niños. Clínicamente se caracteriza por la aparición en brotes de múltiples pápulas, o nódulos, en tronco y extremidades en diferentes estadios evolutivos (pápula, necrosis, escara) que regresan espontáneamente tras 3-12 semanas dejando cicatrices hiperpigmentadas. Se han descrito varios patrones de infiltración cutáneas que definen los distintos tipos (A-E).

### **Lesiones mal definidas entre estas dos entidades («lesiones *borderline*»).**

## **LINFOMAS T PRIMARIOS CUTÁNEOS: LINFOMA T SUBCUTÁNEO DE TIPO PANICULÍTICO (LTSP)**

Puede aparecer en adultos o niños, frecuentemente mujeres. Se caracteriza por la aparición de nódulos o placas únicas o múltiples generalmente en tronco y extremidades. Se ulceran con frecuencia. Es rara la afectación extracutánea. Es frecuente la aparición de síntomas sistémicos aunque el síndrome hemofagocítico (SHF) solo ocurre en un 15% de los casos. Un 20% de los pacientes presentan algún tipo de enfermedad autoinmune, especialmente lupus eritematoso sistémico. El curso clínico es, por lo general, poco agresivo, especialmente si no presentan SHF.

Histopatológicamente es una proliferación exclusivamente subcutánea por células neoplásicas de diferente tamaño y atipia citológica que se disponen alrededor de adipocitos de forma individual. Es frecuente la necrosis, la cariorexis y la presencia de histiocitos.

El estudio IHQ muestra una proliferación de linfocitos T-citotóxicos frecuentemente CD8 que expresan fenotipo TCR $\alpha\beta$  (TCRBF1 mediante IHQ) y que, con frecuencia muestran un alto índice proliferativo (Ki67) en torno a vacuolas adiposas. Es poco frecuente la positividad con CD30 o CD56.

#### **LINFOMAS T PRIMARIOS CUTÁNEOS: LINFOMA T GAMMA-DELTA PRIMARIO CUTÁNEO (LTGDPC)**

Suelen debutar en forma de placas, nódulos o tumores úlcero-necróticos diseminados o en miembros inferiores en pacientes adultos añosos sin predilección de sexo. La afectación mucosa es frecuente. Es frecuente una rápida diseminación sistémica, aunque la afectación ganglionar y de la médula ósea es rara. Suelen presentar síntomas sistémicos y SHF, especialmente los pacientes con tumores con predominio de afectación paniculítica. Es un linfoma altamente resistente a la poliquimioterapia con muy mal pronóstico, especialmente los casos con afectación del tejido celular subcutáneo. La supervivencia media es inferior a 15 meses.

El patrón de afectación puede ser dérmico, intraepidérmico o subcutáneo. Dichos patrones pueden aparecer individualmente o en combinación. Las células tumorales también pueden presentar distintos grados de atipia morfológica.

Las células tumorales expresan CD3, TCR $\gamma\delta$  (TCR gamma y/o TCR delta mediante IHQ) y marcadores citotóxicos. La presencia de CD56 es frecuente. Suelen ser CD4/CD8 doble negativos o CD8-positivos.

#### **LINFOMAS T PRIMARIOS CUTÁNEOS: LINFOMA T CITOTÓXICO CD8-EPIDERMOTRÓPICO AGRESIVO PRIMARIO CUTÁNEO (LTC-CD8EA-PC). ENTIDAD PROVISIONAL SEGÚN LA OMS**

Suele aparecer en forma de placas, pápulas, nódulos o tumores generalizados con frecuente ulceración. Suele afectar adultos sin predilección de sexo. El curso clínico es agresivo y suele metastatizar en mucosa oral, testículo, bazo, pulmón o SNC con poca afectación ganglionar. La supervivencia media es inferior a 3 años.

Las lesiones tempranas suelen presentar un patrón de infiltración intraepidérmico de tipo pagetoide. En las lesiones establecidas hay epidermotropismo marcado con necrosis de queratinocitos, espongirosis y ulceración. Suele observarse un patrón liquenoide y en banda en dermis superficial con frecuente destrucción de anejos pero sin angioinvasión, angiodestrucción o afectación de fascículos nerviosos. Se observa frecuente afectación de panículo adiposo.

Las células tumorales suelen expresar CD3, CD8, CD5, CD7, TCRBF1, TIA1. Suelen ser negativos con CD2, CD30, perforina y granzima. No se observa expresión de TCRGamma ni EBV-EBER.

#### **LINFOMAS T PRIMARIOS CUTÁNEOS: LINFOMA T/NK EXTRAGANGLIONAR DE TIPO NASAL**

Suele presentarse como múltiples placas o tumores, generalmente ulceradas en tronco y extremidades. Los pacientes son adultos, generalmente añosos y es más frecuente en individuos varones que provienen de Asia, Centro América o América del Sur. Se ha descrito de forma excepcional en niños. Suele presentar síntomas sistémicos y frecuentemente SHF.

Las células tumorales son de tamaño y morfología variable. Se disponen generalmente de forma difusa en dermis y tejido celular subcutáneo, aunque también pueden presentar epidermotropismo. Es muy característica la presencia de angiodestrucción con extensas áreas de necrosis. En ocasiones se

observa abundantes células acompañantes de carácter reactivo constituidas por leucocitos, histiocitos y plasmáticas.

Las células neoplásicas son característicamente citotóxicas y expresan EBV-EBER. Suelen presentar expresión de CD3 citoplasmático y CD56 y no suelen expresar CD4 ni CD8. La expresión de TCRBF1 y TCR gamma es variable y de significado clínico impreciso en este grupo.

### **LINFOMAS T PRIMARIOS CUTÁNEOS: LINFOMA T/NK DE TIPO HYDROA-VACCINIFORME**

Forma parte del espectro de lesiones relacionadas con infección crónica por EBV y se relaciona con hipersensibilidad a picaduras de insectos. Se presenta en niños de origen asiático, México, centro América y América del sur. Se caracteriza por la presencia de lesiones en forma de vesículas que evolucionan a pápulas, se ulceran y dejan cicatriz residual. Tienen un curso clínico autoresolutivo y recurrente durante mucho tiempo hasta que finalmente desarrollan afectación sistémica por linfoma. La afectación cutánea ocurre en áreas foto y no fotoexpuestas. Las lesiones mucosas son frecuentes. Se asocian síntomas generales, fiebre, aumento de títulos de IgG frente a EBV y edema facial.

El fenotipo T es más frecuente (75% de los casos), presenta más síntomas sistémicos y se asocia a mayor agresividad de las lesiones cutáneas. El fenotipo NK (25% de los casos) aparece en pacientes más jóvenes, presenta un curso clínico más indolente pero mayor tendencia al desarrollo de linfomas NK de tipo nasal y leucemias NK.

El patrón histopatológico es variable con infiltración intraepidérmica (cúmulos de linfocitos pequeños con escasa atipia intraepidérmicos formando vesículas espongióticas), dérmica y perivascular (escasas células en dermis con ligero angiotropismo y destrucción de anejos) o bien extensa con áreas de ulceración epidérmica, infiltración de tejido celular subcutáneo, partes blandas y tejido muscular. En estadios avanzados se observa infiltración ganglionar por linfoma. El tamaño y la atipia citológica es variable y aumenta a medida que evoluciona la enfermedad.

Las células tumorales son EBV-EBER positivas con expresión de CD3 citoplasmático y marcadores citotóxicos. Pueden expresar CD56 y CD30. La expresión de CD4 y CD8 es variable siendo frecuentemente doble negativas. Se ha observado la expresión frecuente de TCRBF1 y en menor medida de TCR-Gamma o la ausencia de expresión de ambos marcadores. Se observan abundantes células de hábito linfocitario negativas para EBV-EBER.

### **LINFOMAS T PRIMARIOS CUTÁNEOS: PROCESO LINFOPROLIFERATIVO PRIMARIO CUTÁNEO T CD4-POSITIVO DE CÉLULAS PEQUEÑAS-MEDIANAS. Entidad provisional según la OMS**

Es un proceso linfoproliferativo que se presenta como nódulos únicos en región de cabeza, cuello y parte superior del tronco. Se han descrito casos con lesiones múltiples. Ocurren en adultos, y tienen un curso clínico benigno.

Histopatológicamente se observa una proliferación difusa dérmica de células de pequeño-mediano tamaño con no más de un 20% de células grandes. Hay escaso folículotropismo, con presencia de «*Grenz zone*», escasos centros germinales reactivos de pequeño tamaño generalmente en áreas profundas y puede observarse abundante componente B reactivo acompañante, así como plasmáticas, eosinófilos, histiocitos y células gigantes multinucleadas.

Las células neoplásicas expresan CD3, CD4 y característicamente marcadores T de fenotipo centrofolicular como PD1, CXCL13, BCL6 y en ocasiones CD10. No suelen observarse restricción de cadenas ligeras en el componente linfoplasmocitario.

## LINFOMAS B PRIMARIOS CUTÁNEOS

Representan el 30% de los linfomas primarios cutáneos.

### LINFOMAS B PRIMARIOS CUTÁNEOS: LINFOMA B DE LA ZONA MARGINAL PRIMARIO CUTÁNEO (LMPC)

Este tipo de linfomas suponen el 7% de los linfomas primarios cutáneos. Son de muy buen pronóstico con una supervivencia global específica de enfermedad del 99-100% a los 5 años. Suelen presentar recidivas ocasionales pero no suelen tener afectación extracutánea. Entre los pacientes con linfoma B de la zona marginal de presentación primaria cutánea tan sólo un 2% presentan infiltración franca de la médula ósea, momento en el que dejan de considerarse cutáneos. Las lesiones pueden ser únicas o múltiples, en forma de pápulas, nódulos o placas principalmente en el tronco y extremidades. De forma inhabitual pueden tener un curso clínico intercurrente (aparición y desaparición de las lesiones espontáneamente). La desaparición espontánea puede asociarse con la aparición de anetodermia.

Histopatológicamente presentan un patrón de afectación dérmica difuso o pseudonodular constituido por folículos linfoides de centros germinales reactivos y expansión de linfocitos del área marginal que disecan los haces de colágeno. Se acompañan de un número variable de células dendríticas multinucleadas y blastos. Hay abundantes células de hábito linfoplasmocitode o plasmáticas maduras en la periferia de la lesión y bajo la epidermis.

Las células neoplásicas del área marginal expresan CD20, CD79a y BCL2 y son CD10 y BCL6 negativas. Las células plasmáticas expresan CD138 y CD79a pero son CD20 negativas y presentan restricción de cadenas ligeras en el estudio inmunohistoquímico en el 75% de los casos. Los linfocitos B del centro germinal de carácter reactivo expresan CD10 y BCL6 pero son BCL2 negativos. Se ha descrito positividad nuclear con BCL10 (46% de los casos) y se asocia con tumores agresivos localmente.

Se describen dos subtipos:

- Con cambio de clase de las inmunoglobulinas (Igs) y expresión de IgG, principalmente IgG4; presenta abundantes linfocitos T reactivos acompañantes de fenotipo TFH2 y escasa células B neoplásicas.
- Sin cambio de clase de las Igs; expresan IgM, y suelen acompañarse de proliferaciones difusas de células B, expresión de CXCR3, y asociarse con infección por *Borrelia burgdorferi*.

### LINFOMAS B PRIMARIOS CUTÁNEOS: LINFOMA B CENTROFOLICULAR PRIMARIO CUTÁNEO (LCFPC)

Representan el 9-11% de los linfomas primarios cutáneos. Frecuentemente se presentan como placas o tumores múltiples o solitarios en la región del tronco, de la cabeza o el cuello. A veces se presentan como placas eritematosas con nódulos sobre ellas («Linfoma de Crosti») y algunos pacientes presentan múltiples lesiones papulosas de pequeño tamaño alejadas 10-15 cm de la lesión principal.

El pronóstico es muy bueno, con una supervivencia global superior al 95% a los 5 años. Los casos de presentación multifocal o de localización en piernas parecen tener peor pronóstico. Se ha descrito la progresión a linfoma B difuso de células grandes.

Histopatológicamente se definen como una proliferación de centrocitos y centroblastos que puede adoptar un patrón nodular, mixto (nodular y difuso) o difuso. Las células tumorales se

acompañan de numerosas células T de carácter reactivo. Algunos LCFPCs presentan morfología fusocelular. A diferencia de los linfomas foliculares ganglionares los LCFPC no se gradan.

Las células tumorales expresan CD20 y CD79a. Son característicamente BCL6 positivos. Se observa positividad variable con CD10 en los de patrón de crecimiento nodular. No se observa expresión de MUM1.

La expresión de BCL2 está más restringida que la contrapartida ganglionar. Su presencia en más del 50% de las células tumorales en LCFPC constituidos por células grandes y patrón de crecimiento difuso se asocia a peor pronóstico. En casos con una expresión intensa y difusa de BCL2, se debe descartar que se trate de una forma secundariamente cutánea de linfoma B folicular. La presencia de translocación entre los genes IgH@/BCL2 se detecta hasta en un 10-41% de los LCFPCs. Sin embargo, se recomienda igualmente descartar clínicamente en estos casos afectación cutánea por un linfoma B folicular sistémico.

### **LINFOMAS B PRIMARIOS CUTÁNEOS: LINFOMA B DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES PRIMARIO CUTÁNEO DE TIPO PIERNAS (LBDCG-PCTP)**

Representan el 4% de los linfomas primarios cutáneos. Son linfomas agresivos con una supervivencia a los 5 años del 55%. Se presentan característicamente en las piernas, aunque no son exclusivos de esta localización (15-20% otra localización). Son más frecuentes en personas añosas y frecuentemente mujeres. Suelen cursar en forma de nódulos únicos o múltiples, uni o bilaterales. Presentan rápido crecimiento y gran tendencia a la diseminación extracutánea (50%), principalmente a ganglios locorreregionales.

Histopatológicamente se caracterizan por un infiltrado difuso dérmico de células de mediano-gran tamaño y aspecto inmunoblástico o centroblastico que frecuentemente alcanzan el tejido celular subcutáneo y respetan la epidermis. No se observan células B de pequeño tamaño y el componente reactivo de fenotipo T es muy escaso y frecuentemente limitado al área perivascular.

Las células tumorales expresan CD20, CD79a y BCL2. Pueden expresar CD10 y BCL6. De forma característica presentan expresión de IgM, MUM1 y FOXP1 en la mayoría de los casos. La mutación L265P de MYD88 se encuentra en un porcentaje variable de casos de LBDCG-PCTP según las series (33-61%).

### **LINFOMAS B PRIMARIOS CUTÁNEOS: OTROS TIPOS/SUBTIPOS DE LINFOMAS B DIFUSOS DE CÉLULAS GRANDES (LBDCG) (muy infrecuentes)**

Se han descrito principalmente y representan la afectación cutánea por un linfoma sistémico en la mayoría de los casos, Linfomas B con características intermedias entre linfomas de Burkitt y linfoma B difuso de células grandes, Linfoma primario de cavidades extracavitario, Linfomas plasmablasticos, Linfoma B rico en células T, Linfomas asociados a inmunosupresión (asociados a la edad avanzada, uso de metotrexato y procesos linfoproliferativos de tipo úlcera-mucocutánea), Granulomatosis linfomatoide, Linfoma B linfoblástico.

El linfoma B intravascular aunque normalmente es multisistémico (suele afectar sistema nervioso central y pulmón) puede tener un patrón de afectación exclusivamente cutánea. Se caracteriza por la presencia de células neoplásicas grandes en el interior de la luz de estructuras vasculares de pequeño-mediano calibre en dermis o tejido celular subcutáneo. Clínicamente se caracteriza por la aparición de manchas o placas violáceas o lesiones de tipo telangiectásico en piel de extremidades inferiores o tronco. Se ha descrito la colonización exclusiva de tumores vasculares benignos (hemangiomas) y la extravasación de escasas células tumorales a dermis perivascular. Aunque requiere tratamiento quimioterápico es de mejor pronóstico que el de presentación sistémica. Demostrar el

inmunofenotipo B es esencial para descartar otros procesos neoplásicos con similar presentación clínico-patológica como el LACGPC o Linfoma T/NK de tipo nasal.

### TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

Biopsia incisional o escisional cutánea que incluya epidermis, dermis y tejido adiposo.

Biopsia-cilindro de médula ósea: Su indicación es controvertida en linfomas T de curso clínico indolente y en Linfoma B de la zona marginal primario cutáneo. En los linfomas B y T agresivos está indicada como método de estadiaje.

### DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

Los casos de linfomas cutáneos plantean diagnóstico diferencial histopatológico con una amplia variedad de procesos no neoplásicos. Entre ellos se destacan:

- MF en estadio inicial vs procesos inflamatorios (eccema, psoriasis, etc.) vs reacción a fármacos.
- MF CD8-positiva vs vitíligo.
- MF granulomatosa vs procesos inflamatorios de carácter granulomatoso (tuberculosis, hongos, sarcoidosis, granuloma anular, etc.)
- LACGPC con abundante componente inflamatorio vs PL vs procesos virales, pioderma, reacción a fármacos, etc.
- La variante hiperplásica pseudoepiteliomatosa de LACGPC debe diferenciarse de carcinomas epidermoides.
- LTSP vs paniculitis lúpica. Este diagnóstico diferencial es especialmente difícil en niños.
- LMPC y LCFPC vs Hiperplasia folicular cutánea.

Este diagnóstico diferencial debe tener en cuenta principalmente características clínicas de la enfermedad y debe realizarse una adecuada correlación clínico-patológica. En caso de sospecha de proceso linfoproliferativo es preciso realizar un estudio IHQ apropiado y estudios moleculares en casos seleccionados.

### PANELES DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) E HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA (HIS-C)

Dado el amplio espectro de LPC se aconseja inicialmente definir si se trata de un proceso B o T y posteriormente según el patrón morfológico y las características clínicas del paciente ampliar la batería de marcadores inmunohistoquímicos.

**Panel de primera línea:** CD45 (ALC), CD20, CD3, CD4, CD8, CD30, ki67.

**Paneles de segunda línea:**

Línea T: CD5, CD7, TCRBF1, TCR-Gamma, TCR-delta, CD56, ALK, EBV-EBER, PD1.

Línea B: BCL2, BCL6, CD10, KAPPA, LAMBDA, MUM1.

**Paneles de tercera línea:** TdT, TCL1, CD123, CD68, FOXP3, CD25.

Si el caso no es claramente tipificable con los estudios previos considerar infiltrados de tipo leucémico (leucemia cutis, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas), linfoma linfoblástico, leucemia T-prolinfocítica y leucemia-linfoma T del adulto.

### CITOGENÉTICA Y MOLECULAR

Se recomienda la determinación molecular de clonalidad linfoide de Ig y TCR mediante PCR como método complementario al diagnóstico y evaluación de recidivas (véase apartado de diagnóstico molecular). Se debe tener en cuenta que en estadios iniciales de la MF debido a la escasez de infiltrado tumoral pueden no encontrarse reordenamientos clonales de los genes de TCR. A su vez, se pueden encontrar reordenamientos clonales T en algunos procesos de carácter reactivo. Ocasionalmente, en algunos procesos neoplásicos de estirpe T/NK el estudio molecular muestra un patrón policlonal del gen TCR.

Se observan reordenamientos clonales de los genes de Ig en la mayoría de los linfomas B primario cutáneos (80-83% de los LMPC; un 91-100% de los LCFPC y en un 100% de los LBDCG-PCTP). Sin embargo, se han descrito también en un 4-22% de los infiltrados reactivos B de carácter no neoplásico. Se encuentran a su vez reordenamientos clonales T hasta en un 35% de los casos de linfoma B de la zona marginal primario cutáneo.

En aproximadamente un 26% de los LACGPC se ha descrito la translocación del gen IRF4 (6p25.3). Adicionalmente se ha descrito la presencia de la translocación del *locus* 6p25.3 afectando al gen DUSP22-IRF4 en un 20-57% de los LACGPC, en un subgrupo de PL con patrón morfológico bifásico, en un 8% de linfomas T periféricos sin rasgos específicos y en un 30% de linfomas T anaplásicos sistémicos ALK-negativos.

En los LMPC se han descrito traslocaciones afectando a las cadenas pesadas de las IgGs (IGH) y a los genes MALT y FOXP1, respectivamente; t(14;18)(q32;q21) y t(3,14)(p14.1;q32), respectivamente. No se han encontrado reordenamientos similares a los descritos en el linfoma del área marginal (MALT) de tipo gástrico, t(11;18)(q21;q21) o t(1;14)(p22;q32).

La presencia de translocación entre los genes IgH@/BCL2 se detecta hasta en un 10-41% de los casos de LCFPC. Sin embargo, se recomienda descartar en estos casos afectación cutánea por un linfoma folicular sistémico.

Se ha demostrado de forma frecuente translocación de los genes CMYC y BCL6 y amplificación de los genes BCL2 y MALT1 en LBDCG-PCTP. La mutación L265P de MYD88 se encuentra en un porcentaje variable de casos de LBDCG-PCTP según las series (33-61%).

## RECOMENDACIONES

1. La biopsia incisional amplia y escisional incluyendo epidermis y tejido celular subcutáneo de la lesión cutánea es el método de elección para el diagnóstico inicial de los casos con sospecha de proceso linfoproliferativo primariamente cutáneo. Las biopsias tipo «punch» no son adecuadas para el diagnóstico. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. Se deben descartar procesos reactivos que simulan linfomas; vitiligo, paniculitis lúpica, cambios secundarios a fármacos, infecciones virales, etc. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. Se recomienda estudio histopatológico convencional con H-E y un panel inmunohistoquímico básico que incluya marcadores B y T para el diagnóstico inicial. Grado C. Evidencia nivel IV.
4. Panel de primera línea: CD45 (ALC), CD20, CD3, CD4, CD8, CD30, ki67. Grado C. Evidencia nivel IV
5. Panel de segunda línea: Grado C. Evidencia nivel IV.
6. Línea T: CD5, CD7, TCRBF1, TCRGamma, CD56, ALK, EBV-EBER, PD1.
7. Línea B: BCL2, BCL6, CD10, KAPPA, LAMBDA, MUM1.

8. La presencia de clonalidad en el estudio molecular mediante PCR de los genes Ig y TCR es un dato a favor del diagnóstico de linfoma en un contexto clínico morfológico y fenotípico adecuado. Su ausencia no excluye el diagnóstico de proceso linfoproliferativo y su presencia aislada, en ausencia de otros datos clínicos y anatomopatológicos, no es suficiente. Grado C. Evidencia nivel IV.
9. Se recomienda incluir dentro del grupo de linfomas primarios cutáneos T o B no clasificables aquellos casos que no cumplan los criterios establecidos para las diferentes entidades descritas por la WHO-EORTC. Grado C. Evidencia nivel IV.
10. Es preciso tratar de establecer una buena correlación clínico patológica en cada caso para una correcta clasificación del mismo según la OMS. Grado C. Evidencia nivel IV.

## REFERENCIAS

11. Quintanilla-Martinez L, Jansen PM, Kinney MC, et al. Non-mycosis fungoides cutaneous T-cell lymphomas: report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology workshop. *Am J Clin Pathol.* 2013;139:491-514.
12. Swerdlow SH, Quintanilla-Martinez L, Willemze R, et al. Cutaneous B-cell lymphoproliferative disorders: report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology workshop. *Am J Clin Pathol.* 2013;139:515-535.
13. Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM, et al. Reclassification of 300 primary cutaneous B-Cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J Clin Oncol.* 2007;25:1581-1587.
14. Burg G, Kempf W, Cozzio A, et al. WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. *Journal of cutaneous pathology.* 2005;32:647-674.
15. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood.* 2005;105:3768-3785.
16. Wilcox RA. Cutaneous B-cell lymphomas: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2013;88:73-76.



# Consenso SEAP-SEHH-GOTEL: Neoplasias de células histiocíticas y de células dendríticas

**Antonio Martínez**

*antonmar@clinic.cat*

*Unidad de Hematopatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic, Barcelona.*

## DEFINICIÓN Y FRECUENCIA DE LA ENTIDAD

Las neoplasias de células dendríticas e histiocitarias son el grupo de tumores hematolinfoides menos frecuentes de todos, representando <1% de los tumores que se presentan en ganglios linfáticos y partes blandas. Dentro de este grupo se incluyen principalmente el sarcoma histiocítico, los tumores derivados de células de Langerhans, el sarcoma de células dendríticas interdigitantes y el sarcoma de células foliculares dendríticas.

Estas neoplasias pueden aparecer en cualquier edad, sin embargo, son más frecuentes en la edad adulta (40-50 años). La etiología es desconocida en la mayoría de casos, con excepción de algunos casos de sarcomas de células foliculares dendríticas que se desarrollan sobre enfermedad de Castleman hialino-vascular y en las variantes tipo pseudotumor inflamatorio en que el virus de Epstein-Barr juega un papel importante, pues se ha demostrado estar en forma monoclonal en virtualmente todas las células neoplásicas.

La mayoría de estos tumores se presentan como linfadenopatía indolora aislada o bien como masa de partes blandas y tienen un pronóstico variable en función de la entidad, siendo los sarcomas de células foliculares dendríticas los de curso clínico más indolente y los sarcomas histiocíticos y los sarcomas de células de Langerhans los de peor pronóstico con una mortalidad alrededor del 50%.

## TIPO DE MUESTRA IDÓNEA PARA EL DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de estas entidades se basa principalmente en el estudio morfológico e inmunofenotípico, siendo por tanto la **biopsia escisional** del tejido extraganglionar o del ganglio linfático afectado el procedimiento diagnóstico de elección. Sin embargo, cuando el contexto clínico del paciente no permita el estudio completo de la masa/ ganglio afecto, una **biopsia con aguja gruesa (BAG)** con material suficiente para poder realizar un estudio inmunohistoquímico amplio podría estar indicado.

Es necesaria la realización de una **biopsia medular** para el correcto estadiaje del paciente. En casos con sospecha de sarcoma histiocítico, una afectación difusa de la médula nos tendría que hacer considerar también el diagnóstico de leucemia monocítica aguda, ya que cuando estos tumores afectan la médula, normalmente es de forma parcheada.

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL Y ERRORES DIAGNÓSTICOS

Para el adecuado diagnóstico de las neoplasias de células histiocitarias y dendríticas, es necesario no solamente el estudio morfológico sino también un panel inmunohistoquímico amplio para descartar las principales entidades con las que hay que establecer el diagnóstico diferencial.

**Proliferaciones histiocitarias reactivas:** en este caso el diagnóstico es puramente morfológico. Citológicamente el sarcoma histiocítico tiene características evidentes de malignidad a diferencia de los núcleos ovales, con cromatina fina que encontramos en las proliferaciones histiocitarias reactivas.

**Sarcoma histiocítico:** Por definición tiene que existir:

- Expresión de **uno o más** marcadores de diferenciación histiocitaria, incluyendo
  - CD163 (tinción de membrana y/o de citoplasma),
  - CD68 (clones KP1 y PGM1) (tinción granular de citoplasma y/o patrón de Golgi)
  - Lisozima (tinción granular de citoplasma y/o patrón de Golgi).
- **Ausencia** de marcadores de
  - Células de Langerhans (CD1a\*, langerina)
  - Células Foliculares dendríticas (CD21, CD35, CD23)
  - Células Mieloides (CD33, CD13, Mieloperoxidasa)
  - Epiteliales (pancitoqueratinas, EMA)
  - Melanocíticos (HMB45, MelanA)

Puede existir expresión focal de CD15, S100, CD45, CD45RO, HLA-DR. CD4 es generalmente positivo.

\* Existe algún caso descrito con expresión focal y débil.

**Sarcoma de células foliculares dendríticas:** Para un diagnóstico de seguridad hay que demostrar positividad para uno o más marcadores de células foliculares dendríticas (CD21, CNA42, CD35 o CD23), aunque a veces la positividad es solamente focal, especialmente en las variantes más agresivas o en las pseudotumor inflamatorio-like. Otros marcadores que suelen ser positivos son CXCL13, EGFR, Vimentina y fascina. Hay que tener en cuenta que también pueden ser positivos, aunque de manera focal, CD68, EMA, S100, CD20, CD45 o queratinas.

**Sarcoma de células dendríticas interdigitantes:** Las células expresan intensa e invariablemente S100 siendo negativas para langerina. Otros marcadores que pueden ser positivos son vimentina, HLA-DR y fascina. CD68 también puede ser positivo. Los marcadores de células foliculares dendríticas (CD21, CD35 y CD23), mieloperoxidasa y CD34 son negativos. CD1a aunque generalmente negativo, se ha reportado algún caso con positividad focal y débil.

**Histiocitosis de células de Langerhans y Sarcoma de células de Langerhans:** Las células de Langerhans son positivas para CD1a, proteína S100 y/o langerina aunque en casos de SCL la tinción puede ser focal o débil.

Otros marcadores que pueden ser positivos son HLA-DR, CD68, CD45, Vimentina y Lisozima. Los marcadores de células foliculares dendríticas son negativos (CD21, CD23, CD35). Para diferenciar el SCH de la HCL es importante la morfología ya que las HCL las células de Langerhans son citológicamente «benignas» y se acompaña frecuentemente de eosinófilos. En casos de SCL el acompañamiento de eosinófilos está o bien ausente o estos son escasos. Aunque hay casos de HCL con tasas mitóticas altas, generalmente son bajas. Clínicamente puede existir superposición entre estas dos entidades ya que también existen casos de HCL con afectación multiorgánica.

**Leucemia monocítica:** A diferencia del SH, Generalmente tiene presentación sistémica y además expresa marcadores de diferenciación mieloides como CD33 y CD34.

**Otros** diagnósticos que hay que tener en cuenta ya que morfológicamente pueden remedar neoplasias histiocitarias/dendríticas son el linfoma difuso de células grandes B, los linfomas anaplásicos, el melanoma o casos de carcinomas indiferenciados. Sin embargo, el estudio inmunohistoquímico nos permitirá en cualquiera de estos casos llegar al diagnóstico definitivo.

## PANELES DE IHQ

El abordaje de las neoplasias histiocitarias/dendríticas debe incluir un panel inmunohistoquímico amplio, en primer lugar, descartar neoplasias más frecuentes que morfológicamente pueden ser similares y, en segundo lugar, incluir otra serie de marcadores para la mejor subclasificación de las diversas entidades.

Los marcadores de origen histiocitario/dendrítico que se recomienda utilizar en primer lugar son CD68 (clones PGM1 y/o KP1), CD1a, lisozima, S100, CD21 y CD23. De este modo podemos subclasificar alrededor del 90% de los casos.

Otros marcadores que serían de utilidad para el 10% restante serían CD163, langerina, CD35.

## CITOGENÉTICA/MOLECULAR

Aunque todavía no existe ninguna alteración molecular recurrente reconocida en la última clasificación de la OMS (2008) para este tipo de neoplasias, estudios recientes sugieren implicaciones importantes de la vía de BRAF en la patogénesis o en la transformación de las neoplasias de células histiocitarias y dendríticas. Así se ha encontrado la mutación BRAFV600E en histiocitosis de células de Langerhans (~60%), sarcoma histiocítico (~60%) y en la enfermedad de Erdheim-Chester (~60%) (véase capítulo de molecular).

Además, estudios recientes, sugieren que los pacientes con mutaciones de BRAF podrían beneficiarse de tratamientos con inhibidores del mismo.

## RECOMENDACIONES

1. Se trata de entidades muy poco frecuentes y cuyo diagnóstico es de exclusión en la mayoría de los casos, de modo que para el adecuado diagnóstico es necesario un conocimiento del estado clínico y analítico del paciente, así como un extenso estudio morfológico e inmunohistoquímico para descartar otras entidades. Grado C. Evidencia nivel IV.
2. Panel de IHQ: CD68 (clones PGM1 y/o KP1), CD1a, lisozima, S100, CD21, CD23, CD163, langerina, CD35. El uso del panel de inmunohistoquímica propuesto, permitiría virtualmente la subclasificación de la gran mayoría de estas neoplasias. Sin embargo, se dispone también de otras técnicas como la microscopía electrónica que pueden ser de utilidad en determinados casos. Grado C. Evidencia nivel IV.
3. Al tratarse de tumores de difícil abordaje diagnóstico, se recomienda la derivación del caso a hospitales con larga trayectoria y experiencia en el diagnóstico de neoplasias hematolinfoides. Grado C. Evidencia nivel IV.

\*Los autores desean agradecer a la Dra. Blanca González su colaboración en la redacción de este capítulo.

## Bibliografía

1. Swerdlow SH, CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues., 2008.
2. Pileri et al. *Histopathology* 41, 1–29 (2002). Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases.
3. Kairouz et al. *Am J Hematol.* 2007 Oct;82(10):924-8. Dendritic cell neoplasms: an overview.
4. Hornick JL et al. *Am J Surg Pathol.* 2004 Sep;28(9):1133-44. Extranodal histiocytic sarcoma: clinicopathologic analysis of 14 cases of a rare epithelioid malignancy.
5. Go H et al. *Histopathology.* 2014 Aug;65(2):261-72. Frequent detection of BRAF(V600E) mutations in histiocytic and dendritic cell neoplasms.
6. Bubolz AM et al. *Oncotarget.* 2014 Jun 30;5(12):4060-70. Potential clinical implications of BRAF mutations in histiocytic proliferations.
7. Haroche J, Charlotte F, Arnaud L, von Deimling A, Helias-Rodzewicz Z, Hervier B, et al. High prevalence of BRAF V600E mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses. *Blood.* 2012 Sep 27;120(13):2700-3.
8. Mehes G, Irsai G, Bedekovics J, Beke L, Fazakas F, Rozsa T, et al. Activating BRAF V600E Mutation in Aggressive Pediatric Langerhans Cell Histiocytosis: Demonstration by Allele-specific PCR/Direct Sequencing and Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2014 Aug 12.
9. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, MacConaill LE, Brandner B, Calicchio ML, et al. Recurrent BRAF mutations in Langerhans

RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE  
TRABAJO DE PATOLOGÍA DIGESTIVA  
DE LA SEAP



# Gemaciones tumorales o desdiferenciación tumoral focal (*tumor budding*) y grupos de tumor pobremente diferenciados (*poorly differentiated clusters*) en carcinoma colorrectal

Carolina Martínez Ciarpaglini<sup>1,4</sup>, Miriam Cuatrecasas<sup>2</sup>, Isidro Machado<sup>3,4</sup>

1. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico de Valencia.
2. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clinic de Barcelona.
3. Servicio de Anatomía Patológica, Instituto Valenciano de Oncología.
4. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Quiron-Salud, Valencia.

## GEMACIONES TUMORALES O DESDIFERENCIACIÓN TUMORAL FOCAL (TUMOR BUDDING; TB)

En la última década, la implantación sistemática de programas de cribado en la mayor parte de los países de la Unión Europea, ha permitido el diagnóstico temprano y el tratamiento precoz del carcinoma colorrectal (CCR), aunque cerca de 20 a 25% de los casos diagnosticados presentan enfermedad metastásica durante el curso de su evolución clínica [1,2].

El estadiaje del CCR de acuerdo al sistema TNM: grado de infiltración tumoral (T), invasión nodal (N) y metástasis a distancia (M), es actualmente el mayor predictor de supervivencia y uno de los parámetros más útiles para el manejo clínico del paciente [3]. Otros factores histopatológicos como el grado de diferenciación histológica y la presencia de invasión linfovascular (LV) y perineural también han demostrado influir de forma significativa en el pronóstico de la enfermedad [1,4,5]. Sin embargo, aún existe una gran necesidad de mejorar la estratificación de riesgo en los estadios iniciales donde el beneficio de la quimioterapia neoadyuvante no está del todo claro y podría ser determinante en algunos casos. Con el objetivo de mejorar la estadificación clínica y predecir el riesgo de metástasis nodal, en los últimos años se ha incorporado a diversas guías el denominado «**tumor budding**» (TB), **gemación tumoral o desdiferenciación tumoral focal**.

El concepto de TB se refiere a la **presencia de células tumorales aisladas o en pequeños grupos de menos de 4-5 células que se desprenden del frente invasor tumoral y se extienden al estroma adyacente** [6,7]. Este fenómeno es considerado como la manifestación histopatológica del proceso de Transición epitelio-mesénquima (TEM), un proceso dinámico mediante el cual, las células pierden el fenotipo epitelial y adquieren la capacidad migratoria e invasiva, propia de las células mesenquimales [8–11].

La presencia de TB se asocia a un mayor riesgo de recurrencia loco-regional y a distancia, y, por lo tanto, a una reducción de la supervivencia tumoral específica en pacientes con CCR [11–20]. Las lesiones con un alto grado de TB se asocian a un mayor estadio pTNM, a una menor diferenciación

tumoral, y a la presencia de invasión LV, perineural y ganglionar [12,17,19,21–25]. La utilidad clínica de la valoración del grado de TB ha sido ampliamente demostrada en la literatura, y se reconoce como un factor predictivo independiente de la presencia de metástasis ganglionar en el CCR precoz (pT1) y como un factor pronóstico adverso en pacientes con CCR en estadio II [4,7,23,25].

### **El TB proporciona información útil y se recomienda su determinación de rutina en los siguientes escenarios clínicos**

- Como biomarcador pronóstico para seleccionar pacientes en estadio II, en los que un alto grado de TB se asocia con un mayor riesgo de recurrencia, por lo que estos pacientes podrían beneficiarse de la terapia adyuvante [17,20,25,26].
- Como factor predictivo de la presencia de afectación ganglionar en el CCR precoz (**pT1**), especialmente en las muestras de polipectomía donde se ha demostrado que la presencia de un alto grado de TB se asocia con un riesgo de aproximadamente 20% de invasión ganglionar [4,23,27–29].

En el **CCR estadio III**, el TB parece mejorar la estratificación de riesgo ofrecida por el sistema pTNM, aunque son pocos los estudios que evalúan específicamente este grupo de pacientes [30,31].

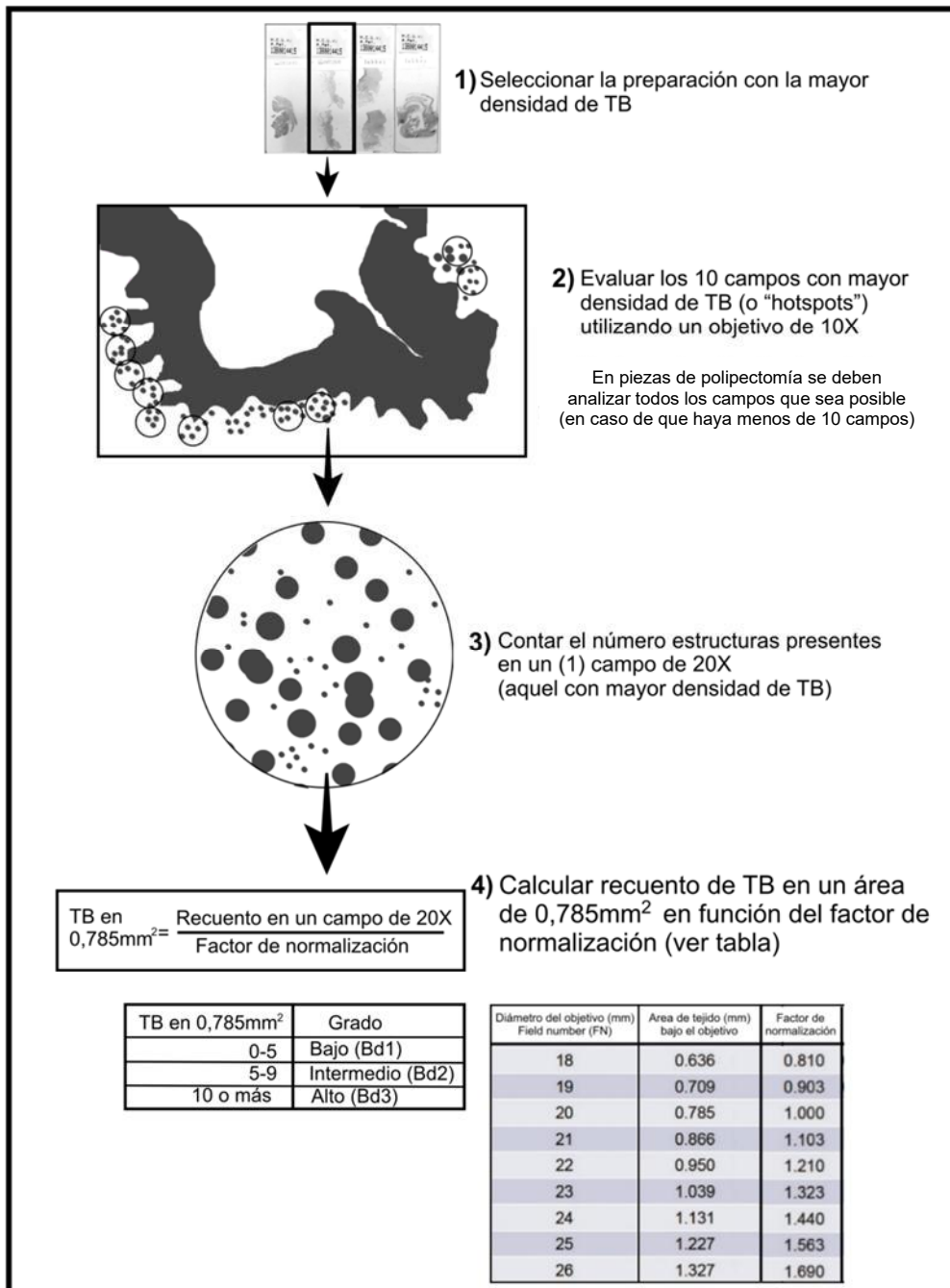
Durante las últimas tres décadas, se han realizado grandes esfuerzos por construir un sistema de gradación objetivo y reproducible que permita la implantación de la valoración de TB en los informes patológicos de rutina. Algunos autores prefieren el recuento de grupos de células pobremente diferenciadas o PDC (*poorly differentiated clusters*), un concepto que incluye grupos de más de 5 células que se desprenden del frente invasor tumoral sin formar estructuras glandulares y está en debate si estos grupos podrían representar un estadio previo a la formación de TB, o si por el contrario no tienen relación [29,31–33].

En el año 2016, se emite por primera vez una **guía de consenso para la valoración de TB, en el denominado ITBCC (International Tumor Budding Consensus Conference)** [7]. En esta guía se sugiere la inclusión sistemática del grado de la TB en los protocolos para la elaboración de informes patológicos de rutina de las piezas de colectomía por adenocarcinoma (ADC) [7]. También se recomienda con un nivel de evidencia moderado, que el recuento debe realizarse en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina (HE), en el campo de 20x con mayor densidad de TB, seleccionado tras evaluar los 10 campos con mayor cantidad de estructuras presentes (o «*hotspots*»). El resultado debe dividirse por un factor de normalización de acuerdo al microscopio utilizado para obtener una estimación equivalente al número de estructuras presentes en 0,785mm<sup>2</sup>. De acuerdo al valor obtenido, el grado de TB se clasifica de la siguiente forma: bajo (menos de 5), intermedio (de 5 a 9) y alto (superior a 10) (figura 1).

La utilidad de la inmunotinción para CKAE1/AE3 ha sido evaluada por varios autores, y parece mejorar la reproducibilidad y la concordancia interobservador de la gradación de la TB [4,7,22,26,29,37,40]. Aunque la guía de consenso de la ITBCC recomienda la valoración de TB en la tinción de HE, reconoce la utilidad de la inmunotinción en los casos de difícil valoración por un denso infiltrado estromal y/o inflamatorio, y sostiene que esta recomendación podría cambiar en los próximos años a medida que se acumule más evidencia a favor del uso de la tinción inmunohistoquímica [7,36].



**Figura 1.** Recomendaciones de la ITBCC (*International Tumor Budding Consensus Conference*) para la determinación y el reporte de TB en piezas de colectomía y polipectomía con carcinoma colorrectal.



Existen algunas **consideraciones** especiales a la hora de realizar la evaluación del TB:

- El grado de TB no influye en el grado de diferenciación del tumor. Este último depende exclusivamente de la formación de luces glandulares.
- En los casos donde no es posible identificar TB, el recuento es igual a cero (0), pero el grado de TB es igual a 1 (bajo grado). No se debe informar como «ausencia de TB».
- La inmunotinción para citoqueratinas debe reservarse para casos de difícil valoración, como aquellos que muestran un denso infiltrado inflamatorio en el frente invasor.
- En caso de utilizar la inmunotinción para citoqueratinas, debe tenerse especial precaución y no incluir cuerpos apoptóticos dentro del recuento de TB.

- En tumores mucinosos y con células en anillo de sello, no deben incluirse en el recuento aquellos nidos de células tumorales embebidas en el material mucinoso.
- Los casos con extensa descohesión celular (como algunos carcinomas medulares) y aquellos con extensa fragmentación celular por infiltrado inflamatorio neutrofílico y/o abscesificación, pueden clasificarse como «TB no valorable».

### **GRUPOS DE TUMOR POBREMENTE DIFERENCIADOS (POORLY DIFFERENTIATED CLUSTERS, PDC)**

El sistema de clasificación convencional del grado histológico en CCR según refleja el protocolo CAP (Colegio Americano de Patólogos) es el más conocido y probablemente el más empleado en la mayoría de los laboratorios de patología [31, 39-41]. Este sistema estratifica los CCR en 4 grados según el porcentaje de formación glandular del tumor (bien diferenciado/G1 >95%, moderadamente diferenciado/G2 entre el 50-95%, pobremente diferenciado/G3 <50% e indiferenciado G4 sin formación glandular ni mucina sin presentar diferenciación neuroendocrina ni escamosa). Aunque algunos sistemas proponen un sistema de clasificación en dos grados (bajo G1&G2 versus alto grado G3&G4) con el objetivo de reducir el grado de subjetividad, la realidad es que el sistema de 4 grados es más aceptado por la comunidad de patólogos.

A pesar de que este sistema de gradación parece ser un factor pronóstico independiente en varios análisis multivariantes de múltiples estudios, la realidad es que existe una evidente variabilidad inter-observador entre patólogos sobre todo en biopsias endoscópicas y cuando se trata de diferenciar los ADC G1 de los G2 aunque esto en teoría no debería provocar discordancias llamativas considerando que ambos son considerados de bajo grado en la clasificación binaria [31,39-41]. Otro problema adicional es que se puede infraestimar el valor pronóstico de la identificación de un componente pobremente diferenciado aunque aparezca focalmente en un tumor o bien porque la muestra es limitada como en biopsias endoscópicas o porque no se evalúa todo el tumor como en el caso de la pieza quirúrgica [31,39-41]. Además en un ADC con extensa formación glandular G1 o G2 se puede obviar la presencia de pequeñas zonas con presencia de grupos de tumor pobremente diferenciado que podrían eventualmente influenciar en la biología del tumor y en el pronóstico del paciente.

En el 2012 el grupo Japones de Ueno y col. publican un estudio con una casuística de 500 pacientes con CCR estadio II o III donde excluyeron los ADC T1 [31]. En este estudio proponen la cuantificación de los **grupos de tumor pobremente diferenciados (GTPD)** como método alternativo para la gradación del tumor. Este grupo de autores definieron a los GTPD como **grupos de tumor constituidos por 5 o más células tumorales sin formar una estructura glandular** (figura 2), subclasificando el grado del tumor acorde a la cantidad de GTPD presentes en un campo de 20X. Los tumores fueron gradados como: G1 (<5 GTPD), G2 (5-9 GTPD) y G3 (10 o más GTPD). Usando este sistema de gradación Ueno y col. [31] demostraron mayor concordancia inter-observador, además la estratificación de pacientes en relación con la supervivencia fue más precisa lo que hace pensar que la agresividad biológica del tumor parece estar más relacionada con la formación de mayor número de GTPD que con la pérdida de formación glandular.

Posteriormente se ha demostrado por Barresi y col. y por el grupo Japones de Ueno y col. que la presencia de GTPD sobre todo de alto grado (G3) se asocia de manera significativa con metástasis ganglionares en pacientes con CCR T1 lo que ayuda a estratificar a pacientes con CCR en estadio inicial que requieran una cirugía adicional o de lo contrario pacientes que puedan tratarse con una estrategia de esperar y ver (*wait and see*) [39-44].

El grado de acuerdo inter-observador entre patólogos en la cuantificación de los GTPD es mucho mejor cuando se compara con la concordancia en la evaluación de las gemaciones tumorales (TB) considerando que estos grupos se identifica mucho mejor con H/E que las TB y además generalmente no requieren de la tinción adicional con CK que en ocasiones es útil para la identificación de TB.

El grupo de Barresi y col. también ha propuesto que los GTPD también pueden cuantificarse en las biopsias endoscópicas e incluso tienen significado predictivo de respuesta al tratamiento

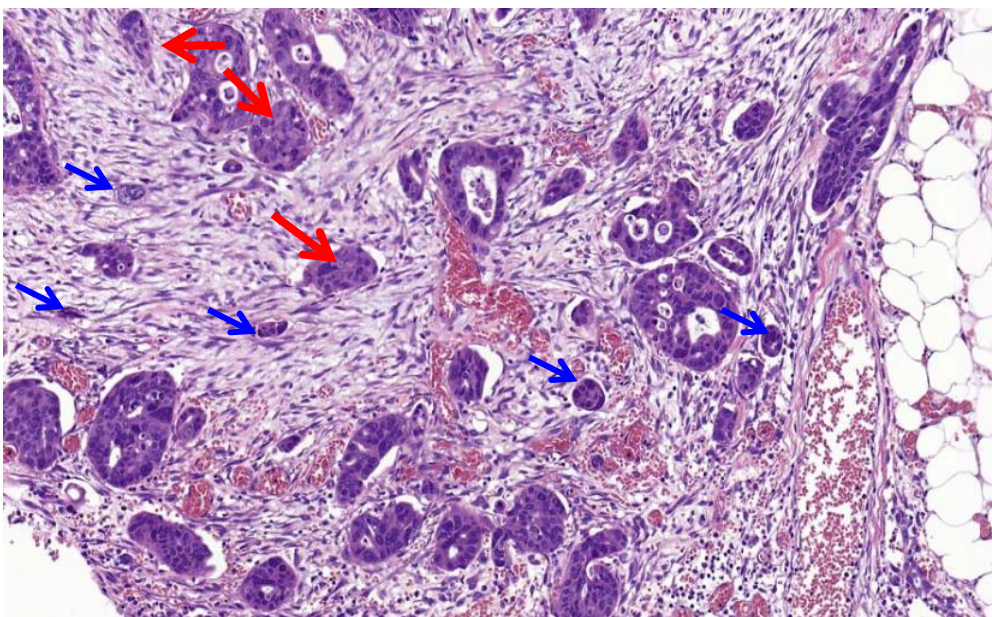
neoadyuvante en cáncer de recto avanzado [41]. Para esto el grupo de Barresi y col. ajustó el punto de corte en las biopsias endoscópicas donde aquellos casos sin GTPD fueron gradados como G1, los tumores con 1 o 2 GTPD como G2 y G3 aquellos tumores con más de 2 GTPD. De manera interesante, la presencia de GTPD de alto riesgo (G3) se asoció con peor respuesta al tratamiento neoadyuvante [40]. Estos hallazgos hacen pensar que la estrategia (esperar y ver) no es una opción adecuada en aquellos pacientes con cáncer de recto con tratamiento neoadyuvante y abundantes GTPD en la biopsia basal porque eventualmente es mucho más probable que tengan pobre respuesta al tratamiento neoadyuvante.

A pesar de que Shivji S y col. [44] en un estudio reciente refuerza el valor indudable que tiene la identificación de grupos de GTPD y su asociación con varios factores histológicos adversos y con peor supervivencia, desafortunadamente no se ha incorporado este sistema de gradación en las guías y protocolos actuales de CCR, quizá se requiera una estandarización adecuada del reporte de esta variable histológica como se ha realizado con las gemaciones tumorales, de hecho recientemente Ueno y col. han publicado un trabajo donde utilizan como parámetro para evaluación de tumor pobremente diferenciado el objetivo 40x cuando previamente siempre se hacía referencia al objetivo 20x [45].

A manera de resumen, el significado pronóstico de los GTPD ha sido evaluado en varios escenarios clínicos. En CRC endoscópicamente resecaos, la cuantificación de GTPD ayuda en la identificación de pacientes con alto riesgo de metástasis ganglionares lo que potencialmente ayuda en la selección de pacientes que requieren una cirugía adicional para evaluar el estatus ganglionar. En CCR resecaos con estadio II, la cuantificación de GTPD con gradación identifica pacientes con alto riesgo de recurrencias los cuales pueden beneficiarse de tratamiento adyuvante. Por último, en pacientes con CCR avanzados, la identificación de GTPD puede predecir el tiempo a la recurrencia lo que ayudaría potencialmente a diseñar una estrategia adecuada de seguimiento postoperatorio [41-44].

Parece ser que tanto el TB como los GTPD forman parte de un espectro histológico como reflejo de la transición epitelial mesenquimal que ocurre en el frente de crecimiento invasor en los CCR por lo que probablemente cuando este bien estandarizado el reporte de los GTPD en los informes AP pase a formar parte de los parámetros incluidos en las guías o protocolos futuros para el diagnóstico en CCR.

**Figura 2.** Gemaciones tumorales o TB señalados con flecha azul y grupos de tumor pobremente diferenciados con flecha roja.



## Bibliografía

1. Quirke P, et al. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis-European recommendations. *Virchows Arch.*2011;458:1-19.
2. Schmoll HJ, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol.* 2012;23:2479-516.
3. Amin M, et al AJCC cancer staging manual. 8th ed. New York: Springer, 2017.
4. Beaton C, Twine CP, Williams GL y col. Systematic review and meta-analysis of histopathological factors influencing the risk of lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2013;15:788-797.
5. Compton CC, et al Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;3:124:979..
6. De Smedt L, et al Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do?. *Virchows Arch.* 2016;468:397-408.
7. Lugli A, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod pathol.* 2017;30:1299-1311.
8. Zlobec I, et al. Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. *World J. Gastroenterol.*2010;16:4823-4831.
9. Dan Grigore A, et al. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. doi:10.3390/jcm5050051
10. Kohler I, et al. Detailed analysis of epithelial-mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of long-term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015;30:78-84.
11. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology.* 2007;50:151-162.
12. Graham RP, et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: confirmation of prognostic significance and histologic cutoff in a population-based cohort. *Am J Surg Pathol.* 2015;39:1340-1346.
13. Hase K, et al. Prognostic value of tumor 'budding' in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1993;36:627-635.
14. Jass JR, et al. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet.* 1987;1:1303-1306
15. Koelzer VH, et al. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch.* 2015;466: 485-493.
16. Nakamura T, et al. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 2005;52:1432-1435.
17. Okuyama T, et al. Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 2003;83:42-47.
18. Park KJ, et al. Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum.* 2005;48:1597-1602.
19. Ueno H, et al. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*40, 127-132 (2002).

20. Wang LM, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J SurgPathol.* 2009;33:134-141.
21. Morodomi T, et al. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer.* 1989;63:539-543.
22. Ueno H, et al. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg.* 2004;240:832-839.
23. Ueno H, et al. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;127:385-394.
24. Karamitopoulou E, et al. Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2012;26:295-301.
25. Nakamura T, et al. Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum.* 2008;51:568-572.
26. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology.* 2007;50:151-162.
27. Horcic M, et al. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2013;44:697-705.
28. Bosch S, et al. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: A systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy.* 2013;45:827-834.
29. Barresi V, et al. Poorly differentiated clusters (PDCs) as a novel histological predictor of nodal metastases in pT1 colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2014;464:655-662.
30. Choi HJ, et al. Tumor budding as a prognostic marker in stage-III rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22:863-868.
31. Ueno H, et al. New Criteria for Histologic Grading of Colorectal Cancer. *Am J Surg Pathol.* 2012;36:193-201.
32. Reggiani B et al. Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer : what is and ought to be known. *Diagn Pathol.* 2016;22:11-31.
33. Barresi V, et al. Colorectal carcinoma grading by quantifying poorly differentiated cell clusters is more reproducible and provides more robust prognostic information than conventional grading. *Virchows Arch.* 2012;461:621-628.
34. Horcic M, et al. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2013;44:697-705.
35. Koelzer VH, et al. Tumor budding in colorectal cancer - Ready for diagnostic practice?. *Hum. Pathol.* 2016;47:4-19.
36. Mitrovic B et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol.* 2012;25:1315-25.
37. Puppa G, et al. Diagnostic reproducibility of tumour budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy. *Histopathology.* 2012;61:562-75.
38. Ueno H, et al. Site-specific tumor grading system in colorectal cancer: multicenter pathologic review of the value of quantifying poorly differentiated clusters. *Am J SurgPathol.* 2014 Feb;38(2):197-204.

39. Ueno H, et al. Novel risk factors for lymph node metastasis in early invasive colorectal cancer: a multi-institution pathology review. *J Gastroenterol*. 2014 Sep;49(9):1314-23.
40. Barresi V, et al. Histologic grading based on counting poorly differentiated clusters in preoperative biopsy predicts nodal involvement and pTNM stage in colorectal cancer patients. *Hum Pathol*. 2014 Feb;45(2):268-75.
41. ReggianiBonetti L, Lioni S, Domati F, Pagliani G, Mattioli E, Barresi V. Histological grading based on poorly differentiated clusters is predictive of tumour response and clinical outcome in rectal carcinoma treated with neoadjuvantchemoradiotherapy. *Histopathology*. 2017 Sep;71(3):393-405.
42. Barresi V, et al. Poorly Differentiated Clusters: Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2017 Mar;16(1):9-15.
43. Ammendola S, et al. The presence of poorly differentiated clusters predicts survival in stage II colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2020 Jun 23.
44. Shivji S, et al. Poorly differentiated clusters in colorectal cancer: a current review and implications for future practice. *Histopathology*. 2020 Sep;77(3):351-368.
45. Ueno H, et al. Optimal Criteria for G3 (Poorly Differentiated) Stage II Colon Cancer: Prospective Validation in a Randomized Controlled Study (SACURA Trial). *Am J SurgPathol*. 2020 Dec;44(12):1685-1698.

# Apéndice cecal: Tumores mucinosos apendiculares. Actualización del informe diagnóstico protocolizado y modificaciones en el estadio

Miriam Cuatrecasas<sup>1</sup>, Eva Musulén<sup>2</sup>, Mar Iglesias<sup>3</sup>, Carolina Martinez Ciarpaglini<sup>4</sup>, Stefania Landolfi<sup>5</sup>, Isidro Machado<sup>6</sup>

1. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic de Barcelona.
2. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitari General de Catalunya-Grupo Quirón-Salud, Sant Cugat del Vallès (Barcelona) y Grupo de Epigenética del Cáncer. Instituto de Investigación Josep Carreras (IJC), Badalona (Barcelona).
3. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital del Mar. Barcelona
4. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico de Valencia.
5. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitari Vall d'Hebrón. Barcelona
6. Servicio de Anatomía Patológica, Instituto Valenciano de Oncología y Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Quirón-Salud, Valencia.

## TUMORES MUCINOSOS DEL APÉNDICE CECAL: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Los tumores del apéndice cecal se desarrollan a través de lesiones precursoras neoplásicas similares a las del intestino delgado y grueso, con biología y vías moleculares similares. Los tumores mucinosos apendiculares son poco frecuentes.

Se caracterizan por una proliferación epitelial que forma material mucoide, con presencia de mucina extracelular y unos márgenes de infiltración de tipo expansivo.

Recientemente, la OMS [1] ha clasificado los tumores mucinosos en tres grandes grupos:

- **Neoplasia mucinosa apendicular de bajo grado (*low grade appendiceal mucinous neoplasm*, LAMN):** Descrita en 2003. Se caracteriza por la sustitución de la mucosa apendicular normal por una proliferación epitelial mucinosa, vellosa, ondulada o plana. La atipia citológica suele ser escasa. Normalmente desaparece el tejido linfoide apendicular. Son lesiones con obliteración de la mucosa en la que el epitelio neoplásico-adenomatoso descansa sobre tejido fibroso, sin identificarse lámina propia de la mucosa residual, o bien tumores con invasión expansiva intramural o transmural con afectación peritoneal, asociada a fibrosis, hialinización y calcificaciones. Las LAMN pueden extenderse al peritoneo, causando pseudomixoma peritoneal (PMP). La afectación serosa puede ser en forma de lagos de mucina acelular o bien lagos de mucina con presencia de tiras de epitelio displásico con poca atipia citológica (figura 1). Esta categoría diagnóstica incluye términos antiguos como tumor mucinoso de significado incierto, cistadenocarcinoma mucinoso o cistadenoma mucinoso.

- **Neoplasia mucinosa apendicular de alto grado (*high grade appendiceal mucinous neoplasm* HAMN):** Descrita en 2016, son raras. Presenta características histológicas similares a la LAMN pero que se caracterizan por tener citología de alto grado y arquitectura micropapilar o cribiforme. Este término se ha incluido en la 8ª edición del AJCC. [2,3] A fines prácticos, podrían incorporarse en el grupo de los adenocarcinomas infiltrantes de tipo mucinoso, dado que, según la quinta edición de la OMS, las HAMN son raras y hay datos limitados cuando se limitan al apéndice, pero cuando se han diseminado a la cavidad peritoneal, es probable que se comporten como otros tumores mucinosos que se han diseminado al peritoneo.
- **Adenocarcinoma mucinoso apendicular (*mucinous appendicular carcinoma* (MAC)):** Se considera un subtipo de los adenocarcinomas que ocurren en el apéndice. Esta neoplasia presenta invasión destructiva o infiltrativa caracterizada por tener depósitos de mucina con grupos flotantes de epitelio, glándulas cribiformes o infiltrativas en más del 50% del tumor, con presencia de reacción desmoplásica además de atipia citológica de alto grado y proliferación epitelial compleja. Si las células epiteliales malignas son células en anillo de sello en más del 50% se subclasifica como adenocarcinoma mucinoso con células en anillo de sello. Suelen presentar invasión linfática y vascular.

Estas neoplasias mucinosas se gradan en tres categorías: Las LAMN se consideran lesiones de grado 1, los adenocarcinomas mucinosos convencionales corresponden a grado 2 y los adenocarcinomas mucinosos con células en anillo de sello se consideran grado 3.

Algunos estudios han demostrado que los carcinomas mucinosos del apéndice tienen mejor pronóstico que los adenocarcinomas no mucinosos y es menos probable que demuestren diseminación linfática o hematogena [4,5]. Uno de los factores pronósticos más críticos de las neoplasias mucinosas apendiculares es la presencia o ausencia de células epiteliales mucinosas en los lagos de mucina extraapendicular, por lo que la presencia o ausencia de células epiteliales en la mucina debe especificarse en el informe de anatomía patológica, dado que la presencia se asocia con un mayor riesgo de recurrencia o diseminación [6-9].

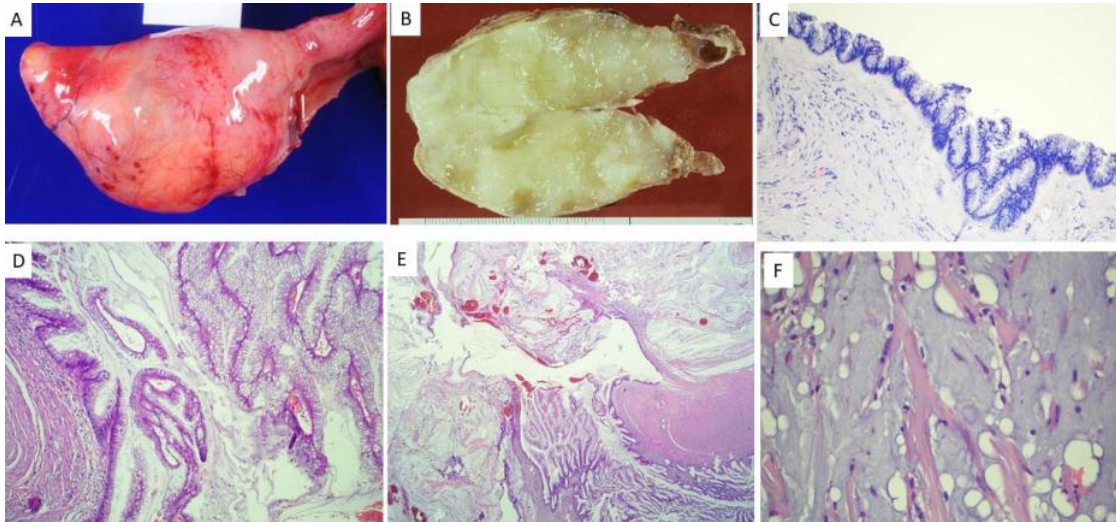
Los MAC y las HAMN suelen presentarse en estadios más avanzados, en estadio de PMP en el momento de la cirugía, con mayor diseminación metastática y menor supervivencia libre de recidiva que las LAMN.

## ALTERACIONES MOLECULARES

En cuanto a las alteraciones genéticas, los LAMN presentan mutaciones en *GNAS* y *KRAS*, y menos frecuentemente en *TP53*. En los MAC se detectan mutaciones de *TP53* [10,11]. Estos distintos patrones mutacionales de LAMN y MAC apoyarían el consenso de que MAC no progresa desde LAMN. Sin embargo, varios estudios han demostrado la presencia de áreas de bajo grado en MAC y presencia de mutaciones comunes en LAMN, HAMN y MAC [12-15]. La histogénesis común en los tumores mucinosos apendiculares pone en evidencia la posibilidad de progresión de LAMN a HAMN o MAC vía activación de la vía Wnt/b-catenina. No es frecuente encontrar inestabilidad de microsatélites, pérdida de expresión de los genes reparadores ni mutación de BRAF en las LAMN. Las mutaciones en *RNF43* parecen ser pasajeras o aparecen tarde en MAC, sin afectar en el proceso de progresión tumoral. En los LAMN, las mutaciones en *RNF43* podrían activar una vía alternativa de progresión en la carcinogénesis. Los tumores mucinosos apendiculares con mutaciones en *RNF43* suelen tener menos PMP por ser menos mucoproductores [14].



**Figura 1.** A) Apéndice cecal dilatado, con presencia de material mucinoso en serosa. B) Apéndice seccionado con contenido mucinoso (clínicamente mucocelo). C) Microscópicamente LAMN, con proliferación epitelial mucinosa, ondulada. D) LAMN con proliferación epitelial mucinosa vellosa. E) El mismo tumor con formación de grandes lagos de moco acelular en la parte superior de la imagen. F) LAMN con moco acelular en superficie serosa (pT4a).



## CAMBIOS EN EL ESTADIO TNM (VER ANEXO)

### Cambios en la 8ª Clasificación de la UICC

Las **HAMN** y los **MAC** utilizan el **estadaje de los carcinomas apendiculares**.

En las **LAMN**, el cambio más importante es que se clasifica como **pTis las LAMN que infiltran la capa muscular propia**. En las LAMN **no existen las categorías pT1 y pT2**. Estos criterios de clasificación están respaldados por la evidencia de que los pacientes con pTis LAMN, no desarrollan recidivas, independientemente de si infiltran submucosa o muscular propia.

Además, **la presencia de mucina acelular** aplica a las categorías T, N, M. No se requiere la presencia de células epiteliales en los lagos de mucina para la estadificación T, N, M [1,16].

- **pTis:** Neoplasia mucinosa apendicular de bajo grado (LAMN), o bien mucina acelular o epitelio mucinoso en submucosa y muscular propia (por lo tanto, las categorías T1 y T2 no son aplicables a LAMN).
- **pT3:** LAMN con afectación de la subserosa o mesoapéndice, ya sea mucina acelular o con presencia de células epiteliales.
- **pT4a:** LAMN con afectación serosa (peritoneo visceral), ya sea mucina acelular o con presencia de células epiteliales.

Los cambios en las categorías N y M de los carcinomas del apéndice cecal son:

La **categoría N1** se subdivide en:

- **N1a:** metástasis en 1 ganglio linfático regional.
- **N1b:** metástasis en 2–3 ganglios linfáticos regionales.
- **N1c:** presencia de depósitos tumorales o nódulos satélites, en la subserosa, en la grasa no peritonealizada o el tejido blando perirectal, sin metástasis a los ganglios linfáticos regionales.

La **categoría M** se divide en:

- **M1a:** presencia de mucina acelular intraperitoneal.
- **M1b:** presencia de mucina celular intraperitoneal.
- **M1c:** metástasis extraperitoneal.

Otras consideraciones:

- La proliferación adenomatosa con una lámina propia intacta se considera un **adenoma apendicular**
- El **adenocarcinoma de células caliciformes del apéndice** se ha renombrado recientemente (anteriormente llamado carcinoide / carcinoma de células caliciformes) es un excelente ejemplo de un tumor cuyo potencial biológico y características histológicas se han descrito mejor, lo que da como resultado mejoras en el abordaje patológico de estos tumores.

### DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO DEL CÁNCER DE APÉNDICE CECAL [16]

El diagnóstico patológico del cáncer de apéndice cecal, así como a las neoplasias mucinosas apendiculares de grado bajo (LAMN) (o alto grado), se realiza de forma protocolizada y homogenizada, basado en las guías de diagnóstico de cáncer del Colegio Americano de Patólogos (CAP), y se actualiza periódicamente. Incluye el estadio patológico y las determinaciones moleculares recomendadas.

Se adjunta un **modelo estándar** con las recomendaciones de protocolo diagnóstico del CAP.

APÉNDICE. TUMOR (APENDICECTOMÍA / APENDICECTOMÍA CON HEMICOLECTOMÍA DERECHA / CEQUECTOMÍA):

- LOCALIZACIÓN:
  - Mitad proximal con la base apendicular afecta /no afecta / no evaluable
  - Mitad distal apendicular
  - Afectación difusa
- TAMAÑO \_ CM (dimensiones adicionales \_\_\_ x \_\_\_ cm)
- TIPO HISTOLÓGICO: Adenocarcinoma / Adenocarcinoma mucinoso / Neoplasia mucinosa apendicular de bajo grado / Neoplasia mucinosa apendicular de alto grado / Carcinoma de células en anillo de sello / Adenocarcinoma de células caliciformes / Carcinoma neuroendocrino de células grandes / Carcinoma neuroendocrino de células pequeñas / Neoplasia neuroendocrina-no neuroendocrina mixta (carcinoma adenoneuroendocrino mixto) / Carcinoma medular / Carcinoma adenoescamoso / Carcinoma indiferenciado / Otro tipo histológico (especificar) / Carcinoma, tipo no determinable (especificar)
- GRADO HISTOLÓGICO (G1: BIEN DIFERENCIADO; G2: MODERADAMENTE DIFERENCIADO; G3: POBREMENTE DIFERENCIADO)
- EL TUMOR INFILTRA LA LÁMINA PROPIA O MUSCULARIS MUCOSA / SUBMUCOSA, MUSCULAR PROPIA / TUMOR O MUCINA ACELULAR EN SUBSerosa O MESOAPÉNDICE / TUMOR O MUCINA ACELULAR EN PERITONEO VISCERAL (Serosa) / INFILTRACIÓN DEL TUMOR A ÓRGANOS ADYACENTES O ESTRUCTURAS (especificar) / NO PUEDE DETERMINARSE
- MÁRGENES DE RESECCIÓN PROXIMAL Y MESENTÉRICO (OTROS MÁRGENES SEGÚN TIPO CIRURGÍA): NEGATIVO / POSITIVO / CON DISPLASIA DE ALTO GRADO (especificar si hay presencia de mucina acelular, LAMN, HAMN, carcinoma)
- AUSENCIA / PRESENCIA DE INVASIÓN VASCULAR ANGIOLINFÁTICA
- AUSENCIA / PRESENCIA DE INVASIÓN PERINEURAL

- DEPÓSITOS TUMORALES: No identificados / Presentes (especificar el número de depósitos)
- SIN EVIDENCIA DE NEOPLASIA EN XX/XX GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES / METÁSTASIS A XX/XX GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES
- ESTADIO pT\_N\_ (TNM 8ª Ed. 2017): ver ANEXO CLASIFICACIÓN PATOLÓGICA ESTADIO pTNM, AJCC 8ª Edición. Deben especificarse los estadios L, V y PN (invasión linfática, vascular y perineural).
- HALLAZGOS PATOLÓGICOS ADICIONALES (Apendicitis aguda, Perforación, Colitis Ulcerosa, Enfermedad de Crohn, Diverticulosis, etc.)

Asimismo, **en todos los carcinomas apendiculares se realizará la determinación de inestabilidad de microsatélites**, bien por estudio inmunohistoquímico, bien por PCR/Idylla u otros medios disponibles. El informe modelo sería como este:

#### ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS PROTEÍNAS DE LOS GENES REPARADORES DEL ADN:

TÉCNICA: Estudio realizado sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina. Anticuerpo monoclonal. Detección mediante polímero-DAB.

#### RESULTADO:

Expresión de MLH-1 en el carcinoma apendicular: POSITIVIDAD/NEGATIVIDAD NUCLEAR (NORMAL/ANORMAL) /NO SE PUEDE DETERMINAR (explicar).

Expresión de MSH-2 en el carcinoma apendicular: POSITIVIDAD/NEGATIVIDAD NUCLEAR (NORMAL/ANORMAL) / NO SE PUEDE DETERMINAR (explicar).

Expresión de MSH-6 en el carcinoma apendicular: POSITIVIDAD/NEGATIVIDAD NUCLEAR (NORMAL/ANORMAL) / NO SE PUEDE DETERMINAR (explicar).

Expresión de PMS-2 en el carcinoma apendicular: POSITIVIDAD/NEGATIVIDAD NUCLEAR (NORMAL/ANORMAL) / NO SE PUEDE DETERMINAR (explicar).

#### **Celularidad no neoplásica de fondo / control interno con expresión nuclear intacta**

**En caso de negatividad para MSH2, se realizará determinación inmunohistoquímica para EPCAM [17].**

#### **ANEXO: CLASIFICACIÓN PATOLÓGICA ESTADIO PTNM, AJCC 8ª EDICIÓN**

La clasificación de estadios patológicos (pTNM, AJCC 8ª edición) se basa en la pT, pN y pM, aunque en el informe patológico se basa en la información disponible para el patólogo en ese momento. La asignación por Grupos de Estadio Pronóstico Patológico es responsabilidad del médico a cargo del paciente y no del patólogo.

#### **Prefijos TNM (requerido solo si corresponde)**

- m (múltiples tumores primarios)
- r (recidiva)
- y (postratamiento)

### Tumor primario (pT)

- pTX: El tumor primario no se puede evaluar.
- pT0: Sin evidencia de tumor primario.
- pTis: Carcinoma in situ, carcinoma intramucoso (infiltración de la lámina propia sin sobrepasar la muscularis mucosae; puede infiltrar focalmente la muscularis mucosae).
- pTis en neoplasia mucinosa apendicular de bajo grado (LAMN): Mucina acelular o el epitelio mucinoso invade hasta la muscularis propria (no son aplicables pT1 ni pT2).
- pT1: El tumor invade la submucosa (a través de la muscularis mucosa pero no alcanza la muscular propia).
- pT2: El tumor invade la muscular propia.
- pT3: el tumor invade el mesoapéndice.
- pT4: El tumor invade:
  - pT4a: El peritoneo visceral (incluye la perforación del tumor y la invasión continua del tumor a través de áreas de inflamación a la superficie del peritoneo visceral).
  - pT4b: Invade o se adhiere a órganos o estructuras adyacentes.

pT en neoplasia mucinosa apendicular de bajo grado (LAMN):

- pTis: La mucina acelular o el epitelio mucinoso invade hasta la muscularis propria (no son aplicables pT1 ni pT2).
- pT3: La mucina acelular o el epitelio mucinoso que se extiende al mesoapéndice.
- pT4a: La mucina acelular o el epitelio mucinoso que se extiende a la serosa.

### Ganglios linfáticos regionales (pN)

- pNX: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
- pN0: Ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
- pN1: Metástasis en uno a tres ganglios linfáticos regionales (tumor en ganglios linfáticos que mide  $\geq 0,2$  mm), o presencia de depósitos tumorales con ganglios negativos.
  - pN1a: Metástasis a un ganglio linfático regional.
  - pN1b: Metástasis a dos o tres ganglios linfáticos regionales.
  - pN1c: No hay ganglios linfáticos regionales positivos, pero hay depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos no peritonealizados o perirrectales / mesorrectales.
- pN2: Metástasis a cuatro o más ganglios linfáticos regionales.

### Metástasis a distancia (pM) (requerida solo si se confirma patológicamente)

- pM1: Metástasis a uno o más sitios u órganos distantes o metástasis peritoneal.
- pM1a: Mucina acelular intraperitoneal, sin células tumorales identificables los depósitos mucinosos peritoneales diseminados (Para muestras que contienen mucina acelular sin células tumorales identificables, se deben hacer esfuerzos para obtener tejido para un examen histológico completo para evaluar la presencia de celularidad).
- pM1b: Metástasis intraperitoneal solamente, incluidos los depósitos mucinosos peritoneales que contienen células tumorales.
- pM1c: Metástasis a sitios distintos al peritoneo (especificar el sitio(s), si se conoce).

## Bibliografía

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive system tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 1). Appendiceal mucinous neoplasm. p144-146
2. Carr NJ, Cecil TD, Mohamed F, et al; Peritoneal Surface Oncology Group International. A consensus for classification and pathologic reporting of pseudomyxoma peritonei and associated appendiceal neoplasia: the results of the Peritoneal Surface Oncology Group International (PSOGI) Modified Delphi Process. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(1):14-26.
3. UICC TNM classification (8th ed.). 2016
4. Misdraji J (2010) Appendiceal mucinous neoplasms controversial issues. *Arch Pathol Lab Med* 134:864–870
5. Misdraji J (2015) Mucinous epithelial neoplasms of the appendix and pseudomyxoma peritonei. *Mod Pathol* 28(Suppl 1):S67–S79. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.129>
6. Carr NJ, Bibeau F, Bradley RF et al (2017) The histopathological classification, diagnosis and differential diagnosis of mucinous appendiceal neoplasms, appendiceal adenocarcinomas and pseudomyxoma peritonei. *Histopathology* 71:847–858
7. Gonzalez-Moreno S, Sugarbaker PH. Right hemicolectomy does not confer a survival advantage in patients with mucinous carcinoma of the appendix and peritoneal seeding. *Br J Surg*. 2004;91(3):304-311.
8. Pai RK, Beck AH, Norton JA, Longacre TA. Appendiceal mucinous neoplasms: clinicopathologic study of 116 cases with analysis of factors predicting recurrence. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(10):1425-1439.
9. Yantiss R, Shia J, Klimstra D, Hahn H, D Odze R, Misdraji J. Prognostic significance of localized extra-appendiceal mucin deposition in appendiceal mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2009 Feb;33(2):248-55.
10. Singhi AD, Davison JM, Choudry HA et al (2014) GNAS is frequently mutated in both low-grade and high-grade disseminated appendiceal mucinous neoplasms but does not affect survival. *Hum Pathol* 45:1737–1743
11. Hara K, Saito T, Hayashi T et al (2015) A mutation spectrum that includes GNAS, KRAS and TP53 may be shared by mucinous neoplasms of the appendix. *Pathol Res Pract* 211:657–6647- Liu X, Mody K, de Abreu FB et al (2014) Molecular profiling of appendiceal epithelial tumors using massively parallel sequencing to identify somatic mutations. *Clin Chem* 60:1004–1011
12. LaFramboise WA, Pai RK, Petrosko P et al (2019) Discrimination of low- and high-grade appendiceal mucinous neoplasms by targeted sequencing of cancer-related variants. *Mod Pathol*
13. Tsai JH, Yang CY, Yuan RH, Jeng YM (2019) Correlation of molecular and morphological features of appendiceal epithelial neoplasms. *Histopathology* 75:468–477
14. Liao X, Vavinskaya V, Sun K et al (2019) Mutation profile of high grade appendiceal mucinous neoplasm. *Histopathology* 76:461– 469
15. Yuka Yanai, Tsuyoshi Saito, Takuo Hayashi, et al. Molecular and clinicopathological features of appendiceal mucinous neoplasms. *Virchows Archiv*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02906-5>
16. <https://documents.cap.org/protocols/cp-gilower-appendix-20-4100.pdf>

17. Cuatrecasas M, Gorostiaga I, Riera C, Saperas E, Llorc G, Costa I, Matias-Guiu X, Carrato C, Navarro M, Pineda M, Dueñas N, Brunet J, Marco V, Trias I, Busteros JI, Mateu G, Balaguer F, Fernández-Figueras MT, Esteller M, Musulén E. Complete Loss of EPCAM Immunoexpression Identifies EPCAM Deletion Carriers in MSH2-Negative Colorectal Neoplasia. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 29;12(10):2803. doi: 10.3390/cancers12102803. PMID: 33003511; PMCID: PMC7599495.

# Clasificación histológica del cáncer gástrico y síndromes hereditarios de predisposición al cáncer gástrico

**Carolina Martínez Ciarpaglini<sup>1</sup>, Miriam Cuatrecasas<sup>2</sup>, Mar Iglesias<sup>3</sup>**

1. *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico de Valencia.*
2. *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic de Barcelona.*
3. *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital del Mar de Barcelona.*

En este capítulo se pretende repasar la clasificación histológica del cáncer gástrico y hacer hincapié en los síndromes hereditarios asociados a esta neoplasia.

Los tumores gástricos, según la definición de la AJCC, corresponden a todos aquellos cuyo epicentro se encuentra a más de 2 cm de la unión gastroesofágica. Aquellos que se encuentren a una distancia igual o inferior a 2 cm de la misma, deben ser considerados y clasificados según las guías de cáncer esofágico.

El cáncer gástrico (CG) ocupa el quinto lugar en incidencia y es tercer cáncer en mortalidad en todo el mundo, con una tasa de supervivencia global a 5 años < 25%. Los diferentes subtipos histológicos se reconocen por distintas características morfológicas, moleculares, etiológicas, clínicas y epidemiológicas. Por ello, el CG se considera una enfermedad heterogénea.

En los últimos años, la incidencia del CG se ha modificado: los tumores de localización no-cardial (o distales), relacionados con la infección por *H. pylori*, están disminuyendo, mientras que la incidencia de tumores cardiales (o proximales) se encuentra en aumento.

## ETIOLOGÍA

En la actualidad, se considera que la mayoría de los cánceres gástricos esporádicos se deben a una inflamación crónica mantenida en el tiempo, con continua reparación epitelial y su etiología es característicamente ambiental, generalmente relacionada con la infección por *H. pylori*. La infección crónica por *H. pylori* se reconoce como la principal causa de CG no cardial (distal) (HR: 5.9 en 10 años de infección).

Si bien la mayoría de los GC son esporádicos, en el 10% de los casos se ha demostrado agregación familiar. 1-3% de todos los cánceres gástricos están asociados con síndromes hereditarios de predisposición genética al cáncer como poliposis adenomatosa familiar (mutación APC), CG difuso hereditario (mutaciones CDH1 / pérdida de heterocigosidad), adenocarcinoma gástrico y poliposis proximal gástrica (GAPPS) y CG intestinal familiar.

Las lesiones precursoras de CG son la metaplasia intestinal (MI) y la atrofia gástrica. Los pacientes con MI gástrica pueden tener un riesgo hasta 10 veces mayor de CG que la población general. Si se

dispone de las técnicas especiales necesarias para determinar el subtipo de MI (según la clasificación de OLGIM) se recomienda que éste se indique en el informe de anatomía patológica, ya que la MI intestinal incompleta tiene mayor riesgo de progresión a CG, especialmente en pacientes con antecedentes familiares de CG.

La displasia gástrica está relacionada con un mayor riesgo de CG (el 6% de los pacientes con displasia de alto grado progresa a cáncer en 5 años) y con mayor posibilidad de CG sincrónico.

El 5-10% de los CG están asociados con la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB), especialmente en tumores localizados en cardias y fundus.

El tabaquismo se asocia con un mayor riesgo de CG proximal (HR 2,86) y distal (HR 2,04). Otros factores de riesgo propuestos son la dieta (sal, carnes en conserva, café), bajo nivel socioeconómico, obesidad (el índice de masa corporal superior a 25 kg/m se asocia a un incremento de riesgo de 1,13 de desarrollar CG), anemia perniciosa (riesgo de CG 6,9%), cirugía gástrica previa, raza/etnia (mayor riesgo en asiáticos y afroamericanos) y grupo sanguíneo A, entre otros. El consumo excesivo de alcohol se ha señalado como un factor de riesgo de CG, sin embargo, la información disponible en este sentido, es contradictoria.

## DIAGNÓSTICO ENDOSCÓPICO

El diagnóstico se realiza de forma rutinaria en la biopsia endoscópica. En el caso de una úlcera gástrica maligna, se deben realizar al menos 7 biopsias de los bordes de la úlcera y la base. La obtención de biopsias representativas de casos con patrón de linitis plástica puede ser difícil porque esta condición se asocia con infiltración de la submucosa y/o muscularis propia del estómago, lo que reduce el rendimiento de las biopsias de la mucosa.

Según la clasificación de Paris, el CG superficial o «*early gastric cancer*» se clasifica como «0»:

- 0-I: Polipode: pedunculado (0-Ip) o sésil (0-Is).
- 0-II: No-polipode: superficial elevado (0-IIa), plano (0-IIb) o superficial deprimido (0-IIc).
- 0-III: No-polipode: excavado (ulcerado).

Las lesiones tipo 0-I y 0-III presenta frecuentemente infiltración submucosa, por lo que la resección endoscópica no es el tratamiento ideal en estos pacientes.

En ausencia de enfermedad metastásica, la ecografía endoscópica con o sin PAAF está indicada para la estadificación local-regional: para determinar el grado de invasión de la pared (pT1-2, pT3-4) y para evaluar los ganglios linfáticos regionales (pN).

Se recomienda la laparoscopia con o sin lavados peritoneales para detectar células malignas en todos los casos de CG en estadio clínico IB-III potencialmente reseccables, para excluir enfermedad metastásica oculta radiológicamente. Se dispone del protocolo recomendado en la Edición del 2017 del Libro Blanco de la SEAP. En caso de demostrar enfermedad metastásica macroscópica o microscópica (en la citología) el estadio clínico y patológico será IV.

## HALLAZGOS MACROSCÓPICOS

Por lo general, el CG se presenta como una masa ulcerada. En otros casos, la forma de presentación puede ser una úlcera gástrica que no cicatriza.

El CG difuso se caracteriza por un patrón de crecimiento infiltrativo conocido como «linitis plástica». En estos casos, las células neoplásicas penetran profundamente en la pared gástrica evocando una intensa reacción desmoplásica y provocando un aplanamiento difuso de pliegues



gástricos y una pared rígida engrosada. El término «linitis plástica» solo debe usarse para la descripción de las características macroscópicas del tumor.

## **CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA**

El sistema de clasificación histológica recomendado corresponde al definido por la OMS, aunque una de las más utilizadas hasta ahora ha sido la clasificación de Lauren. Sin embargo, por un lado, existe una mayor complejidad en la clasificación de las neoplasias mediante el sistema recomendado de la OMS y una menor experiencia utilizando esta clasificación histológica y, por otro lado, la clasificación de Lauren sigue siendo vigente y ampliamente utilizada, por lo que se recomienda que siga constando en el informe diagnóstico de anatomía patológica. De esta forma obtenemos información sobre la equivalencia entre los dos sistemas de clasificación y no perdemos datos epidemiológicos en este momento de transición entre las nomenclaturas.

### **Clasificación de la OMS**

Comprende una clasificación más detallada basada en la morfología y en algunos casos, en el perfil de expresión de los tumores.

- Adenocarcinoma tubular
- Carcinoma pobremente cohesivo con fenotipo de células en anillo de sello.
- Carcinoma pobremente cohesivo, NOS.
- Adenocarcinoma mixto
- Adenocarcinoma papilar
- Adenocarcinoma micropapilar
- Adenocarcinoma mucinoso
- Adenocarcinoma hepatoide
- Carcinoma adenoescamoso
- Carcinoma de células escamosas
- Carcinoma indiferenciado
- Carcinoma con estroma linfoide
- Adenocarcinoma con diferenciación enteroblástica
- Adenocarcinoma de tipo glándula fúndica

### **Clasificación de Lauren**

- Tipo difuso:
  - Cohesión entre las células neoplásicas escasa o ausente.
  - Compuesto por pequeños grupos o filas de células dispersas. No suelen formar glándulas, aunque pueden presentar un escaso componente de estructuras tubulares mal definidas.
  - Las células neoplásicas suelen mostrar morfología atípica con contornos nucleares irregulares y citoplasma eosinófilo en cantidad variable.
  - En algunos casos existe un componente variable de células que presentan morfología en «anillo de sello».
  - La definición de las células en anillo de sello es exclusivamente morfológica: son células que muestran un núcleo maligno hiper cromático excéntrico y amplia mucina citoplasmática que parece ópticamente clara/vacía en la tinción HE.

- Tipo intestinal:
  - Compuesto por estructuras tubulares o glandulares similares al adenocarcinoma de intestino grueso.
  - Las células neoplásicas suelen contener vacuolas de mucina apicales.
  - Suelen crecer formando frentes cohesivos y suelen presentar un crecimiento exofítico macroscópicamente.
- Tipo mixto
- Tipo indiferenciado

Las principales diferencias y similitudes entre ambas clasificaciones son:

- El subtipo intestinal de Lauren se corresponde con las categorías papilar y tubular bien y moderadamente diferenciadas de la clasificación de la OMS.
- El subtipo difuso de Lauren se corresponde con la categoría pobremente cohesiva de la clasificación de la OMS.
- La clasificación de la OMS separa el carcinoma pobremente cohesivo en dos categorías:
  - Carcinoma pobremente cohesivo con fenotipo de células en anillo de sello: comprende tumores compuestos de forma exclusiva o predominante por células con morfología en anillo de sello.
  - Carcinoma pobremente cohesivo sin tipo especial o *not otherwise specified* (NOS): comprende aquellos casos compuestos por células de aspecto variable, que en algunos casos pueden parecer histiocitos o linfocitos, y en otros pueden mostrar marcado pleomorfismo, con células de aspecto bizarro. Puede haber un componente minoritario de células en anillo de sello.
  - Cabe remarcar que existe un reciente Consenso Internacional que sugieren que se utilice el término pobremente cohesivo de células anillo de sello cuando más del 90% de la neoplasia presenta esta morfología ya que estos casos parecen estar relacionados con mejor pronóstico. Este criterio aún no está reflejado en la actual clasificación de la OMS.
- Ambas clasificaciones reconocen un subtipo mixto, generalmente compuesto por casos con componente intestinal/tubular o papilar y difuso/pobremente cohesivo. Actualmente, no existe un límite con respecto al porcentaje de cada componente para que un tumor se clasifique como adenocarcinoma mixto.
- La mayoría de los casos indiferenciados en la clasificación de Lauren comprenden casos clasificados como adenocarcinomas tubulares pobremente diferenciados según la clasificación de la OMS.
- La clasificación de la OMS incluye una serie de variantes menos frecuentes como micropapilar, hepatoide, rico en estroma linfoide, entre otras, que no están definidas en la clasificación de Lauren, la mayor parte de las cuales se consideran como indiferenciadas dentro de dicha clasificación.

A modo informativo remarcar que existe una clasificación adicional relacionada parcialmente con las previas, la denominada «Clasificación de Lauren modificada» que establece subtipos basados en la histología, en la ubicación del tumor y en su asociación con atrofia preexistente en la mucosa circundante. Esta clasificación parece mejorar el valor clínico predictivo de la clasificación histológica.

## FACTORES PRONÓSTICOS

El factor pronóstico más importante en CG es el estadio clínico. La tasa de supervivencia a 5 años del CG superficial puede superar el 95%. En los pacientes sometidos a cirugía curativa, la tasa de supervivencia a 5 años se encuentra entre 20 y 40%, mientras que en los pacientes no operados (estadios avanzados) disminuye al 3-5%.

La inestabilidad de microsátélites (IMS) y la positividad para VEB se asocian a mejor pronóstico. La presencia de VEB y la IMS son mutuamente excluyentes.

La relevancia pronóstica de la clasificación histopatológica del CG sigue siendo controvertida, probablemente por la alta heterogeneidad, la falta de estandarización o la baja reproducibilidad de los criterios histopatológicos. La clasificación de Lauren modificada parece mejorar el valor pronóstico.

## SÍNDROMES HEREDITARIOS DE PREDISPOSICIÓN AL CÁNCER GÁSTRICO

### Cáncer gástrico difuso hereditario (*Hereditary diffuse gastric cancer, HDGC*)

El HDGC es un síndrome hereditario, autosómico dominante caracterizado por una alta prevalencia de CG difuso según la clasificación de Lauren y carcinoma lobulillar de mama. Se estima que esta condición afecta a 5 a 10 de cada 100 000 nacidos vivos en el mundo. Esta enfermedad está causada por mutaciones inactivadoras, y en menor medida deleciones, del gen de la E-cadherina (CDH1) o en el gen catenina-alfa (CTNNA1) detectables en el 14%–40% de las familias. Actualmente se está estudiando el papel de las alteraciones germinales en los genes de recombinación homóloga del DNA como una causa potencial de HDGC en los individuos sin mutación de CDH1 o CTNNA1.

Se recomienda el estudio germinal de CDH1 en pacientes que cumplan los siguientes criterios clínicos:

- Criterios familiares (en todos los casos debe tratarse de familiares de primer o segundo grado):
  - Dos o más familiares con CG independientemente de la edad del diagnóstico, uno de ellos al menos de tipo histológico difuso.
  - Un caso o más de familiares con CG de tipo difuso diagnosticado a cualquier edad, o de cáncer lobulillar de mama diagnosticado antes de los 70 años en diferentes miembros de la familia.
  - Dos o más casos de cáncer lobulillar de mama diagnosticados antes de los 50 años en dos miembros de una misma familia.
- Criterios individuales:
  - CG difuso en individuos menores de 50 años
  - CG difuso en cualquier edad en individuos pertenecientes a la etnia maorí.
  - CG difuso en individuos de cualquier edad con historia personal, o familiares de primer grado, con labio hendido o paladar hendido.
  - Historia de CG difuso y carcinoma lobulillar de mama, ambos diagnosticados antes de los 70 años de edad.
  - Carcinoma lobulillar de mama bilateral diagnosticado antes de los 70 años de edad.
  - CG difuso con células en anillo de sello in situ o pagetoide en individuos de menos de 50 años de edad.

En todos los casos el tipo histológico debe estar confirmado. Cuando el estudio germinal de CDH1 es negativo, se debe considerar estudiar CTNNA1.

Utilizando estos criterios de selección, se estima que el riesgo acumulado de desarrollo de cáncer gástrico es de alrededor de 42% en hombres y 33% en mujeres. El riesgo de carcinoma lobulillar de mama varía entre 39 y 55% según la serie consultada.

De forma similar al CG difuso esporádico, el HDGC avanzado suele presentarse macroscópicamente con patrón de linitis plástica. En el estudio histopatológico, las células atípicas son poco cohesivas e infiltran la pared gástrica con patrón de crecimiento infiltrativo y difuso formando nidos, cordones, estructuras microglandulares y pequeños lagos de mucina. En estos casos suele haber un componente variable de células en anillo de sello.

En los pacientes portadores de alteraciones en el gen CDH1, pertenecientes a familias con diagnóstico de HDGC, se debe aconsejar sobre el beneficio de la realización de la gastrectomía profiláctica, independientemente de la ausencia de lesiones en el estudio endoscópico. Siempre que sea posible esta cirugía se debe realizar en adultos entre los 20-30 años de edad.

El estudio de las piezas de gastrectomía profiláctica debe realizarse siguiendo los protocolos específicos para ello. A modo resumen, el *gold standard* para el correcto estudio de estas piezas incluye una evaluación macroscópica detallada con mapeo de la mucosa e inclusión total de la pared gástrica. El número de bloques derivados de este tipo de piezas suele oscilar entre 120-270, a los que hay que sumar la recomendación de realizar tres secciones histológicas para tinción HE de cada uno de los bloques, lo que genera un significativo incremento de la carga laboral, muchas veces incompatible con la rutina de trabajo en los laboratorios de anatomía patológica. Por este motivo, se acepta en casos excepcionales una modificación del protocolo en función de los recursos disponibles, siempre teniendo en cuenta que, en el caso de no encontrar lesiones, será necesario volver a la pieza quirúrgica y ampliar la toma de muestras (ver Van der Post RS, y col.).

El despistaje de cáncer de mama en pacientes con HDGC debe iniciarse a los 30 años de edad. Se aconseja la realización de un estudio de resonancia magnética mamaria anual hasta los 50 años de edad o más, en función de cada caso.

### **Síndrome de adenocarcinoma gástrico y poliposis proximal gástrica (*Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach, GAPPS*)**

GAPPS es un síndrome hereditario de predisposición a cáncer gástrico descrito por primera vez en 2012. Las tres características claves de esta entidad son la presencia de múltiples pólipos glandulares de tipo fúndico, algunos de ellos hiperplásicos y otros adenomatosos, el desarrollo de adenocarcinomas de tipo intestinal según la clasificación de Lauren gástrico y el patrón hereditario autosómico dominante.

Los pólipos de glándulas fúndicas esporádicos son el tipo más común, y representan aproximadamente el 70% de todos los pólipos gástricos en muestras endoscópicas. Sin embargo, los pólipos de glándulas fúndicas en el contexto del GAPPS pueden progresar a displasia y adenocarcinoma. Por este motivo, es importante para el clínico distinguir ambos tipos de pólipos, y separar a los pacientes que ameritan una historia y un estudio genético detallado, de aquellos con una patología banal, que no necesitan someterse a estudios adicionales.

En la publicación inicial de la descripción de la entidad, Worthley y col., recomiendan una serie de criterios clínicos para el diagnóstico de esta entidad:

- Presencia de pólipos gástricos restringidos a la zona del cuerpo y fundus gástrico, sin evidencia de pólipos colorrectales o duodenales
- Más de 100 pólipos en estómago proximal o más de 30 pólipos en familiares de primer grado de otro paciente con criterios de GAPPS
- Histología de pólipos de glándulas fúndicas, algunos de ellos con zonas de displasia (o miembros de la familia con pólipos de glándulas fúndicas displásicos o con adenocarcinoma)

- Patrón de herencia autosómico dominante.

En el año 2016, se demuestra por primera vez la alteración genética causal de la enfermedad, una mutación puntual en el promotor 1B del gen APC. Alteraciones similares se han descrito en raros casos de poliposis adenomatosa familiar (*familial adenomatous polyposis*, FAP). Este es uno de los motivos por los que merece especial atención el diagnóstico diferencial con la FAP atenuada que, a diferencia del GAPPs donde no hay pólipos intestinales, se caracteriza por la presencia de cientos o miles de pólipos adenomatosos en colon y recto, con el casi inevitable desarrollo de cáncer colorrectal.

### **Cáncer gástrico intestinal familiar (*familial intestinal gastric cancer*, FIGC).**

Es una condición hereditaria, de carácter autosómico dominante que causa una importante predisposición al desarrollo de CG de tipo intestinal según la clasificación de Lauren, no asociado a poliposis. De acuerdo con lo estipulado en el «*International Gastric Cancer Linkage Consortium*» de 1999, los criterios para el diagnóstico de esta entidad varían en función de la incidencia del CG. En zonas con alta incidencia de CG los criterios son análogos a los criterios de Ámsterdam para el Síndrome de cáncer colorrectal hereditario no polipósico:

- Al menos tres familiares con CG intestinal, uno de ellos familiar de primer grado de los otros dos
- Al menos dos generaciones sucesivas afectas
- Uno de los individuos afectados debe haber sido diagnosticado antes de los 50 años.

En países con una baja incidencia de cáncer gástrico, los criterios son los siguientes:

- Al menos dos familiares de primer grado con CG intestinal, o
- Dos familiares de segundo grado con CG intestinal, uno de ellos diagnosticado con menos de 50 años, o
- Tres o más familiares con diagnóstico de CG intestinal a cualquier edad.

El FIGC continúa siendo una entidad de difícil reconocimiento en la práctica diaria, especialmente porque hasta el momento no existe una asociación clara con ninguna alteración genética que explique el desarrollo de la enfermedad. En una de las series más amplias de FIGC descritas en la literatura, Carvalho y col. realizan un amplio estudio genómico donde comparan pacientes con CG intestinal esporádico con aquellos con criterios clínicos de FIGC, negativos para CDH1 y para el promotor 1B del gen APC. Uno de los hallazgos más destacables de este estudio, fue la detección de variantes comunes de TP53 en línea germinal en más del 50% de los pacientes con FIGC, a diferencia de lo que ocurre en pacientes con CG intestinal esporádico donde solo 11% presentaron dichas variantes. Los autores concluyen que FIGC es una entidad poligénica y describen alteraciones germinales y somáticas en un cluster de genes frecuentemente afectados en FIGC y que lo distinguen de su contraparte esporádica: TP53, BRCA2, ATM, FOXF1, FHIT, SDHB, MSH6, CTNNA1 y PXN. En este estudio, el CG esporádico se asoció significativamente a alteraciones somáticas en un grupo distinto de genes: BRCA2, ATM, FOXF1, SDHB, MSH6, CTNNA1 y PXN.

### **Bibliografía**

1. Joana Carvalho, et al. Redefinition of familial intestinal gastric cancer: clinical and genetic perspectives. *J Med Genet* 2020;0:1–11.

2. Van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet.* 2015;52(6):361-74.
3. Gullo I, van der Post RS, Carneiro F. Recent advances in the pathology of heritable gastric cancer syndromes. *Histopathology.* 2021;78(1):125-147.
4. Caldas C, Carneiro F, Lynch T, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet* 1999;36:873–80.
5. Li J, Woods SL, Healey S, et al. Point Mutations in Exon 1B of APC Reveal Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach as a Familial Adenomatous Polyposis Variant. *Am J Hum Genet.* 2016;5;98(5):830-842.
6. Cho S-J, Choi IJ, Kook M-C, et al. Staging of intestinal- and diffuse-type gastric cancers with the OLGA and OLGIM staging systems. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2013;38:1292–302.
7. Hyuk Yoon, Nayoung Kim. Diagnosis and Management of High Risk Group for Gastric Cancer. *Gut and Liver*, Vol. 9, No. 1, January 2015, pp. 5-17
8. Smyth E, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Arnold D. ESMO Guidelines Committee. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2016 Sep;27:v38-v49.
9. Nagtegaal I, Odze R, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. WHO Classification of Tumours Editorial Board. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive System. *Histopathology.* 2020 Jan;76(2):182-188.
10. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Digestive system tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 1). Gastric cancer.
11. American joint committee on cancer (AJCC) Cancer Staging Manual. TNM classification (8th ed.). 2016. Stomach. P.203-220.
12. Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol.* 2019;14(1):26-38.
13. Mariette C, Carneiro F, Grabsch H, Van der Post R, Allum W, de Manzoni G, et al. Consensus on the pathological definition and classification of poorly cohesive gastric carcinoma. *Gastric Cancer.* 2019 Jan;22(1):1-9.
14. Henson D, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. *Arch Pathol Lab Med.* 2004 Jul;128(7):765-70.
15. Luu C, Thapa R, Woo K, Coppola D, Almhanna K, Pimiento J, et al. Does histology really influence gastric cancer prognosis? *J Gastrointest Oncol.* 2017 Dec;8(6):1026-1036.
16. Mönig S, Baldus S, Collet P, Zirbes T, Bollschweiler E, Thiele J, et al. Histological grading in gastric cancer by Goseki classification: correlation with histopathological subtypes and prognosis. *Anticancer Res.* Jan-Feb 2001;21:617-20.
17. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424.
18. Plummer M, Franceschi S, Vignat J, Forman D, de Martel C. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer.* 2015 Jan 15;136(2):487-90.

19. ASGE Standards of Practice Committee; Evans J, Chandrasekhara V, Chathadi K, Decker G, Early D, et al. The role of endoscopy in the management of premalignant and malignant conditions of the stomach. *GastrointestEndosc*. 2015 Jul;82(1):1-8.
20. Banks M, Graham D, Jansen M, Gotoda T, Coda S, di Pietro M, et al. British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of patients at risk of gastric adenocarcinoma. *Gut*. 2019 Sep;68(9):1545-1575.
21. Martinez-Ciarpaglini C, Fleitas-Kanonnikoff T, Gambardella V, Llorca M, Mongort C, Mengual R, et al. Assessing molecular subtypes of gastric cancer: microsatellite unstable and Epstein-Barr virus subtypes. Methods for detection and clinical and pathological implications. *ESMO Open*. 201927(3):e000470.
22. Mathiak M, Warneke V, Behrens H, JHaag J, Böger C, Krüger S, et al. Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited: Urgent Need for Standardization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017;25(1):12-24.
23. Dong J, Thrift A. Alcohol, smoking and risk of oesophago-gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017 Oct;31(5):509-517.
24. Rota M, Pelucchi C, Bertuccio P, Matsuo K, Zhang Z, Ito H, et al. Alcohol consumption and gastric cancer risk-A pooled analysis within the StoP project consortium. *Int J Cancer*. 2017 15;141(10):1950-1962.
25. ZheyuSong Z, Wu Y, Yang J, Yang D, Fang X. Progress in the treatment of advanced gastric cancer. *Tumour Biol*. 2017;39(7):1010428317714626
26. Pimentel-Nunes P, Dinis-Ribeiro M, Ponchon T, Repici A, Vieth M, De Ceglie A, et al. Endoscopic submucosal dissection: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy*. 2015;47(9):829-54.
27. Asplund J, Kauppila J, Mattsson F, Lagergren J. Survival Trends in Gastric Adenocarcinoma: A Population-Based Study in Sweden. 2018;25(9):2693-2702.
28. Mönig S, Baldus S, Collet P, Zirbes T, Bollschweiler E, Thiele J, Dienes H, Hölscher A. Histological grading in gastric cancer by Goseki classification: correlation with histopathological subtypes and prognosis. *Anticancer Res*. 2001;21(1B):617-20.
29. Zhao L, Wang J, Zhao Y, Chen X, Yang K, Chen X, et al. Superiority of Tumor Location-Modified Lauren Classification System for Gastric Cancer: A Multi-Institutional Validation Analysis. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(11):3257-3263.
30. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.
31. Shah M, Khanin R, Tang L, Janjigian Y, Klimstra D, Gerdes H, Kelsen D. Molecular classification of gastric cancer: a new paradigm. *Clin Cancer Res*. 2011 1;17(9):2693-701.





# RECOMENDACIONES DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CITOLOGÍA



# Terminología en citología por punción-aspiración de tiroides

**Belén Lloveras Rubio<sup>1</sup>, Ignacio Sánchez Güerri<sup>2</sup>, Sonsoles Aso<sup>3</sup>**

1. *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital del Mar. Barcelona.*

2. *Servicio de Anatomía Patológica. Hospital de Sant Pau. Barcelona.*

3. *Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Virgen de Salud. Toledo.*

## INTRODUCCIÓN

La Sociedad Española de Citología recomienda utilizar nomenclatura estándar en la elaboración de los informes citológicos diagnósticos principalmente para facilitar la comunicación con los clínicos, radiólogos y cirujanos, u otros profesionales como por ejemplo epidemiólogos o investigadores básicos. Por ello, consideramos adecuado utilizar la terminología de Bethesda para PAAF de tiroides, con categorías bien definidas, que permite una mejor reproducibilidad entre citopatólogos.

Existen sistemas de nomenclatura elaborados por grupos de expertos en distintas áreas del diagnóstico citológico, en distintas especialidades (Sistema Bethesda en citología cervicovaginal, Sistema Milán en glándula salival, Sistema Paris en citología orina), que se han elaborado con el mismo objetivo de estandarizar los resultados citológicos aprobadas por las distintas sociedades científicas y que además van siendo sometidas a actualizaciones periódicas en función del avance de los conocimientos científicos.

En este capítulo del libro blanco nos basamos en la segunda edición del Sistema Bethesda (2017) que ofrece una terminología estandarizada en citología, permitiendo una mejora tanto en el diagnóstico como en el manejo terapéutico multidisciplinar del nódulo tiroideo. En general las distintas clasificaciones y sistemas de nomenclatura recomiendan unos términos claros y con utilidad clínica, pero la mayoría están escritos en inglés y las traducciones o adaptaciones no siempre son del todo correctas. Hay que recalcar que no es objetivo de este texto el reproducir o substituir el texto original publicado, mucho más completo y con descripción de las características microscópicas de las distintas categorías diagnósticas [1,2,3,4].

La punción-aspiración con aguja fina (PAAF) de los nódulos tiroideos ha permitido limitar el número de intervenciones quirúrgicas en pacientes con nódulos benignos y ha aumentado significativamente la tasa de diagnósticos de malignidad en los pacientes operados, lo que significa una disminución de operaciones evitables. Anteriormente a que la PAAF tiroidea se utilizara como prueba de rutina, el porcentaje de nódulos tiroideos extirpados quirúrgicamente que en el estudio histológico se confirmaban como malignos era del 14%, mientras que actualmente es de aproximadamente el 30%. En la última guía de la Sociedad Americana de tiroides (ATA2015), la realización de PAAF en el manejo del nódulo tiroideo es considerada una recomendación fuerte [5].

A modo de breve historia, desde la introducción de la PAAF de tiroides a lo largo del tiempo se fueron desarrollando distintos términos citológicos y estilos de informes, que generalmente permitían la comunicación entre profesionales del mismo centro pero que eran poco transferibles a otros equipos. En octubre del año 2007 el Instituto Nacional del Cáncer de los EEUU (NCI) organizó la

«Conferencia sobre el estado de la ciencia sobre aspiración con aguja fina tiroidea del NCI», en Bethesda. Allí se reunieron expertos en PAAF de tiroides (A. Abati, E. Cibas, MD y S. Mandel y ZW. Baloch) que iniciaron el proceso de revisión de artículos publicados en inglés sobre el tema desde 1995. Se diseñó una web y se empezó a preparar la conferencia, donde se presentó el primer borrador, en la que participaron 154 profesionales (patólogos, endocrinólogos, radiólogos, cirujanos), siguiendo como modelo la reunión de Bethesda donde se estableció la terminología de citología cervical en 1988. El nuevo sistema para informar citologías por PAAF de tiroides estableció una clasificación en 6 categorías diagnósticas como se detallará más adelante, con unos riesgos de malignidad asociados y unas recomendaciones de seguimiento o terapéuticas. Posteriormente, se elaboró un atlas que coordinó el Prof. Syed Ali con un gran número de participantes que ayudó a entender y difundir el uso de dicha nomenclatura, con el resultado de una gran aceptación internacional [1].

En la revisión del año 2017, tras la introducción de la clasificación en la mayoría de laboratorios de citología, se consideró que las 6 categorías diagnósticas eran una herramienta útil y pudo «actualizarse» el riesgo de malignidad por categoría gracias a las experiencias clínicas recogidas en la literatura desde el año 2010. Por otra parte, la aparición de una nueva entidad histológica (NIFTP, Neoplasia folicular no invasiva con características nucleares de carcinoma papilar), así como la posibilidad de utilizar pruebas moleculares en citología, también han tenido impacto en el diagnóstico citológico y en la clasificación, tal como se explicará. Esta última revisión la realizó un grupo de expertos (16 citopatólogos y un endocrinólogo) y se presentó en un simposio moderado por los Dres. S. Ali y P. Vielh en el Congreso de la Academia Internacional de Citología de Yokohama (Japón) en mayo del 2016 antes de su publicación [2,3,4,5,6,7,8].

#### **CATEGORÍAS DE BETHESDA PARA INFORMAR CITOLOGÍAS DE TIROIDES OBTENIDAS POR PUNCIÓN-ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA (2017)**

El sistema de clasificación de resultados para informar citologías de tiroides se basa en seis Categorías Diagnósticas Generales, cada una de ellas con un determinado riesgo de malignidad (RM) asociado. El objetivo principal de la Categoría Diagnóstica General es dar un mensaje claro que conlleve una actuación clínica bien definida, en función del riesgo de malignidad y que principalmente se resume en: operar (lobectomía/tiroidectomía), seguimiento o repetición de la prueba. Además de la Categoría General, el informe debería incorporar una subcategoría diagnóstica que defina mejor los hallazgos citológicos y concrete mejor el diagnóstico más probable de cada paciente. **Se recomienda no utilizar únicamente el número de la categoría**, ya que lo más importante es el concepto (no diagnóstico, benigno, indeterminado, sospechoso de malignidad, maligno) y además conlleva riesgo de error en la interpretación [3, 4].

## **Categorías diagnósticas generales del Sistema Bethesda (2017)**

### **Categoría I:** Muestra no diagnóstica o insatisfactoria

- Contenido de quiste
- Muestra acelular o con celularidad escasa (insuficiente)
- Otras causas (material hemático, etc.)
- *Riesgo de malignidad: 5-10%*

### **Categoría II:** Citología benigna

- Compatible con nódulo folicular benigno (nódulo coloide, nódulo hiperplásico)
- Compatible con tiroiditis linfocítica (Hashimoto si clínica compatible)
- Compatible con tiroiditis subaguda (granulomatosa)
- Otras entidades
- *Riesgo de malignidad: 0-3%*
- 

### **Categoría III:** Atipia de significado indeterminado o lesión folicular de significado indeterminado

- Se consideran sinónimos y se aconseja utilizar sólo uno de los términos en cada laboratorio.
- *Riesgo de malignidad: 6-18%*

### **Categoría IV:** Neoplasia folicular o Sugestivo de neoplasia folicular

- Especificar si se trata de células de Hürthle (oncocíticas)
- *Riesgo de malignidad: 10-40%*

### **Categoría V:** Sospechoso de malignidad

- Sospechoso de carcinoma papilar
- Sospechoso de carcinoma medular
- Sospechoso de metástasis
- Sospechoso de linfoma
- Otros
- *Riesgo de malignidad: 45-60%*

### **Categoría VI:** Maligno

- Carcinoma papilar
- Carcinoma poco diferenciado
- Carcinoma medular
- Carcinoma indiferenciado (anaplásico)
- Carcinoma escamoso
- Carcinoma de características mixtas (especificar)
- Metástasis
- Linfoma
- Otros
- *Riesgo de malignidad: 97-99%*

### **Categoría I: Muestra no diagnóstica o insatisfactoria**

Lo primero a evaluar es siempre la calidad de la muestra y en el caso de que el patólogo considere que la muestra es insuficiente para diagnóstico o no valorable, el clínico deberá considerar el repetir la prueba.

Las causas más frecuentes suelen ser un exceso de material hemático que oculta las células propias del tiroides, la mala preservación de las características microscópicas por defectos en la extensión o procesamiento, o simplemente un número insuficiente de células foliculares. La recomendación señala que una muestra es suficiente si presenta un mínimo de 6 grupos de 10 células foliculares o más, aunque este criterio está en revisión [7]. Existen algunas excepciones a esta regla, por ejemplo, si se observa abundante coloide se considera que se trata de un nódulo macrofolicular probablemente benigno. En caso de que sea posible dar un diagnóstico, por ejemplo, de tiroiditis, o cuando se observe atipia, por definición la muestra debe considerarse adecuada.

En el caso de que una PAAF de tiroides solo presente material correspondiente al contenido de una lesión quística (macrófagos, detritos) la muestra debe ser considerada también insuficiente, si bien, el significado clínico depende en gran medida de la imagen ecográfica. Si la lesión es totalmente quística y no existen signos preocupantes el clínico puede asumir que se trata de una lesión benigna, pero si por el contrario la ecografía es dudosa debería repetirse la punción.

El riesgo de malignidad (RM) de la Categoría I es difícil de calcular pues la mayoría de estos pacientes no son operados. Entre los nódulos extirpados el RM oscila entre 9 y 32%, aunque evidentemente éstos representan un subgrupo que clínica y/o ecográficamente suelen presentar un mayor grado de sospecha, lo que hace indicada la intervención. El valor del RM tras extrapolación del riesgo general de malignidad es del 5-10%.

La recomendación general es repetir la punción sin necesidad de esperar semanas como se había recomendado previamente, y en la mayoría de casos la nueva muestra será diagnóstica (60-80%). Para disminuir el número de casos con material insuficiente es recomendable realizar una evaluación inmediata del material obtenido por parte del patólogo o citotecnólogo o hacer un mínimo de 3 pases. La realización de bloque celular puede ser de ayuda en algunos casos.

### **Categoría II: Citología benigna**

Es la categoría más frecuente (60-70%) dado que la mayoría de nódulos tiroideos son benignos, la tasa de falsos negativos se mantiene muy baja (<3%). Se recomienda el término «Benigno» frente al «Negativo para células malignas» y la actitud clínica a seguir después de este diagnóstico es seguimiento clínico.

La lesión más frecuente en esta categoría es un nódulo de tipo hiperplásico, que puede ser denominado «Nódulo folicular benigno» pero también puede ser una tiroiditis linfocítica o alguna entidad menos frecuente.

### **Categoría III: Atipia de significado indeterminado (AUS) o lesión folicular de significado indeterminado (FLUS)**

Esta categoría tiene dos posibles nombres y se recomienda que cada laboratorio escoja utilizar siempre el mismo. Hay que recalcar que se consideran sinónimos y que no pueden utilizarse como si se tratara de dos subcategorías distintas que denoten diagnósticos diferentes. Cabe destacar que AUS es más versátil ya que FLUS está limitado a lesiones foliculares y no se adapta a atipias de otra naturaleza (por ejemplo, de células linfoides), sin embargo, a algunos clínicos no les gusta el término atipia por las implicaciones que conlleva. Es importante reservar esta categoría como una última opción y se recomienda que el porcentaje de casos con este diagnóstico no supere el 7-10%.

Es recomendable intentar subclasificar el tipo de atipia, en «atipia celular» y «atipia arquitectural» aunque esto no siempre es posible, y generalmente tampoco implica un cambio en la actitud clínica. El término «atipia celular», se utilizaría para los casos con alteraciones nucleares focales, o extensas pero leves, o en el caso de observar células atípicas de probable origen en la pared de un quiste. La «atipia arquitectural» se suele reservar para citologías poco celulares pero que presentan un patrón micro folicular predominante. Es evidente que estos dos tipos de atipia no se excluyen mutuamente. Otro tipo sería la «atipia de células de Hürthle» cuando la muestra no es muy celular.

El cálculo del RM de la Categoría III resulta complicado por diferentes motivos. En primer lugar, solamente se interviene una fracción pequeña de casos de esta categoría: los que presentan mayor sospecha clínica o radiológica, los que en la repetición aparece un resultado anormal o los que presentan una alteración molecular en una prueba complementaria. Los casos con citología benigna en la repetición o con una prueba molecular benigna no necesitan ser operados. Como alternativa, si se calcula el RM asumiendo que los nódulos no extirpados son benignos, también se puede dar un valor erróneo. Por los motivos mencionados, la cifra de RM se basa en una extrapolación entre los dos cálculos y los últimos datos sitúan el RM de esta categoría entre 10 y 30%, un poco superior a las primeras estimaciones. Tras la introducción del diagnóstico de NIFTP y por tanto la conversión de una neoplasia que se consideraba maligna a benigna, el RM desciende a 6-18%, ya que con frecuencia esta lesión cae en la categoría de AUS/FLUS.

La actitud más recomendada en estos pacientes es repetir la PAAF a los 3 meses, y si es posible la realización de técnicas moleculares adicionales (mutaciones de BRAF, TERT, RAS, etc.). Las recomendaciones relativas a los estudios moleculares se tratarán en otro capítulo en próximas ediciones.

En aquellos casos donde la segunda PAAF tenga la misma categoría III, será necesario la exéresis de la lesión y se valorará la realización de biopsia intraoperatoria.

#### **Categoría IV: Neoplasia folicular o sospechoso de neoplasia folicular**

Esta categoría también tiene dos nombres alternativos que deben considerarse sinónimos y cada laboratorio tiene que decidir cual utilizar de forma exclusiva. La mayoría de citopatólogos prefieren el «sugestivo de neoplasia folicular» ya que en un 35% de los casos la histología demuestra un nódulo hiperplásico y no una verdadera neoplasia. La versión del 2017 incluye unos cambios relacionados con la nueva entidad NIFTP, ya que previamente si en los extendidos se observaban cambios nucleares de carcinoma papilar no se podía utilizar esta categoría diagnóstica. La nueva versión considera que las citologías que presentan patrón folicular y cambios nucleares sutiles como agrandamiento, irregularidad de la membrana y/o cromatina clara, pueden ser incluidos en la categoría IV si no se observan papilas verdaderas ni pseudoinclusiones nucleares. Se puede incluir un comentario sobre la posibilidad de que se trate de un carcinoma papilar, variante folicular o de un NIFTP, pero advirtiendo que sólo el estudio histológico permitirá el diagnóstico definitivo de dichas entidades. En el caso de observar celularidad de características oncocíticas deberá indicarse en el diagnóstico. También se indica la posibilidad de realizar técnicas moleculares en esta categoría. [8]

#### **Categoría V: Sospechoso de malignidad**

La categoría Bethesda V, Sospechoso para malignidad, incluye todas aquellas presentaciones citológicas que sean altamente sospechosas de malignidad. Acoge los diagnósticos donde se identifican alteraciones citológicas características de una entidad patológica determinada, con limitaciones en relación a la cantidad o cualidad de dichos cambios y que por tanto es posible un diagnóstico concluyente. Asimismo, el diagnóstico de incerteza puede deberse a una muestra poco óptima, a una preservación inadecuada del material citológico, a una variante histológica infrecuente

o a una presentación citológica inusual. En el diagnóstico se debería indicar el tipo de neoplasia que se sospecha. También está indicado realizar técnicas complementarias.

La conducta terapéutica recomendada para esta categoría diagnóstica con un RM entre 50 y 75%, es la resección de la glándula tiroides, preferentemente de un modo conservador (lobectomía), cuando sea posible.

### **Categoría VI: Maligno**

La categoría VI de Bethesda significa un diagnóstico concluyente de malignidad, en la que se identifican una cantidad satisfactoria de rasgos citomorfológicos definitorios de una entidad específica. En algunos casos el estudio inmunohistoquímico del material citológico puede ayudar a realizar un diagnóstico más preciso (p.ej. calcitonina en carcinoma medular).

El manejo de una lesión diagnosticada en esta categoría implica generalmente una conducta quirúrgica ya que el riesgo de malignidad se acerca al 100%.

### **Bibliografía**

1. Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol* 2008;36(6):425-37.
2. Puztaszeri M., Rossi ED., Auger M., Baloch Z., Bishop J., Bongiovanni M. et al. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: proposed modifications and updates for the second edition from an international panel. *Acta Cytol* 2016;60(5):399-405.
3. Ali SZ, Cibas ES. The Bethesda System for reporting thyroid cytopathology. Definitions, criteria and explanatory notes. 2nd edition. Springer, 2018.
4. Ali SZ, Cibas ES. The Bethesda System for reporting thyroid cytopathology II. *Acta Cytologica* 2016;60:397-398
5. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE et al. 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2016;26(1):1-133
6. Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, et al. Nomenclature revision for encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a paradigm shift to reduce overtreatment of indolent tumors. *JAMA Oncol.* 2016;2(8):1023-1029.
7. LiVolsi V, Baloch Z. Noninvasive follicular tumor with papillary-like nuclear features a practice changer in thyroid pathology. *Arch Pathol LabMed* 2020; doi.org/10.5858/arpa.2019.0689-RA
8. Paja M., Zafón C., Iglesias C., Ugalde A., Cameselle-Teijeiro JM, Rodriguez-Carnero G, Fernandez-Seara P. et al. Rate of non-invasive follicular thyroid neoplasms with papillary-like nuclear features depends on pathologist's criteria: a multicentre retrospective Southern European study with prolonged follow-up. *Endocrine* 2021; doi:10.1007/s12020-021-02610-7
9. Renshaw AA. Histologic follow-up of nondiagnostic thyroid fine needle aspirations: implications for adequacy criteria. *Diagn Cytopathol* 2012;40 (suppl.1): E13-15.



## MODELO DE INFORME (EJEMPLO DE CATEGORÍA DIAGNOSTICA II)

**Tipo de muestra:** Punción aspiración con aguja fina de tiroides

Localización:

Ecoguiada: *Si/No*

Evaluación rápida (ROSE): *Si/No*

Resultado ER: *Suficiente / Insuficiente*

Número de pases:

### Descripción del material recibido:

\_\_ extensiones secas, \_\_ extensiones fijadas, \_\_ citología líquida, \_\_ jeringa, \_\_ lavado de aguja

### Técnicas realizadas:

Tinción de Papanicolaou: \_\_

Tinción de Giemsa: \_\_

Bloque celular: \_\_

Otras:

### Descripción microscópica:

*Opcional y debe ser coherente con el diagnóstico emitido.*

## DIAGNÓSTICO

Benigno, compatible con nódulo hiperplásico.

Categoría diagnóstica de Bethesda: II

### Resultado de las pruebas adicionales:

*Si se realizan por ejemplo inmunocitoquímica o técnicas moleculares debería incluirse el resultado en el mismo informe (aunque sea posteriormente como informe adicional)*

**Comentario:** *Notas aclaratorias si se consideran necesarias para ampliar la información del diagnóstico o para ayudar en la interpretación de las pruebas adicionales realizadas*



RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE  
TRABAJO DE TÉCNICOS SUPERIORES  
EN ANATOMÍA PATOLÓGICA Y  
CITOLOGÍA DE LA SEAP



# Recomendaciones en citología del grupo de trabajo de técnicos de anatomía patológica

**Eva Rodríguez Escudero<sup>1</sup>, Patricia Barreiro Sanabria<sup>1</sup>, Rosa María Rodero Villanueva<sup>1</sup>, M de los Ángeles Cerón Nieto<sup>1</sup>, María del Mar Olmo Fernández<sup>2</sup>**

1. *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid.*
2. *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital del Henares, Coslada, Madrid.*

## INTRODUCCIÓN

En este capítulo se recogen las líneas generales del papel del Técnico Superior en Anatomía Patológica y Citodiagnóstico (TSAPyC) en el procesamiento y estudio de las muestras citológicas en los servicios de anatomía patológica. Para ello, se ha revisado la bibliografía más importante de la especialidad y se ha tenido en cuenta la experiencia propia de las autoras.

El objetivo es establecer unas normas básicas comunes de actuación y trabajo, aplicables en todos los centros, independientemente de su tamaño y que sea útil para todos los miembros de nuestra sociedad: desde la importancia en la recogida del material y procesamiento de las muestras procedentes de PAAF, como técnicas complementarias a seguir en los laboratorios de inmunohistoquímica (IHQ), patología molecular, hasta un tema de recomendaciones en los «No hacer en citología».



# Metodología y técnicas en la obtención de material citológico en los laboratorios de anatomía patológica

**Eva Rodríguez Escudero, Patricia Barreiro Sanabria**

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid.*

## GENERALIDADES DE LA CITOPATOLOGÍA

La citología diagnóstica o citopatología es una disciplina médica que, a través del estudio microscópico de las anomalías morfológicas celulares, establece el diagnóstico de la enfermedad. Su objetivo es la interpretación de lesiones en células desprendidas de diferentes superficies epiteliales o extraídas a través de varios procedimientos. Es un método de diagnóstico morfológico simple, rápido, poco agresivo y económico que complementa al estudio histopatológico y permite identificar en poco tiempo la mayor parte de las lesiones de carácter pre neoplásico y tumoral [1].

## HISTORIA DE LA CITOPATOLOGÍA

El origen de la citopatología se remonta a los estudios del naturalista alemán Theodor Schwann, quien desarrolló la teoría celular (1839). Años más tarde, Rudolf Virchow, médico y político alemán, fue considerado como el fundador de la patología celular. En el curso de sus trabajos sobre tejidos patológicos, pudo demostrar que toda célula procede de otra célula anterior [1].

En 1941, el médico de origen griego y pionero en citopatología, George Papanicolaou (1883- 1962) desarrolló una prueba utilizando células obtenidas por raspado del cuello del útero para la detección temprana del cáncer de cérvix, sus hallazgos mostraron un método sencillo y económico que se podía utilizar masivamente permitiendo detectar el cáncer en sus inicios o en etapas pre-invasivas [2]. En 1947, la Cornell University inauguró el primer curso de citología exfoliativa y su laboratorio se convirtió en centro de referencia para el mundo. El test de Papanicolaou o «Pap test» es una de las aportaciones más importantes en el terreno de la medicina preventiva desde el siglo XX [1].

En 1974, Harald zur Hausen, científico y médico alemán, demostró por primera vez la presencia de ADN del virus del papiloma humano (HPV) en muestras de cáncer de cérvix, hipotetizando que el virus del papiloma humano jugaba un papel importante en la causa del cáncer de cuello de útero [3]. Sus trabajos científicos llevaron al desarrollo de una vacuna que se comercializó en 2006, la cual se ha convertido en una de las estrategias mundiales para la prevención del cáncer del cuello uterino [4].

## EL VPH EN LESIONES CERVICOVAGINALES, ANALES y DE OTRAS LOCALIZACIONES

El virus del papiloma humano es la infección de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial, afectando a todas las sociedades independientemente de su nivel de desarrollo. Es la causa necesaria

para el desarrollo de cáncer cérvico-uterino y otras neoplasias anogenitales, de cavidad oral y orofaringe [5].

La relación entre el VPH y estas lesiones es bien conocida desde hace varios años. Se estima que el 80% de las personas sexualmente activas, serán infectadas por el VPH durante su vida, siendo la prevalencia del 30-40%, la más alta en edades inmediatas al inicio de las relaciones sexuales entre los 15 y 25 años de edad. La presencia del virus en los subtipos asociados al desarrollo del cáncer de cuello uterino se encuentra en un 85% en los tumores del canal anal. Las comparaciones de los registros de tumores han estimado que la incidencia del cáncer anal en varones homosexuales es semejante a la estimada para el cáncer de cuello uterino en poblaciones de mujeres no protegidas por programas de cribado establecidos [5].

Los cánceres de vulva responden a dos modelos etiológicos: en mujeres < 50 años está etiológicamente ligado al VPH y en mujeres > 50 años está asociado a mutaciones del p53. Los casos de cáncer de vulva atribuibles al VPH estarían entre el 30 y 70%. El cáncer de pene presenta marcadores virales en un 70-80% de los casos, el cáncer de vagina en un 40-50% y respecto a la cavidad oral y orofaringe la intervención viral estaría focalizada en los tumores de la amígdala y del anillo de Waldeyer [5].

Según la OMS hay más de 100 tipos de HPV, de los que al menos 14 son oncógenos, conocidos como de alto riesgo. La asociación entre distintos subtipos del virus del papiloma humano y los diferentes grados de neoplasia intraepitelial cervical, pueden agruparse en dos categorías: El riesgo oncogénico bajo corresponde a los subtipos 6, 11, 26, 40, 42, 53-55, 57, 59, 66, 68, el riesgo alto e intermedio, a los subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56 y 58, y dentro de estos, los subtipos 16, 18 y 33 son los que más frecuentemente se han relacionado con la aparición de lesiones malignas [5].

En lo referente a la histología, el cérvix uterino, la zona perianal y el canal anal, comparten características muy similares, poseen similitudes embriológicas, histológicas y patológicas. Su desarrollo comienza a partir de la membrana embrionaria y la fusión del tejido ectodérmico y endodérmico para formar la unión escamo-columnar. Este punto de transición entre ambos epitelios de revestimiento es la zona predilecta del virus. Debido al paralelismo entre la patología cérvico-uterina y anorrectal, se utiliza la terminología del Sistema Bethesda para informar los hallazgos citológicos de estas áreas anatómicas.

### **Factores de riesgo**

La población inmunodeprimida (VIH y trasplantados), infectados con subtipos de virus de alto riesgo tienen una mayor probabilidad de padecer infecciones persistentes por HPV y una progresión más rápida de lesiones precancerosas al cáncer. Otros posibles factores de riesgo son la utilización prolongada de anticonceptivos orales, múltiples y diferentes contactos sexuales, alta paridad, tabaquismo y la coinfección con otras infecciones de transmisión sexual como la *Chlamydia trachomatis* y el virus de herpes simple tipo 2.

### **Medidas de prevención**

La forma fundamental de prevención primaria frente al virus es la vacunación. En EEUU y Europa (2006) se aprobó la primera vacuna dirigida contra 4 subtipos de VPH (6, 11, 16 y 18), la cual puede administrarse desde los 9 años en 3 dosis intramusculares a los 0, 2 y 6 meses. En 2007 otra vacuna contra 2 subtipos de VPH (16,18) que se aprobó primero en Europa y posteriormente en EEUU. Se considera segura desde los 9 años y se deben administrar dos dosis intramusculares si es menor de 15 años y 3 dosis a los 0, 1 y 6 meses si es mayor de 15 años.

Actualmente, la vacuna nonavalente (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58) aprobada en 2014 en Europa y EEUU es la que más se utiliza tras demostrar su eficacia. Ya hay datos de inmunidad mantenida



generada por estas tres vacunas a 8 y 10 años, pero el seguimiento de los pacientes incluidos en los diferentes ensayos clínicos que consiguieron la aprobación de estas vacunas, nos permitirán saber si es precisa una revacunación.

La OMS apunta, que «las vacunas deben introducirse como parte de una estrategia coordinada e integral para prevenir el cáncer cervical y otras patologías asociadas al VPH. Esta estrategia debe incluir educación para reducir comportamientos que aumenten el riesgo de adquirir VPH, alfabetización de profesional sanitario e información a los pacientes sobre screening, diagnóstico y tratamiento de lesiones precancerosas y cáncer».

Otras medidas de prevención primaria incluyen la abstinencia sexual, la monogamia o el uso de preservativos. Es importante destacar que el uso de preservativos reduce el riesgo entre un 60-70%, pero no protege zonas genitales no cubiertas que estén potencialmente infectadas.

En las medidas de prevención secundaria, se ha propuesto realizar un cribado poblacional, detección selectiva de la población, screening o diagnóstico precoz que se define como el conjunto de actividades aplicadas a grandes poblaciones no seleccionadas, con el objetivo de detectar la enfermedad antes de que se manifieste clínicamente y así poder iniciar el tratamiento de forma precoz con el fin de mejorar su pronóstico [5].

En cuanto a las lesiones a nivel anorrectal, el *European AIDS Clinical Society*, recomienda el cribado con citología de 1 a 3 años en hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) y anoscopia en caso de que existan anomalías, aunque reconocen que la evidencia es incierta. El *New York State Department of Health AIDS Institute* recomienda una citología anal en pacientes infectados por VIH, con historia de condilomas anogenitales y en mujeres con alteraciones histológicas vulvares o cervicales. El *Centers for Disease Control and Prevention* y el *VIH Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America* no recomiendan el cribado para la prevención del cáncer anal, aunque mencionan que sería útil la citología en pacientes de alto riesgo y en mujeres con historia de cáncer de cérvix, realizando una anoscopia de alta resolución en caso de observar alteraciones [6].

Por otro lado, para la prevención del cáncer de cérvix, el diagnóstico precoz y su tratamiento son fundamentales. De hecho, los planes de detección precoz de alta calidad pueden reducir la incidencia del cáncer de cérvix hasta en un 80%. Su éxito es, en parte, por la lenta progresión de las lesiones precancerosas, facilitándose su detección y por la posibilidad de detectar esas lesiones preinvasivas con alta tasa de curación y escasa morbilidad [6].

En 2013 y 2014, la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) publicaron una guía de detección precoz y tratamiento de las lesiones precursoras. Las técnicas de screening que describe esta guía son: inspección visual con ácido acético (IVAA), con una especificidad del 82% y sensibilidad del 86%, pero con una alta tasa de falsos positivos, frotis o citología cervical con Papanicolaou, con sensibilidad del 78% y especificidad del 62% y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [6].

## **CITOLOGÍA EN MEDIO LÍQUIDO FRENTE A LA CITOLOGÍA CONVENCIONAL**

La citología exfoliativa es un método con algunas desventajas, por lo que a lo largo del tiempo ha motivado la creación de nuevos procedimientos, como es la citología en medio líquido.

Las limitaciones de la técnica de Papanicolaou son debidas a la proporción de muestras no valorables y a una sensibilidad limitada por varios factores. Aproximadamente 2/3 de los falsos negativos se deben a errores en la toma de la muestra. Además, no todas las células recogidas son traspasadas al portaobjetos por defecto de la extensión o porque parte de ellas quedan adheridas al dispositivo de recogida. El tercio restante de falsos negativos ocurre en el laboratorio como consecuencia de una difícil interpretación por defecto de fijación o enmascaramiento de la celularidad por exceso de moco, sangre, células inflamatorias u otros artefactos [7].

#### Ventajas de la citología líquida:

- Muestras más representativas.
- Mejor conservación de la muestra.
- Disminuye las muestras no satisfactorias
- Aumenta el número de lesiones precursoras diagnosticadas (en controversia).
- Disminuye el número de ASC-US y AGC diagnosticadas (en controversia).
- Disminuye el tiempo de lectura.
- Utilización del material restante para análisis molecular de VPH.

#### Inconvenientes de la citología líquida:

- Tiempo de procesamiento más largo.
- Formación especializada para la interpretación de los estudios.
- Necesidad de un período variable para la lectura.
- Necesidad de mayor concentración en la lectura.
- Sensible aumento del costo en todas las fases del proceso.

#### **Estudio de las muestras citológicas:**

Las muestras serán estudiadas por citotécnicos y revisadas por patólogos. Todas las muestras con patología deben ser marcadas para su posterior revisión y confirmación.

La Academia Internacional de Citología recomienda que el patólogo revise todos los casos positivos, los casos dudosos y uno de cada 10 casos negativos. En el caso de lectura automatizada, todos los frotis serán posteriormente revisados de forma aleatoria por un patólogo [8].

#### **El informe citológico:**

El informe emitido debe incluir una relación de los hallazgos observados y una categoría diagnóstica que permita una actuación terapéutica. Se aplicará un formato estandarizado de informe, aceptado por la comunidad científica citológica y conocido por todos los miembros del laboratorio (Sistema Bethesda) [8].

#### **Almacenamiento:**

Las preparaciones permanecerán almacenadas por orden numérico tres años si no hay patología y cinco años como mínimo si tuvieran cualquier patología. Si los cristales no pudieran ser archivados por estar involucrados en algún caso excepcional, o donados para estudio a otro centro, quedarán registrados en el sistema de trazabilidad, detallando su localización y estado.

Los casos ya diagnosticados se almacenarán tanto en papel como en formato electrónico, siguiendo las recomendaciones de la Ley de Protección de datos respecto a la guarda y custodia, así como su destrucción cuando corresponda [8].

#### **Control de calidad:**

Cada laboratorio pondrá medidas para comprobar el buen funcionamiento del mismo, mediante controles internos y externos, con el fin de asegurar la mejor asistencia posible a la comunidad. El control de calidad interno consiste en realizar una revisión conjunta entre varios patólogos y citotecnólogos de casos complejos y de discordancia diagnóstica, revisión de todos los casos negativos, que en algún momento se hayan podido positivar, confirmación de todos los casos

positivos que puedan tener estudio histológico, correlacionando los hallazgos encontrados, y revisión de todos los casos negativos, pasado un tiempo mínimo de tres meses. Se realizará un estudio estadístico entre 6-12 meses sobre las muestras del laboratorio [8].

Actualmente la SEAP tiene programas de control de calidad para citología.

### **TÉCNICA DE PROCESAMIENTO EN CITOLOGÍA LÍQUIDA**

En el procesamiento de muestras de citología líquida, se lleva a cabo mediante un sistema automatizado: el procesador de citología líquida. La recogida, identificación y registro de la muestra es similar tanto en citología convencional como en citología líquida, sin embargo, en lugar de extender la muestra sobre un portaobjetos, ésta se introduce en un vial con 20cc de líquido conservante hasta su procesado.

Material necesario:

- Vial con líquido conservante.
- Filtro transparente con membrana.
- Tapón para el filtro.
- Frasco para residuos.
- Cubetas de tinción.
- Cestillos de tinción.
- Pinzas.
- Equipo automatizado de tinción Papanicolaou de rutina, como agente fijador se utilizan alcoholes de diferente graduación (100°, 96° y 70°).
- Portaobjetos especiales marcados con un círculo de 2cm de diámetro.
- Sistema de montaje automático con Film soluble en Xileno.

### **OBTENCIÓN DE BLOQUES CELULARES A PARTIR DE MATERIAL CITOLÓGICO**

La técnica del bloque celular (BC) se ha utilizado durante más de un siglo y continúa vigente en nuestros días. La primera descripción de esta técnica fue realizada por Bahrenburg en 1896, en su libro «*The Cytology of Effusions: pleural, pericardial and peritoneal and of cerebrospinal fluid.*» En él describió un Método novedoso que le permitió procesar líquido ascítico en secciones histológicas. La técnica consistió en permitir que el líquido reposara y se coagulase espontáneamente durante 24 horas. Tras desechar el líquido sobrenadante, y endurecer el sedimento con la adición de alcohol el material obtenido, firme y dura, se incluía en celoidina y se cortaba y teñía de manera similar a los cortes histológicos. Tras este informe, las técnicas de obtención y procesado de bloques celulares guardan gran semejanza con los que se realizan en la actualidad, considerándose un procedimiento de rutina en la mayoría de los laboratorios de citología [9].

Su utilidad se debe en parte a su sencillez y especificidad, ya que permite valorar la arquitectura de la muestra con una calidad óptima para su interpretación y es posible realizar otras técnicas complementarias de gran interés diagnóstico [9].

### **Realización de bloques celulares con material procedente de citología exfoliativa**

La realización de bloques se puede hacer solo en material citológico recibido en fresco, previamente identificado y siguiendo el protocolo de recepción y registro de muestras con el sistema de información digital del laboratorio (LIS).

Requerimientos para poder hacer bloque celular:

Muestras con alto contenido celular como:

- Broncoaspirado (BAS), extraído directamente del árbol bronquial.
- Líquidos de derrames provenientes de diferentes localizaciones corporales extraídos a través de otras técnicas como el derrame pleural.
- Líquido pericárdico y líquido ascítico, todas ellas son muestras con abundante material celular.

En el caso de lavados, cepillados y LCR no podría realizarse esta técnica, por su escaso contenido celular. Por último, destacar el material procedente de EBUS y EUS, que detallaremos su procesamiento más adelante ya que se realiza de forma diferente.

Realización de la técnica del bloque celular con material procedente de citología exfoliativa:

**Material necesario:** Campana de extracción, Centrifuga de 4 tubos con rotador oscilante, tubos cónicos para centrifuga de 30cc, papel de arroz, pipetas desechables, etanol, casetes, frasco con formaldehído al 10%, portaobjetos, protocolo del procesador de tejidos, inclusión en parafina, sistema automatizado de tinción con Hematoxilina-eosina, cubreobjetos y medio de montaje.

**Procedimiento:** Después de su recepción, comprobación y registro, se anota volumen y aspecto del líquido. El contenido se vierte en un tubo cónico para centrifuga de 30CC de capacidad, centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos, decantar el líquido sobrenadante. El material que se ha depositado en la base del tubo cónico, se añaden 30cc de etanol para obtener mayor firmeza del material. Se realiza una segunda centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos, se vuelve a decantar y con ayuda de unas pinzas o una pipeta desechable, lo depositamos y envolvemos con papel de arroz, lo introducimos en un casete bien identificado y lo sumergimos en formol para su fijación. El procesado, inclusión, corte, tinción y montaje, se realiza de manera similar al de las biopsias.

### Realización de bloques celulares con material procedente de EBUS y EUS

La ecobroncoscopia o ultrasonografía endobronquial (EBUS) con punción-aspiración transbronquial, es una técnica novedosa y mínimamente invasiva para el diagnóstico de tumores y ganglios linfáticos hiliares mediastínicos y pulmonares. Se ha convertido en una herramienta muy útil para el diagnóstico y estadificación del cáncer de pulmón, campo en el que se ha focalizado la mayoría de estudios realizados en la actualidad [10].

Existen dos tipos de ecobroncoscopia dependiendo del tipo de transductor utilizado: EBUS lineal o sectorial y EBUS radial. La EBUS lineal es similar a un broncoscopio convencional, pero presenta en el extremo distal un transductor curvilíneo que combina la videoendoscopia tradicional con la ecografía, de forma que permite ver directamente la tráquea, los bronquios y sus ramificaciones y obtener imágenes ecográficas de las estructuras que se encuentran fuera de las paredes bronquiales, como los ganglios linfáticos y estructuras vasculares. Está indicado principalmente para la estadificación mediastínica en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, para determinar el pronóstico y decidir el plan de tratamiento, ya que la presencia de afectación mediastínica permite establecer una situación de inoperabilidad y la necesidad de tratamiento quimioterápico, radioterápico o ambos. Se pueden explorar todas las estaciones ganglionares mediastínicas paratraqueales altas (2R, 2L, 3P), bajas (4R y 4L) y subcarinales, excepto los ganglios subaórticos y paraesofágicos. También son accesibles los ganglios intrapulmonares. La EBUS radial fue la primera modalidad endobronquial de ultrasonidos que se empezó a utilizar a principios de 1990. Consiste en una minisonda ecográfica que introducida por el canal de trabajo de un broncoscopio convencional proporciona una imagen ecográfica de 360° y permite visualizar la estructura de la pared traqueobronquial con sus diferentes capas, así como los ganglios mediastínicos. Permite valorar la invasión del cartílago para poder realizar

un tratamiento endobronquial con intención curativa mediante cualquier método de ablación térmica y supone una alternativa a la cirugía, en tumores no operables [10].

Por otra parte, otra técnica diagnóstica muy similar y no menos importante que la descrita anteriormente, es la ecoendoscopia (EUS), que consiste en la combinación de punción-aspiración con aguja fina (PAAF), guiada por un endoscopio flexible y una sonda ecográfica. La EUS permite obtener imágenes mucho más nítidas y detalladas de las distintas capas que conforman la pared del tubo digestivo, tomar muestras del interior del esófago, estómago, duodeno, recto, sigma y otras localizaciones como mediastino, páncreas, hígado, vías biliares, cavidad pélvica y ganglios linfáticos accesibles a través de la pared digestiva. La utilidad principal de la ecoendoscopia es la estadificación de tumores tanto benignos y malignos que aparecen en estas zonas. Determina con precisión la profundidad que alcanza un tumor, si invade o no órganos vecinos y si afecta a ganglios próximos al tumor. También es de utilidad en la detección precoz de posibles recidivas de tumores ya tratados. Además, también es efectivo en el tratamiento del dolor originado por el cáncer de páncreas y pancreatitis crónica, localizando los nervios que transmiten el dolor e inyectando en ellos fármacos que bloqueen la transmisión nerviosa. Otra aplicación es el vaciado de quistes o abscesos próximos al tubo digestivo.

Realización de la técnica del bloque celular con material obtenido a través de EBUS y EUS:

**Material necesario:**

- Portaobjetos.
- Láminas de papel de arroz.
- Pipetas desechables.
- Etanol.
- Cassette.
- Frasco con formaldehído al 10%. Se utiliza el mismo sistema de procesado, inclusión, tinción y montaje que en el caso de las biopsias.

**Procedimiento:**

La técnica se realiza por raspado del material (coágulo) depositado en el portaobjetos. El material se recibe directamente de la unidad de endoscopias en fresco. Las muestras obtenidas pueden ser: extensiones citológicas para su tinción permanente en Diff-Quik de tipo Romanowsky, para citología líquida y una porción de material en forma de coagulo hemático, depositado en uno de los portaobjetos, que se deja secar bajo campana de extracción.

Una vez que el material está desecado, se añaden unas gotas de etanol para evitar su dispersión, raspamos el coagulo despegándolo poco a poco del portaobjetos con ayuda de otro cristal, depositamos y envolvemos la muestra en el papel de Arroz y finalmente, lo introducimos en el casete para su fijación, procesamiento [10].

## OTROS MÉTODOS DE PREPARACIÓN DEL BLOQUE CELULAR

**Gel acuoso Agar-Agar:** Es una mezcla natural de polisacáridos de diversas especies de algas rodoíceas, principalmente del género *Gelidium*. Se utiliza como agente suspensor, espesante, emulgente, y estabilizante en diversos tipos de preparaciones. Permite un elevado rendimiento en muestras habitualmente difíciles de valorar y además pueden realizarse otras técnicas adicionales. El procedimiento es similar al que se realiza para el bloque celular convencional. Se recomienda preparar el agar-agar con agua destilada, llevarlo a ebullición en un rotor con calor a 50-60°C, dejar enfriar hasta los 36-37°C. Verter el gel en el tubo cónico donde se encuentra la muestra ya centrifugada y decantada, desmoldar el bloque, envolver la muestra en papel de arroz, introducirlo en un casete para su fijación con formol al 10% y procesamiento.

**Método Plasma-Trombina:** La trombina es una enzima formada en el plasma durante el proceso de coagulación a partir de la protrombina, calcio y tromboplastina. Induce el paso del fibrinógeno a fibrina y resulta esencial para la formación del coágulo. El procedimiento para la realización del bloque celular es similar a los que se han descrito anteriormente. Una vez que el material ha sido centrifugado y decantado, se le añade el plasma –trombina (preparado comercial), el material forma un coagulo, se envuelve en papel de arroz y se introduce en un casete para su fijación con formol al 10% y procesamiento.

**HistoGel:** Éste método es similar al método agar-agar, aunque con pequeñas diferencias que impactan significativamente en el rendimiento celular. EL HistoGel debe almacenarse entre 2°C y 8°C antes de su uso, puede reutilizarse 3 veces antes de que disminuya su rendimiento y se prepara siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se seleccionan moldes de base desechables de 1,5 × 1,5 × 0,5 cm para muestras procedentes de EBUS/EUS y moldes de 0,7 × 0,7 × 0,5 cm para muestras de derrames de cavidades serosas. El uso de moldes más pequeños puede concentrar el material de manera más eficaz. Además, se pueden fabricar múltiples moldes para muestras muy celulares y colocarlos en un solo casete para su procesamiento. El material citológico seleccionado se centrifuga, se decanta, el sedimento se transfiere del tubo al molde desechable y se le añade el HistoGel. Finalmente, el molde se coloca en un baño de hielo durante 30 segundos para favorecer una solidificación rápida, este se desmolda, se envuelve en papel de arroz y se introduce en un cassette para su fijación y procesamiento [9].

## Bibliografía

1. Biografías [Internet]. [citado 26 agosto 2020]. Recuperado a partir de <https://www.historiadelamedicina.org/schwann.html>
2. Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. 1941. Arch Pathol Lab Med. (1997) Mar;121(3):211-24. PMID: 9111103.
3. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. Int. J. Cancer 13, 650–656 (1974).
4. Hipertextual [Internet]. [citado 2 Julio 2015]. Recuperado a partir de: <https://hipertextual.com/entrevistas/harald-zur-hausen>
5. Inmunización, vacunas y productos biológicos [Internet]. [Citado 21 agosto 2017] Recuperado a partir de: <https://www.who.int/immunization/diseases/hpv/es/>
6. Sociedad Española de Oncología Médica. (SEOM) [citado 3 febrero 2020] Recuperado a partir de: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cervix?showall=1>.
7. Sáez de Santamaría J, Rodríguez Costa J, De Agustín Vazquez D. Citología líquida, Cuaderno de citopatología N 5. Madrid, Díaz de Santos; 2006
8. Rodríguez Costa J, De Agustín Vazquez D, Torres Gomez FJ, Mayayo Artal E, Alameda Quitllet F, Lloveras Rubio et al. Citología Ginecológica, Cuaderno de citopatología N14. Madrid, Díaz de Santos; 2016.
9. Wallace MB, Pascual JM, Raimondo M, Woodward TA, McComb BL, Crook JE et al. Minimally invasive endoscopic staging of suspected lung cancer. JAMA. 2008 Feb 6;299(5):540-6. doi: 10.1001/jama.299.5.540.
10. InfoSalus / Asistencia [Internet]. Combinacion de Ebus y Eus. [Citado 1 enero 2018] Recuperado a partir de: <https://www.infosalus.com/asistencia/noticia-combinacion-ebus-eus-mejora-diagnóstico-cancer-pulmon-20180201120254.htm>

# Manejo de las muestras procedentes de PAAF en servicios de anatomía patológica

**María del Mar Olmo Fernández**

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital del Henares, Coslada, Madrid.*

La punción aspiración con aguja fina (PAAF) es una prueba de diagnóstico aplicada en los servicios de anatomía patológica. Las primeras referencias bibliográficas de la técnica se remontan al siglo XI en un texto del médico árabe Abulcasis. El desarrollo de la PAAF tuvo su mayor auge en Europa a pesar de que las primeras publicaciones se realizaran en los EEUU. Autores como Dudgeon (1927), Martin y Ellis (1930) y la experiencia de la escuela sueca contribuyeron notablemente al desarrollo de la técnica, así como a la formación de numerosos profesionales en la idiosincrasia del procedimiento [1]. La PAAF es una técnica sencilla, poco invasiva y eficiente tanto referenciada al coste de la técnica como en términos de rentabilidad diagnóstica.

La punción aspiración con aguja fina se realiza sobre órganos superficiales o profundos. En los órganos profundos, no palpables o de difícil acceso se va a apoyar en técnicas de imagen. El Técnico Superior de Anatomía Patológica y Citodiagnóstico (TSAPyC) va a recibir muestras procedentes de diferentes Servicios.

- Servicio de Radiología en el estudio de órganos no profundos con valoración in situ del material (*Rapid On Site Evaluation*) ROSE por parte del patólogo o TSAPyC. Es de vital importancia para disminuir el número de muestras insatisfactorias la presencia del patólogo o TSAPyC para realizar la valoración in situ, así como para realizar un adecuado triaje del material.
- Técnicas para estudio de órganos profundos como TAC, EBUS, USE con valoración in situ del material por parte de patólogo. El TSAPyC realizará todo el procedimiento técnico aplicable a cada estudio: extensiones secas, extensiones fijadas en alcohol, bloques celulares, lavado de aguja en medio Líquido... así como realización de tinción rápida para poder valorar in situ el material (Diff-Quik). La realización del ROSE por parte del patólogo o TSAPyC cualificado resulta de vital importancia para evitar pases de punción innecesarios.
- Consulta de Patología Intervencionista (EcoPAAF-EcoBAG): la ecografía en el punto de atención (POCUS) debe ser entendida siempre como herramienta de apoyo de imagen y no con fines diagnósticos. La PAAF es llevada a cabo por un Patólogo con conocimientos previos en procedimientos ecográficos. El TSAPyC asistirá en la técnica y será la figura encargada del triaje del material y de las técnicas rápidas. El conocimiento en el manejo del ecógrafo por parte del TSAPyC permite que el flujo de trabajo en la Consulta sea más fluido. En los supuestos que sea necesario realizar EcoBAG, el TSAPyC debe adquirir destreza para asistir al Patólogo en el procedimiento de obtención de biopsia (preparación campo estéril, reconocimiento de material, conocimiento de los diferentes tipos de aguja para biopsia, realización de improntas como control del material tisular obtenido, fijación del material en formol). En los anteriores supuestos descritos la eficacia del procedimiento mejora cuando se trabaja en equipo ya sea el patólogo o TSAPyC junto al radiólogo o el TSAPyC junto al

patólogo. Es imprescindible una correcta manipulación del material citológico obtenido para poder realizar un buen diagnóstico [2].

Desde el punto de vista técnico se detallan alguna de las recomendaciones que se deben aplicar en el manejo de la muestra tanto en su fase preanalítica como analítica [3]:

- Verificar que la documentación sea correcta para poder registrar la prueba en los sistemas informáticos del AP: petición en sus diferentes modelos (ya sea papel o electrónica), con datos de filiación y clínicos del paciente, así como el consentimiento informado, correctamente firmado por las partes interesadas.
- Confirmar que el material obtenido está debidamente identificado.
- Garantizar que las extensiones son uniformes, ovoides, centradas en el porta o cristal y sin fenómenos de aplastamiento de las células.
- Realizar un correcto triaje del material teniendo en cuenta:
  - Portas o cristales fijados en seco para realizar técnica de Diff-Quik.
  - Portas o cristales fijados en alcohol 96° para realizar técnica de Papanicolaou.
  - Lavado de aguja de PAAF para posterior concentración celular mediante el procedimiento automatizado del Medio Líquido. Este procedimiento reporta valor al diagnóstico.
  - Obtención de bloques celulares para realización a posteriori de técnicas complementarias, (estudios histoquímicos, inmunohistoquímicos o de biología molecular).
  - En los supuestos que los requiera, obtención de material para pruebas de biología molecular o citometría de flujo en los casos de sospecha de procesos linfoproliferativos.
  - En los casos de sospecha de infecciones, recogida de material en bote estéril para estudios de microbiología.
- Como consecuencia de la aplicación de los sistemas de control de calidad en los laboratorios de citología se debe llevar un registro detallado con las incidencias que se puedan producir, tales como:
  - Errores en la identificación o no identificación del material obtenido.
  - Errores por inadecuada fijación.
  - Errores producidos durante el registro u etiquetado de los portaobjetos.
  - Errores originados durante el procedimiento técnico.

El análisis de los datos obtenidos para extrapolación de la correlación citológica-histológica aportan parámetros de calidad relevantes de mejora diagnóstica en los SAP.

## **Bibliografía**

1. Santamaría M, Viquer JM. Guía de buenas prácticas en punción aspiración. Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España. Editorial SEAP; 2013.
2. Zarra KV, Llanos SN. Una nueva figura en la anatomía patológica actual: el patólogo intervencionista. Revista Española de Patología; (2016). 49(2), 94-95.
3. Rodríguez J, Vázquez D. Punción-aspiración con aguja fina de órganos superficiales y profundos. Madrid. Díaz de Santos; (1997) 283-5.



# Patología molecular en el laboratorio de citología

**Rosa María Rodero Villanueva**

*Hospital Clínico Universitario San Carlos.*

## APLICACIONES MOLECULARES EN LA CITOLOGÍA DE CÁNCER DE PULMÓN

En los últimos años, la biología molecular ha avanzado de forma inusitada en el campo del conocimiento y manejo del cáncer de pulmón. Particularmente en el campo del carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). Estos avances se deben a la identificación de alteraciones genético-moleculares, que se han convertido en marcadores de gran utilidad para el diagnóstico, pronóstico y establecimiento de terapias dirigidas.

El objetivo de esta sección es desarrollar algunos procedimientos moleculares aplicados a muestras citológicas.

### Detección de reordenamientos que impliquen a los genes ALK y ROS1 mediante FISH

Los genes ALK y ROS1 codifican receptores con actividad tirosina-quinasa, que se encuentran reordenados en un 1-5 % de los carcinomas de pulmón no microcíticos y adenocarcinomas, especialmente en pacientes jóvenes, no fumadores y sin mutaciones en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La detección de una de estas traslocaciones, permite la selección de pacientes susceptibles de responder al tratamiento con Crizotinib, inhibidor de ALK y ROS1, que induce la apoptosis, e inhibe el crecimiento celular [1].

La hibridación in situ fluorescente (FISH) es la técnica más recomendada para la determinación de estas traslocaciones. El material utilizado procede de EBUS de adenopatía mediastínica y PAAF de masa pulmonar guiada por TC. Las muestras óptimas son los bloques celulares, aunque en ocasiones, pueden usarse extensiones citológicas, siempre y cuando haya cantidad suficiente de células tumorales. Para garantizar el éxito de la técnica se deben realizar dos secciones del bloque celular: una teñida con hematoxilina-eosina que muestre la presencia de células tumorales, y otra con un grosor que no supere las 4 micras en un cristal tratado, para la determinación de ALK y ROS1 [1].

La secuencia de pasos para realizar la técnica, es la siguiente:

- Desparafinar e hidratar las muestras hasta agua destilada y Buffer de lavado.
- Calentamiento a ebullición de las muestras con solución de pretratamiento, que rompe los enlaces moleculares del formol con dichas muestras.
- Digestión proteolítica con pepsina para romper las membranas. Dependiendo de la temperatura empleada en este paso (ambiente ó 37°C) aumentará o disminuirá el tiempo de permanencia en pepsina.
- Adición de la sonda *break-apart* con color dual.
- Desnaturalización y posterior hibridación de la sonda con la muestra.

- Lavado con buffer de astringencia para garantizar la eliminación de la sonda no unida o unida inespecíficamente.
- Finalmente, tras deshidratar con alcoholes de graduación creciente, se montarán las muestras con medio de montaje fluorescente, que aportará contratinción fluorescente azul.

En el caso de las extensiones citológicas, hemos comprobado que las monocapa teñidas con Diff-quick, (tinción no permanente de fácil eliminación), son las más recomendables. Realizar la técnica sobre cristales procedentes de IHQ o teñidos con Papanicolaou produce mucha tinción de fondo que impide la nítida visualización.

La secuencia de pasos a seguir, es la siguiente:

- Retirar el film de montaje soluble en xileno con acetona y lavar con etanol al 960.
- Lavados con etanol de 700; el primero de ellos con 1000 microlitros de HCL, para decolorar la muestra, siendo el último buffer de lavado.
- No se realiza pretratamiento, ya que las extensiones citológicas, no están fijadas en formol.
- Se reduce considerablemente el tiempo de permanencia en pepsina para no sobredigerir la muestra.
- El protocolo continúa de igual manera que el de los bloques celulares.

Tiempos y temperaturas deberán ajustarse según indicaciones de la casa comercial fabricante de cada kit específico.

### **Determinación de mutaciones en el gen EGFR**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico, es uno de los miembros de la familia de receptores de membrana con actividad tirosina-quinasa, conocida de forma global como ErbB. Localizado en el brazo corto del cromosoma 7, mutaciones en el gen EGFR, se identifican en aproximadamente el 10 ó 16% de los CNCNP y más frecuentemente en adenocarcinomas de pacientes no fumadores jóvenes, y sin traslocaciones en el gen ALK. Dichas mutaciones, suelen afectar a los exones 18-21. La activación de este receptor, supone una ventaja para la proliferación, al frenar la apoptosis e inducir rutas oncogénicas. La determinación de estas mutaciones, permite la selección de pacientes susceptibles de responder al tratamiento con inhibidores tirosina-quinasa de EGFR (Erlotinib y Gefitinib) [2].

Para la determinación de EGFR, se recomiendan métodos de alta sensibilidad, como la PCR en tiempo real, COBAS, EGFR Mutation Test (*Roche Molecular Systems*). Las muestras óptimas son tanto bloques celulares como extensiones citológicas procedentes de adenopatías mediastínicas o PAAF de masa pulmonar guiada por TC, siempre y cuando haya una cantidad suficiente de celularidad tumoral. Para garantizar el éxito de la técnica, debemos disponer:

- En el caso de bloques celulares, de una sección teñida con hematoxilina-eosina que muestre la presencia de células tumorales, y una cantidad suficiente de secciones sin teñir, para la obtención del material.
- En el caso de las extensiones citológicas, de los propios cristales para poder obtener el material.

La secuencia de pasos para realizar la técnica, es:

- Desparafinar las muestras, pasar por baños de etanol de 100-96° y secar al aire.
- Microdissección del material, centrándonos en la zona tumoral, y obviando las no tumorales.
- Extracción del ADN en "buffer" de lisis y proteinasa K.

- Pasada 24 horas, inactivación de la proteinasa K.
- Purificación del ADN extraído.
- Cuantificación del ADN extraído y purificado, para que cada muestra lleve la cantidad adecuada del mismo.
- Preparación de la microplaca que debe llevar, soluciones de MMx1, MMx2, MMx3, magnesio, control positivo, control negativo, y muestras dispuestas en los pocillos de forma adecuada.
- Sellar la microplaca.
- Comienzo de la PCR en tiempo real en COBAS Z 480 Analyzer.

Otros métodos de detección pueden ser:

- **Secuenciación directa.** Método basado en sintetizar, de forma secuencial, una hebra de ADN complementaria a otra hebra de cadena simple, (molde), en presencia de ADN polimerasa, los cuatro DNTP's que componen la secuencia de ADN, y los 4 DDNTP's o nucleótidos de parada. Estos últimos, interrumpen la síntesis de la nueva hebra, cada vez que uno de ellos es incorporado por la polimerasa. Así, se obtienen fragmentos secuenciales de distinto tamaño.
- **Pirosecuenciación.** Método basado en el anterior, con la particularidad consistente en permitir determinar el orden de la secuencia mediante luminiscencia. Esto es, detecta el pirofosfato liberado cuando los nucleótidos son incorporados, y así, se genera una señal luminosa.
- **Análisis de fusión de alta resolución.** Basado en el estudio y comparación de curvas de fusión en las cadenas de ADN [3].

## DETERMINACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con la reacción en cadena de la polimerasa podemos obtener millones de copias de una secuencia de ADN en pocas horas. Llevada a cabo por primera vez en 1983 por Kary Mullis, se realiza in vitro el proceso de replicación del ADN. Este método, está basado en la acción de la polimerasa, enzima que dirige la síntesis de ADN, para obtener, partiendo de una cadena simple de ADN, su complementaria. Así, sólo necesitaremos una pequeña fracción de ADN para dar comienzo a la síntesis. Para que la reacción se efectúe de forma óptima, necesitaremos los siguientes elementos:

- ADN problema para amplificar e identificar.
- Oligonucleótidos cebadores o *primers*, que se unen a los extremos del ADN problema.
- Desoxirribonucleótidos DNTPs de A, G, C, T.
- Taq polimerasa, aislada de la bacteria *Thermus acuaticus*, la cual es termo-resistente y cuya actividad depende de magnesio, pero admite la desnaturalización in vitro a 95°C.

Para realizar la técnica, utilizamos muestras ginecológicas procedentes de citología en medio líquido.

Procedimiento técnico:

El procedimiento técnico, comienza con la preparación de la muestra. Es decir, extracción y purificación de la misma. Hay que apuntar que dicha purificación puede ser realizada por medios mecánicos o manuales, usando columnas. La PCR comienza con la amplificación de la muestra purificada. Esencialmente, un ciclo de amplificación se lleva a cabo por tres reacciones:

- Desnaturalización del ADN bicatenario a 95°C, con la consiguiente separación de las hebras de ADN.
- Hibridación de los cebadores, que se unen a los extremos del ADN problema. Esto ocurre entre 50 y 70°C.

- Polimerización o síntesis de la nueva cadena, gracias a la Taq polimerasa, que añade DNTPs complementarios. Lo cual ocurre a 72°C.

Seguidamente hay que desnaturalizar los productos amplificados a 95°C. Los productos amplificados desnaturalizados se transfieren a pocillos con *microarrays* en el fondo, donde se produce la hibridación con sondas específicas [4].

Finalmente, se procede a la adición del conjugado y posterior revelado. Lo que ocurre básicamente es que los productos amplificados por PCR y marcados con biotina hibridan con sondas complementarias específicas.

A continuación, tienen lugar dos pasos de incubación secuenciales:

- Con un conjugado de estreptavidina peroxidasa.
- Con un sustrato de o-dianisidina.

Así, se producirá una señal en las regiones donde hay hibridación específica, entre los productos amplificados y sus sondas, para pasar al análisis e interpretación de los resultados [5]. Dicha interpretación puede ser mecánica o manual, usando en este último caso electroforesis en gel de agarosa.

### Métodos directos de amplificación previa

**Captura de híbridos:** Identifica algunos de los tipos de HPV carcinogénicos. Forma híbridos de ADN viral con sondas de ARN, que se identifican mediante anticuerpos específicos y una solución quimio-luminiscente. Para el revelado es necesario un luminómetro. Es la prueba más antigua aprobada por la FDA. Tiene alta sensibilidad, pero su especificidad es limitada.

**Care HPV:** Tiene igual principio que la anterior, pero automatizada y más rápida. Se realiza la desnaturalización del ADN, la hibridación con la sonda de ARN, la captura y detección del híbrido, y finalmente se amplifica la señal.

**GP5+/GP6-BIO PCR-EIA:** No se utiliza en programas de cribado, solamente en ensayos, y está validada a nivel clínico. Utiliza primers GP5+/GP6+BIO que amplifican un fragmento de la región L1 del HPV. Los productos amplificados hibridan con oligonucleótidos específicos. La detección se realiza con ensayo inmunoenzimático.

**Cervista HPV HR:** Prueba de diagnóstico in vitro que utiliza dos tipos de reacciones isotérmicas simultáneas como método de amplificación de secuencias específicas de ADN. La primera reacción ocurre en la secuencia de ADN objetivo, y la segunda produce una señal fluorescente. El equipo cuenta con control negativo interno, para reducir falsos negativos en caso de haber bajo número de células.

**Cervista HPV 16/18:** Amplificación y genotipado igual tecnología que el anterior, pero más sensible y reproducible. El control interno, verifica la calidad de la muestra, pero en aquellas con errores en su toma o bajo nivel viral, puede inducir a falsos negativos.

### Pruebas de amplificación y genotipado en tiempo real

En la PCR en tiempo real se amplifica y simultáneamente se cuantifica de forma absoluta el producto de amplificación del ADN.

COBAS 4800

- Puede detectar catorce tipos de HPV de alto riesgo. Como control interno utiliza un gen Beta-globina que garantiza la extracción, amplificación e integridad de la muestra. Aprobado por

la FDA para cribado primario. El equipo está totalmente automatizado con termociclador y software, utilizando *primers* para la región L1 del HPV. La extracción del ADN de las muestras y el análisis, se incluyen en el procedimiento de la PCR en tiempo real.

- Entre sus ventajas encontramos:
  - Reducción del tiempo en el proceso, de movimientos repetitivos por parte del personal técnico y de residuos biológicos.
  - No presenta reacciones cruzadas con serotipos no carcinogénicos.
- Entre sus inconvenientes encontramos:
  - El personal que realice la prueba habrá de estar especializado en PCR y manejo de COBAS 4800.
  - Un número bajo de copias del virus o presencia de inhibidores de PCR puede originar falsos negativos.

ABBOTT Real Time.

- Proceso cualitativo *in vitro* y completamente automatizado, que puede detectar catorce genotipos de HPV de alto riesgo. El equipo está compuesto por una unidad que prepara la muestra, y el analizador que realiza la PCR en tiempo real. Utiliza múltiples primers para la amplificación. La detección de los productos de amplificación, se puede realizar con:
  - Moléculas fluorescentes intercaladas en la doble cadena, tales como SYBR *green*.
  - Hibridación por sondas como Taqman.
  - Cebadores fluorescentes, etc.
- La ventaja más destacada es que el uso de sondas aumenta la especificidad de la reacción.

### Métodos de detección de ARNm

Las oncoproteínas E6 y E7 del HPV, regulan el proceso carcinogénico y la sobreexpresión de sus genes son un marcador para el cáncer de cuello cérvico-uterino (CCU). Se cree que la detección de la expresión de estos oncogenes, puede ser más específica que las pruebas de ADN-HPV para la predicción de riesgo de CCU.

APTIMA HPV ASSAY:

- Prueba cualitativa que detecta la expresión de ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 de 14 tipos de HPV de alto riesgo, utilizando PCR en tiempo real. El control interno incorporado supervisa la captura, detección y amplificación, así como errores humanos y del instrumento [6].
- Como ventaja destacada, puede analizar 250 muestras en 5 horas.
- Entre sus inconvenientes encontramos:
  - No ha sido evaluado en personas vacunadas.
  - La detección de ARNm depende del número de copias de la muestra.

### Bibliografía

1. Conde E, Gómez Román J, López Ríos F. Biomarcadores con interés predictivo en el Cáncer de pulmón. Libro blanco de la SEAP. Sociedad española de anatomía patológica; (2015):445-447. ISBN: 84-699-3297-7; DL: VI-319/2915.
2. Campos-Parra AD, Cruz-Rico G, Arrieta O. "Genotipificación en Cáncer de pulmón de células no pequeñas". GAMO 11.1 (2012): 35-44.
3. Cagle PT, Sholl LM, Lindeman NI, Alsabeh R, Divaris DX, Foulis P, Lee G, Neal JW, Nowak JA, Yu PP; Members of the Cancer Biomarker Reporting Workgroup, College of American Pathologists. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients

- with non-small cell carcinoma of the lung. Arch Pathol Lab Med. 2014 Feb;138(2):171-4. doi: 10.5858/arpa.2013-0232-CP.
4. Fariña González J, Rodríguez Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa. Citología respiratoria y pleural. Editorial Médica Panamericana ;( 1996):163-188. ISBN:84-7903-222-7;DL: M-135121-1996
  5. Bonde J, Rebolj M, Ejegod DM, Preisler S, Lynge E, Rygaard C. HPV prevalence and genotype distribution in a population-based split-sample study of well-screened women using CLART HPV2 human papillomavirus genotype microarray system. BMC Infect Dis.(2014) Jul 26;14:413. doi: 10.1186/1471-2334-14-413. PMID: 25064473; PMCID: PMC4122758.
  6. Organización Panamericana de la salud. Incorporación de la prueba del virus del papiloma humano en programas de prevención de Cáncer cérvico-uterino. Manual para gerentes de programas de salud; (2016) :9-17. ISBN:978-92-75-31910-9.

# La citología en el laboratorio de inmunohistoquímica

**M de los Ángeles Cerón Nieto**

*Hospital Universitario Clínico San Carlos.*

La aplicación de las inmunotinciones en el diagnóstico en citología ha sido paralelo a los progresos que se han experimentado en la patología quirúrgica. El origen de la inmunohistología data de los trabajos de Albert Coons en 1941 cuando utilizaba anticuerpos marcados con isocianato de fluoresceína. Su uso en citología se generalizó en los años 80 y posteriormente en Acta Citológica entre 1991 y 1994 fueron publicados más de 100 artículos describiendo el uso de esta técnica. Es sencillo habitualmente decir en citología convencional si una lesión es benigna o maligna, pero precisar el tipo exacto de tumor puede ser más difícil. Aunque la histología permite llegar al diagnóstico definitivo en la mayoría de los casos, existe un pequeño grupo de lesiones que simultáneamente expresan marcadores asociados con 2 o más líneas de diferenciación que no podrán ser clasificados por esta técnica [1].

En el laboratorio de inmunohistoquímica (IHQ) se usan anticuerpos para la determinación de ciertos marcadores denominados antígenos en una muestra de tejido, lo que permite al patólogo dar el diagnóstico más preciso. Al laboratorio de IHQ puede llegar el material citológico de dos formas:

- Bloques celulares, incluidos en parafina.
- En portaobjetos, teñidos con Papanicolaou o fijados en etanol de 96° (extensiones para el diagnóstico clínico).

## **BLOQUES CELULARES:**

Con el uso de bloques celulares se suele obtener mejores resultados. Esto se debe a la mayor representación de células y a la posibilidad de poder hacer tantas técnicas como cortes permita el bloque obtenido. En cambio, si es a través extensiones citológicas, se dispone tan sólo de los cristales de la extensión que se hayan podido obtener en el momento de la toma de la muestra.

Volviendo al bloque celular, tras su elaboración en el laboratorio de citología se procesa como una biopsia normal:

- Fijación en formol al 10%.
- Inclusión en parafina.
- Realización de bloque.
- Cortes a 4 micras recogidos en portas tratados para IHQ.
- Secar a 1h a 60°C.
- Introducir en el inmunoteñidor donde se procederá a realizar la recuperación del epítipo.

## PORTAS TEÑIDOS CON PAPANICOLAU O FIJADOS EN ETANOL DE 96°

Procesamiento:

- Recibimos los portaobjetos teñidos con Papanicolaou o fijados en etanol de 96° por parte del laboratorio de citología.
- Despegamos el film o cubreobjetos del portaobjetos: para ello, metemos la muestra en una *coplin jar* con acetona pura, que cubra el portaobjetos y lo dejamos hasta que por sí solo se despegue el film o cubreobjetos, así no arrastraremos ninguna célula del portaobjetos.
- Una vez separado el film, retiramos la acetona pura y la sustituimos por xileno unos 5 minutos. Pasado este tiempo, lo sustituiremos por etanol puro o 100° unos dos minutos y luego por etanol de 96° otros dos minutos.
- Posteriormente se lava el portaobjetos con agua destilada comprobando que el portaobjetos quede limpio y no blanquecino. Si sucediera que se quedara blanquecino, deberíamos repetir el proceso.
- Para finalizar el proceso, seguiremos el procedimiento de una IHQ normal (inmunoteñidor).

**Problemas técnicos:** Los problemas técnicos ocurren por múltiples razones, las más comunes son:

- Extendidos de mala calidad y/o mal fijados.
- Extendidos con mezcla de células malignas de diferentes partes del tumor y con células benignas.
- Diluciones inapropiadas.
- Condiciones del laboratorio inadecuadas que alteran la especificidad del anticuerpo.
- Extendido con escasa cantidad: es crucial que el citopatólogo esté satisfecho con el número de células en las que va a basar su diagnóstico.

En conclusión, el uso de la IHQ es una ayuda diagnóstica que ha demostrado, al igual que en la patología quirúrgica, ser altamente sensible y específica para la realización de tinciones antígeno-anticuerpo que nos ayuda a confirmar un diagnóstico y dirigir el tratamiento personalizado, lo que supone al paciente el beneficio de evitar procedimientos altamente invasivos.

### Bibliografía

1. Barbosa Quintana O, Garza Guajaro R, Flores Gutierrez JP, Candonosa McCann M. Unidad de Inmunohistoquímica en Citología. México. VI congreso virtual Hispanoamericano de Anatomía (2004).



# El no hacer en citología

**Eva Rodríguez Escudero<sup>1</sup>, Rosa María Rodero Villanueva<sup>1</sup>, Patricia Barreiro Sanabria<sup>1</sup>, M de los Ángeles Cerón Nieto<sup>1</sup>, María del Mar Olmo Fernández<sup>2</sup>**

1. *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid.*

2. *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital del Henares, Coslada, Madrid.*

Como en todo en la vida y en todas las profesiones, a lo largo del tiempo uno se da cuenta por experiencia de que hay cosas que no debemos seguir haciendo., pues «Rectificar es de sabios». En este capítulo se plasman qué cosas no se deben hacer en citología, tanto en la recepción de las muestras, en el laboratorio, durante el procesamiento, en las técnicas aplicadas y en el diagnóstico.

- Nunca recoger una muestra no identificada correctamente. Es necesario la devolución de la muestra cuando exista discordancia en los datos de filiación.
- No admitir peticiones, ya sean en papel o electrónicas, donde no se especifiquen adecuadamente el tipo de muestra objeto de estudio y los datos clínicos.
- No admitir muestras recogidas en envases no adecuados para estudio citológico, mal conservadas o manipuladas incorrectamente por personal ajeno al servicio de anatomía patológica.
- No admitir muestras citológicas inadecuadamente fijadas.
- Si no hay suficiente material para poder procesar la muestra, es necesario indicarlo y pedir repetir o directamente especificar que la muestra es insuficiente.
- No entregar portas para estudio microscópico sin valorar adecuación y calidad técnica.
- No utilizar reactivos caducados, mal identificados o incorrectamente almacenados.
- No aplicar protocolos de trabajo técnico sin previa validación de resultados.
- No incumplir las programaciones de mantenimiento preventivos, así como los correctivos de los equipos de trabajo.
- No realizar *screening* citológico a «ciegas» sin conocer datos clínicos y tipo de muestra.

## QUÉ NO HACER EN LOS LABORATORIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

- No realizar técnicas citoquímicas ni inmunohistoquímicas sin controles externos.
- No utilizar extensiones citológicas que estén en cristales normales. Siempre deben ir en cristales especiales tratados para que no se desprenda el material.
- No introducir el portaobjetos en el inmunoteñidor cuando esté sucio (turbio). Tiene que estar limpio, transparente.

## QUÉ NO HACER EN TÉCNICA DE FISH

- No se debe hacer técnica de FISH en muestras previamente teñidas con inmunohistoquímica o con Papanicolaou. La tinción de fondo impide la visualización de la fluorescencia.

- No hacer técnica de FISH en muestras que no estén en cristales tratados: corren el riesgo de desprenderse.
- No hacer técnica de FISH en muestras que no tengan la concentración adecuada de células tumorales.

#### **QUÉ NO HACER EN PCR (HPV)**

- No hacer extracción ni purificación en la misma estancia que la amplificación-visualización, por riesgo de contaminación.
- No se recomienda hacer extracción y purificación bajo campana de flujo laminar.
- No se debe romper la cadena de frío en muestras de ADN extraído y purificado.

#### **QUÉ NO HACER EN EL TRANCURSO DE CONTROL DE UNA PAAF**

- No comenzar la prueba clínica de PAAF sin el consentimiento informado firmado.
- No conformarse nunca con poco material. Si el transcurso clínico de la PAAF es el habitual y no existe riesgo para el paciente, debemos asegurarnos que se obtiene material suficiente no solo para el diagnóstico sino para todos los estudios complementarios que sean potencialmente requeridos en función de la patología del paciente.
- Si es necesario, solicitaremos que se pinche de nuevo al paciente y así debemos comunicárselo al responsable de hacer la punción.
- No realizar ninguna prueba PAAF sin valoración in situ del material (ROSE) por parte del Patólogo o TSAPyC

La lectura de estas recomendaciones, a buen seguro dará pie a la identificación por el lector de algunas más. Este capítulo por tanto, queda abierto a futuras ediciones.

#### **Agradecimientos**

A los doctores Luis Ortega Medina, Melchor Saiz-Pardo Sanz, Concepción Millana de Ynes, del H.Clinico de San Carlos; Santiago Nieto Llanos del Hospital del Henares, Ana Patricia Martínez Aguilar del Hospital de Guadalajara y a la profesora Pilar Negredo Madrigal del depto. de Anatomía, Histología y Neurociencia de la UAM

# RECOMENDACIONES DEL GRUPO DE TRABAJO DE GESTIÓN APLICADA Y CALIDAD DE LA SEAP



# Recomendaciones de la SEAP para la era SARS-COV2: Bioseguridad en patología quirúrgica, citología y autopsias. Operativa de retorno a la normalidad

**Grupo de Trabajo de Gestión Aplicada y Calidad de la SEAP**

**Coordina:**

**Antonio Martínez Lorente.** *Hospitales Universitarios de Torrevieja y Elx-Vinalopó.*

**Grupo de trabajo Sociedad Española de Citología:**

**Rosario Granados Carreño.** *Hospital Universitario de Getafe. Madrid.*

**Grupo de trabajo de Patología Infecciosa de la SEAP:**

**Cristian Perna Monroy.** *Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid.*

**Grupo de Autopsias de la SEAP:**

**Teresa Hermida.** *Complejo Universitario de A Coruña.*

**Silvia Carnicero.** *Instituto de Medicina Legal. Cantabria.*

**Rita M. Regojo.** *Hospital La Paz. Madrid.*

**Grupo de trabajo de Técnicos de Anatomía Patológica de la SEAP:**

**Virginia de Lucas López.** *Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Madrid.*

**Libro Blanco:**

**Esther Roselló.** *Hospital General Universitario. Castellón.*

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID19) fue declarada pandemia por la Organización Mundial de la Salud (WHO) el 11 de marzo de 2020. Es la primera pandemia causada por un coronavirus, *severe acute respiratory syndrome coronavirus-2* (SARS-CoV2), que es un miembro de la familia de beta coronavirus [1]. La emergencia surge en diciembre de 2019 con casos comunicados desde Wuhan, capital de Hubei, provincia sur central de la República Popular de China y desde allí se extiende a más de 190 países por todo el mundo. El conocimiento exacto de su fisiopatología, su curso y su tratamiento no se han entendido hasta bien avanzada la pandemia.

En España el primer caso fue diagnosticado el 31 de enero de 2020 en La Gomera y el primer fallecimiento conocido ocurrió el 13 de febrero en Valencia. Se estima que la pandemia ha causado en España más de 70.000 muertes, 50.000 de ellas confirmadas por PCR. Redactamos este artículo doce meses después del comienzo de la pandemia y las distintas fuentes confirman que al menos 1,8 millones de personas en todo el mundo han muerto como consecuencia de la COVID-19. Aunque los datos no son exactos, debido a los desiguales registros de los países, si se conoce con fuerte evidencia la transmisión aérea de este virus, creando muchísimos asintomáticos silenciosos, lo que ha provocado un estado de alarma generalizado que ha tenido varias manifestaciones: ansiedad y pánico en la primera ola y desconcierto en la segunda y tercera olas porque, aunque ya se dispone de una vacuna, han surgido variantes mutacionales del virus que pueden llegar a hacerlo hasta un 60% más infeccioso. De cualquier forma, aún con el enorme esfuerzo que debe hacerse en materia de salud pública, no se conseguirán niveles de inmunización seguros hasta, al menos, un año desde la puesta en marcha del programa de vacunación poblacional (finales del 2020 en España).

Por todas estas razones, y en consonancia con el resto de Sociedades Europeas de Patología, la Junta Directiva de la SEAP encarga al Grupo de Gestión Aplicada y Calidad la elaboración de unas recomendaciones ajustadas a los cambios en bioseguridad que la pandemia de SARS-CoV2 ha introducido en la actividad diaria de los servicios de anatomía patológica. Si bien la rutina sigue siendo la misma y los medios de los que disponemos para realizarla no han variado sustancialmente, el cambio, desde el punto de vista de este grupo de trabajo, se ha producido en la *percepción del riesgo* que tenemos respecto a las muestras que recibimos y a las medidas que debemos de adoptar en su procesamiento.

Durante esta pandemia, debemos considerar que cualquier muestra biológica humana, obtenida en la práctica habitual y cuyo fin sea un diagnóstico clínico, puede ser portadora de SARS-CoV2 y poner en peligro nuestras vidas. La muestra ya no es sólo un material biológico con fines diagnósticos, sino que puede convertirse en el vector de transmisión de una enfermedad que ha cobrado relevancia por generar una pandemia. Ya conocíamos los riesgos con VIH, VHB, Ébola... pero nunca hemos tenido que adoptar pautas procedimentales generales como las que ahora nos vemos obligados a incorporar a nuestra rutina. La elaboración de estas recomendaciones ha requerido una visión multidisciplinar de varios grupos de trabajo de la SEAP y las propuestas deben conseguir un doble objetivo: por un lado, reducir el riesgo de infección para los profesionales de nuestros servicios y por otro, seguir manteniendo la calidad de nuestras prestaciones durante esta pandemia.

Por otro lado, una preocupación manifiesta de la Junta Directiva constituye el debate la era post COVID-19. Lo que aporta este documento no es sino una aproximación, tal vez necesaria, para abrir este debate, siempre asumiendo que probablemente hemos dejado variables pendientes de discusión. Debe entenderse este apartado como un punto de partida que deberá tomar tierra en cada uno de los servicios con su propia realidad, su propio personal y en el contexto en el que desarrolla su trabajo.

**Figura 1.** Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos (NIH). Una imagen digitalmente aumentada de una muestra de un paciente que presenta células (en verde) marcadamente infectadas con la partícula de virus SARS-CoV2 de color púrpura.



## **DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL RIESGO ASOCIADO A SARS-COV2: ESTRATEGIAS PARA SU REDUCCIÓN DURANTE LA PANDEMIA**

### **EL RIESGO ASOCIADO A COVID-19**

Tal como indican las pautas de bioseguridad de laboratorio para el manejo y procesamiento de muestras asociadas con la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) [2], la evaluación del riesgo biológico es un proceso analítico que comprende diferentes pasos: a) caracterización del peligro (evaluación de riesgos) y b) definición de una estrategia de reducción de riesgos (mitigación de riesgos).

La OMS [3] clasifica el riesgo intrínseco por agentes infecciosos en 4 grupos (tabla 1). De acuerdo al consenso internacional, COVID-19 debe ser clasificada como una enfermedad causada por un agente biológico del grupo 3 (RG3): *Alto riesgo individual, bajo riesgo comunitario. Un agente patógeno que pueda causar una enfermedad grave en el hombre y presente un serio peligro para los trabajadores; existe el riesgo de que se propague en la colectividad; pero existen generalmente una profilaxis o tratamientos eficaces* [4].

Los datos aportados por el Ministerio de Sanidad de España indican que, en los primeros días de 2021, el número de casos confirmados en el mundo era de 83.715.617, en Europa de 26.282.179 y de 1.958.844 en España. Entre los casos comunicados a la OMS, el 3% fueron críticos, el 15% severos y el 82% leves [5]. Aun cuando el número de pacientes que necesitan hospitalización es bajo, un metanálisis realizado con 50.466 pacientes hospitalizados mostró que el 18% tenía una enfermedad grave y que el 15% desarrolló un síndrome de distrés respiratorio agudo [6]. Si bien el brote de COVID-19 ha sido en promedio menos severo que el de SARS, en el cual la mayoría de pacientes tenían enfermedad grave y de ellos el 20-30% requirió cuidados intensivos (incluida la ventilación mecánica), su carácter de pandemia limita la utilización de los recursos y obliga a reducir al máximo la transmisión del virus. En el brote de COVID-19 en China la duración de la diseminación viral varió de 8 a 37 días. Los supervivientes tuvieron una duración media de contagiosidad de 20 días y ésta se mantuvo hasta la muerte en los casos fatales [7].

**Tabla 1.** Clasificación del riesgo intrínseco por agentes infecciosos. Fuente: *World Health Organization. Laboratory biosafety manual*. 3rd ed. Geneva, 2004. <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety>

<b>Agente biológico</b>	Microorganismos, con inclusión de los genéticamente modificados, cultivos celulares y endoparásitos humanos, susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad.
<b>Grupo de Riesgo 1 (riesgo individual y comunitario nulo o bajo)</b>	Agente biológico que resulte poco probable que cause enfermedad en el hombre.
<b>Grupo de Riesgo 2 (riesgo individual moderado, riesgo comunitario bajo)</b>	Un agente patógeno que pueda causar una enfermedad en el hombre y pueda suponer un peligro para los trabajadores; es poco probable que se propague a la colectividad; existen generalmente profilaxis o tratamientos eficaces.
<b>Grupo de Riesgo 3 (alto riesgo individual, bajo riesgo comunitario)</b>	Un agente patógeno que pueda causar una enfermedad grave en el hombre y presente un serio peligro para los trabajadores; existe el riesgo de que se propague en la colectividad; pero existen generalmente una profilaxis o tratamientos eficaces.
<b>Grupo de Riesgo 4 (alto riesgo individual y comunitario)</b>	Un agente patógeno que cause una enfermedad grave en el hombre y suponga un serio peligro para los trabajadores; existen muchas probabilidades de que se propague en la colectividad; no existen generalmente una profilaxis o un tratamiento eficaces.

## EL RIESGO ASOCIADO A ANATOMÍA PATOLÓGICA

La magnitud de todos estos datos induce a crear una estrategia para la reducción del riesgo en nuestros servicios, que debe abordarse desde cuatro puntos de vista:

1. Niveles de bioseguridad en el laboratorio
2. Tipo de equipos de protección individual
3. Tipos de infraestructura y equipamiento
4. Formación del personal involucrado



## Niveles de bioseguridad en el laboratorio de anatomía patológica

La bioseguridad en los laboratorios se clasifica en 4 niveles (BSL-1 a BSL-4) según el manual de bioseguridad de la OMS (tabla 2) y es recogida en la legislación española en el *Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo*.

**Tabla 2.** Relación de los grupos de riesgo con los niveles, las prácticas y el equipo de bioseguridad.

Grupo de riesgo	Nivel de Bioseguridad	Laboratorio tipo	Prácticas en laboratorio	Equipamiento de seguridad
1	Nivel 1 Bioseguridad básica	Docencia básica e investigación	GMT	Ninguna; trabajo de banco abierto
2	Nivel 2 Bioseguridad básica	Servicios de salud primaria; servicios de diagnóstico, investigación	GMT plus más ropa protectora, señal de peligro biológico	Banco abierto más BSC para posibles aerosoles
3	Nivel 3 Bioseguridad de contención	Servicios especiales de diagnóstico, investigación	Como nivel 2 más ropa especial, acceso controlado, flujo de aire direccional	BSC y / u otros dispositivos primarios para todas las actividades
4	Nivel 4 Bioseguridad de máxima contención	Unidades de patógenos peligrosos	Como nivel 3 más entrada de esclusa de aire, salida de ducha, eliminación de desechos especiales	BSC Clase III, o trajes de presión positiva junto con BSC Clase II, autoclave de dos extremos (a través de la pared), aire filtrado

BSC, (*biological safety cabinet*) cabina de seguridad biológica; GMT, (*good microbiological techniques*) buenas técnicas microbiológicas. Fuente: *World Health Organization. Laboratory biosafety manual*. 3rd ed. Geneva, 2004. <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety>

Sin embargo, es necesario definir procedimientos que minimicen el riesgo en todos los laboratorios que manipulen células y tejidos. Las recomendaciones de bioseguridad asociadas a COVID-19 realizadas por la OMS en mayo de 2020 sostienen que todos aquellos laboratorios que trabajen con procedimientos no propagativos (*non-propagative diagnostic laboratory work*) deben contar con una instalación del nivel 2 de bioseguridad (BSL2) [8]. Aunque este documento no se refiere específicamente a laboratorios que manipulan células y tejidos, tal como dice Fernando Lopez-Rios y col. [9], las actividades de patólogos y personal técnico dentro de tales laboratorios puede considerarse «no propagativa». Del mismo modo, *The Centers for Disease Control and Prevention* [10] aconseja que las actividades de patología quirúrgica y análisis moleculares realizados con muestras pertenecientes a pacientes afectados por COVID-19, pero fijadas o inactivadas por formol, deben llevarse a cabo en un laboratorio con nivel 2 de bioseguridad (BSL2). Debemos tener en cuenta que el nivel de seguridad está diseñado para proteger al personal del laboratorio, al medio ambiente y a la comunidad. Además, debe considerarse que el nivel de bioseguridad requerido en los laboratorios se deriva de la caracterización del riesgo y no del grupo de riesgo al que pertenece el agente patógeno. Así un laboratorio que cultiva un agente patógeno vivo (RG3) requerirá niveles de bioseguridad más altos que otro que trabaja con el mismo agente patógeno inactivado en servicios de diagnóstico (RG2).

En España, el manejo de muestras para el personal de los laboratorios clínicos (bioquímica, hematología, inmunología, anatomía patológica y microbiología) es definido por las unidades de prevención de riesgos laborales como laboratorios de nivel de bioseguridad BSL-2. Las prácticas de trabajos estándares descrita, en el *Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV2)*, por Ministerio de Sanidad [11] a realizar en una instalación BSL-2 son:

- Examen anatomopatológico y procesamiento de tejidos fijados con formol o tejidos inactivados.
- Estudios de microscopía electrónica con rejillas fijadas con glutaraldehído.
- Examen de rutina de cultivos bacterianos y fúngicos.
- Tinciones de rutina y análisis microscópico de frotis fijados.
- Empaquetado de muestras para su transporte a laboratorios de diagnóstico.
- Muestras inactivadas (p. ej. muestras en tampón de extracción de ácidos nucleicos)

En el mismo documento se describen las actividades que implican la manipulación de muestras potencialmente infecciosas que deben realizarse, como mínimo, en una cabina de seguridad BSC de Clase II. Por tanto, se debe realizar una evaluación de riesgo específica del sitio para determinar si se precisan mayores precauciones de seguridad en caso de:

- Alicuotar y/o diluir muestras
- Inactivación de muestras
- Inoculación de medios de cultivo bacterianos o micológicos
- Preparación y fijación química o térmica de frotis para análisis microscópico.

### **Tipos de equipos de protección individual para el laboratorio de anatomía patológica**

La SEAP/SEC en su documento del 30 marzo 2020 [12] ya describe que:

- El procesado de la muestra en fresco se deberá realizar bajo campanas de seguridad (flujo laminar), siempre que estén disponibles (altamente recomendable).
- El personal técnico deberá utilizar las protecciones recomendadas: bata verde desechable, guantes y mascarilla quirúrgica, FFP2 o FFP3. No es necesario el uso de gafas protectoras -si se trabaja bajo una campana-.
- Una vez procesada la muestra se deben desechar la bata y los guantes y depositarlos juntos en un contenedor específico para material contagioso.
- Los procedimientos que puedan generar aerosoles de partículas finas (p. ej. agitación o sonicación de muestras en tubo abierto) deberán realizarse en una campana de seguridad biológica de clase II y deberán usarse dispositivos de contención física adecuados (rotores de centrifuga adecuados, cubetas de seguridad para la centrifuga, rotores sellados).
- Mascarillas quirúrgicas, son las que el personal sanitario deberá utilizar preferiblemente durante su jornada laboral. Estas durarán 24 horas y se recomienda cambiar si se detecta algún deterioro o suciedad en ellas.
- Se recomienda llevarlas durante toda la jornada laboral aun cuando no exista exposición directa en la manipulación con muestras COVID-19+. Se recomienda cambiarlas todas las veces que sea necesario previo al lavado de manos. Es importante hacer la sustitución de la mascarilla con manos limpias. También es necesario ajustarse correctamente la mascarilla.
- Mascarillas FFP2/FFP3, es recomendable utilizar este tipo de mascarillas en situaciones en las que se manipulen muestras confirmadas COVID-19+ o potencialmente sospechosas y puedan producirse aerosoles. Las mascarillas FFP2/FFP3 pueden tener una reutilización semanal, siempre que no muestren indicios de deterioro. Para preservar su limpieza se recomienda poner una mascarilla quirúrgica encima y evitar manchados accidentales. Es necesario ajustarse correctamente la mascarilla.

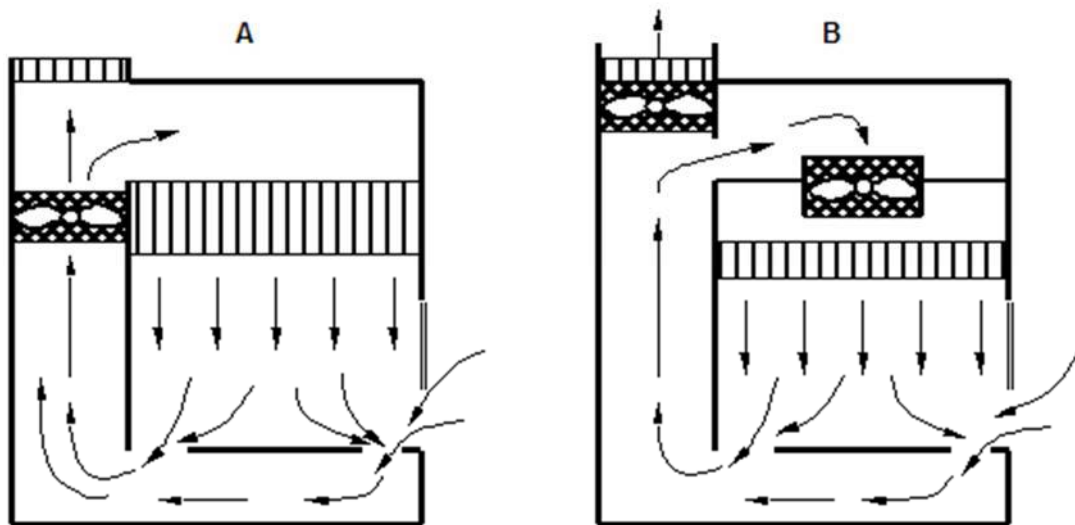
## Tipos de infraestructura y equipamiento para el laboratorio de anatomía patológica

Todas las actividades que impliquen el uso de material potencialmente infeccioso no fijado/fijado de forma no adecuada, deben llevarse a cabo en campanas de bioseguridad. Constituyen el principal elemento del equipo de contención física del laboratorio, sirviendo de barreras primarias para evitar el paso de aerosoles a la atmósfera de trabajo.

Estas estructuras están diseñadas para proteger al usuario y al ambiente de los riesgos asociados al manejo de material infeccioso y de otros materiales biológicos peligrosos, excluyendo productos radiactivos, tóxicos y corrosivos, para los cuales se recomiendan otros tipos de cabinas. Hay de tres clases: I, II y III. Nos ocuparemos más adelante de las requeridas dependiendo de la actividad de nuestros laboratorios.

**Cabinas de seguridad biológica de clase II [13]:** Están destinadas a proteger a los usuarios, a los materiales manipulados y al medio ambiente, de los riesgos biológicos leves o moderados.

**Figura 2.** Cabina de seguridad biológica de clase II con un sólo motor (A) y con dos motores (B). Estas cabinas están abiertas parcialmente por delante, existiendo una corriente de aire descendente de flujo laminar, uniforme y unidireccional, que atraviesa un filtro de alta eficacia. El flujo laminar que proviene del filtro protege el producto, mientras que el procedente del exterior de la cabina protege al operador. Ambos flujos de aire son conducidos a través de unas rejillas situadas en la parte delantera y trasera de la superficie de trabajo hasta un plano desde donde se redistribuye el aire.



Existen dos tipos básicos de cabina de seguridad de clase II: Tipo A con un solo motor y tipo B con dos motores, si bien ninguno de los dos tipos previene de las exposiciones por contacto directo con los materiales o agentes infecciosos.

Cabina de seguridad biológica de tipo II clase A: El volumen de aire recirculado sobre el área de trabajo en estas cabinas es del 70%, siendo extraído el 30% restante. La velocidad del aire de entrada, para una abertura frontal de 20 cm, debe ser del orden de 0,4 m/s. En cuanto a la velocidad del aire del flujo laminar descendente se recomienda que no sea inferior a 0,4 m/s.

Cabina de seguridad biológica de tipo II clase B: En estas cabinas, el volumen de aire recirculado sobre el área de trabajo es del 30%, mientras que el 70% restante es extraído. La velocidad del aire de entrada para una abertura frontal de 20 cm debe ser de unos 0,5 m/s y la del aire del flujo laminar descendente de 0,25 m/s, aproximadamente.

## Formación del personal involucrado en laboratorio de anatomía patológica

El Ministerio de Sanidad en el marco del Consejo Interterritorial de Salud, publicó en 2015 una Guía de Bioseguridad para los profesionales sanitarios en donde se detalla de manera precisa qué debe constituir la formación básica [14] en estas materias. Debe diseñarse un módulo de formación específica según la especialidad implicada y en dicho módulo debe contemplarse todas las particularidades de cada procedimiento de trabajo para valorar los riesgos de un modo más concreto.

Por supuesto será necesario evaluar la actividad formativa para asegurar la consecución de los objetivos marcados y mejorar la calidad de la formación dada. Se debe evaluar tanto la cobertura de la formación como el impacto de esta formación en la adherencia al cumplimiento de los procedimientos y en la disminución de accidentes.

Como norma general, deberemos trabajar conceptos que son básicos para las buenas prácticas y procedimientos microbiológicos que deben seguirse según lo recomendado por la OMS y el CDC. Estas incluyen la formación a todo el personal en el uso del equipo de protección, limitación de acceso al laboratorio, lavado frecuente de manos y uso de EPIs. Por otro lado, hay que hacer visibles algunas consideraciones respecto a las superficies de trabajo o al «riesgo integral» que deben entrar a formar parte de la rutina a implementar y mantener en esta pandemia.

El **lavado de manos** debe realizarse minuciosamente con agua y jabón durante al menos 20 segundos. Como alternativa, si estos no estuvieran disponibles, se puede usar un desinfectante de manos a base de alcohol que contenga al menos un 62% de concentración.

El **uso de EPIs** incluye guantes para todos los procedimientos, una bata desechable o bata de laboratorio abotonada, protección para los ojos y, cuando sea necesario, usar una máscara o pantalla protectora. Debe evitarse tocar las membranas mucosas de los ojos, la nariz y la boca.

Utilización de **cabinas de seguridad** siempre que se desarrollen procedimientos con riesgo de producir aerosoles peligrosos, como centrifugación, trituración, mezclado, agitación energética, apertura de envases cuya presión interior difiera de la exterior.

Además, debido a que el **virus puede permanecer viable en las superficies** (especialmente las superficies de plástico y de acero inoxidable) hasta 72 horas [15], se recomienda descontaminar todas las superficies de trabajo varias veces al día. Aparte de los bancos o poyatas del laboratorio, esto incluye descontaminación de teclados de los ordenadores, teléfonos y áreas de microscopios que se tocan con frecuencia. Las sustancias químicas involucradas incluyen, entre otras, etanol (concentración mínima de 62% -71%), peróxido de hidrógeno al 0,5%, amonio cuaternario, hipoclorito de sodio (0,1%), y una variedad de soluciones ácidas en diversas concentraciones. Estas sustancias deben usarse con las instrucciones de desinfección recomendadas por el fabricante y las recomendaciones de tiempo de contacto (es decir, el tiempo que la superficie permanece húmeda que puede oscilar entre 30 segundos y 10 minutos) adecuadas para inactivar el coronavirus humano.

Llegados a este punto, debemos hacer hincapié respecto a que la COVID-19 debe mantenernos **en una situación de alerta permanente**. Los procesos de automatización, en mayor o menor grado, implantados en nuestros laboratorios implican diversos puntos de contacto manual, necesarios para la puesta en marcha del sistema y pueden constituir un riesgo de contaminación o transmisión, ya que el sistema no es autónomo. Una política de buenas prácticas es considerar la totalidad del servicio bajo el concepto de «**riesgo integral**» y cualquier área susceptible de transmitir patógenos.

Por último, y de cara a una evaluación sobre la formación recibida por el personal de un laboratorio BLS-2 se deben incluir cuestiones sobre: (a) descontaminación diaria de todas las superficies de trabajo, (b) uso de equipos de protección personal, (c) eliminación adecuada del material contaminado, (d) prevención de lesiones en la piel y exposiciones de las membranas mucosas, (e) todos los procedimientos que pueden causar infección por aerosoles o salpicaduras y la utilización de una cabina de seguridad biológica (BSC) y (f) percepción de riesgo integral.

## ESTRATEGIAS PARA LA REDUCCIÓN DEL RIESGO BIOLÓGICO EN EL TRANSPORTE DE MUESTRAS

Para tener una práctica segura de control de infecciones en medio de un brote de COVID-19, debe diseñarse un protocolo robusto de transporte de muestras. Según las pautas de la OMS [16], **todas las muestras biológicas (incluidos hisopos, fluidos corporales, sangre, heces) deben considerarse potencialmente infecciosas** y deben utilizarse los equipos de protección individual (EPIs) adecuados mientras se manipulan. Con respecto al transporte, también seguiremos las recomendaciones de la OMS [17] atendiendo a las siguientes situaciones:

- Las **muestras sospechosas** de COVID-19, deben ser transportadas al laboratorio central en bolsas con cierre hermético de riesgo biológico, dentro de una caja criogénica a prueba de fugas y teniendo en cuenta:
  - Incorporar una etiqueta de riesgo biológico claramente visible con el texto «contiene muestra COVID-19».
  - Las muestras deben entregarse en mano y no enviarse a través de un tubo neumático porque aumenta el riesgo de que se pierdan en tránsito o se produzcan derrames.
  - Se deben habilitar de forma preventiva espacios adecuados para la recepción de muestras sospechosas de COVID-19 separándolas de las demás.
- Para el resto de **muestras no sospechosas y no respiratorias** y que deban ser transportadas a un laboratorio secundario, también se deben considerar las pautas de la OMS para el transporte de muestras infecciosas. Con este fin, se recomienda que se utilice un «sistema de triple embalaje» para contener una sustancia infecciosa, que consiste en el recipiente primario, un segundo embalaje estanco para proteger el recipiente primario y una tercera capa exterior de embalaje para evitar daños físicos al embalaje secundario durante el transporte (figura 3).
- **Información clínica:** Todas las muestras deberán ir acompañadas de información clínica adecuada sobre el estado del SARS-CoV2. En particular, se debe identificar el caso sí: a) positivo para SARS-CoV2, b) sospechoso de SARS-CoV2.
- **Hoja de petición:** Como el virus puede persistir en el papel al menos durante 24h, es preferible la transmisión electrónica de solicitudes sin papel. En caso de que esto no sea posible, la hoja de petición deberá ir en bolsa aparte y siempre considerar el papel como un medio de contagio.
- Es opcional llevar un **registro diario** de pacientes u otras personas ajenas al hospital, que hayan acudido al servicio a traer o recoger algo (nombre y teléfono), con la finalidad de poderlos identificar y localizar como contactos en caso de contagio. Este registro deberá llevarse en la zona de recepción de muestras.

Sistema básico de embalaje/envasado triple. Como su nombre lo indica, cualquier sistema de embalaje/envasado triple utilizado para contener una sustancia infecciosa debe constar de tres capas.

- un recipiente primario;
- un segundo embalaje/envase hermético e impermeable o a prueba de derrames para encerrar y proteger el recipiente primario; y
- una tercera capa exterior de embalaje/envasado que se utiliza para proteger el embalaje/envase secundario de daños físicos durante el transporte

El recipiente primario, el cual contiene la sustancia infecciosa, debe ser hermético e impermeable a la sustancia que contiene; es decir, deberá ser a prueba de fugas si la sustancia es líquida, o a prueba de derrame si la sustancia es un sólido. El recipiente primario deberá estar debidamente etiquetado en cuanto a su contenido.

El **recipiente primario** no debe perforarse, romperse, debilitarse o verse afectado al entrar en contacto con la sustancia infecciosa. Por ejemplo, el recipiente primario no deberá alterar su

integridad al entrar en contacto con el medio de preservación utilizado para conservar la muestra de un paciente.

Si la sustancia infecciosa está en forma líquida o semilíquida, el recipiente primario debe estar envuelto en el suficiente material absorbente en caso de rotura o fuga.

Un **segundo embalaje/envase** hermético e impermeable o a prueba de derrames se utiliza para cubrir y proteger el recipiente primario y su material absorbente.

Podrán colocarse varios recipientes primarios en un solo embalaje/envase secundario, siempre que contengan sustancias infecciosas de la misma clase. Si el recipiente primario es frágil, cada uno de estos debe envolverse y colocarse en el embalaje/envase secundario de forma individual o de manera que se impida el contacto entre sí. Puede ser necesario un material de amortiguación para asegurar los recipientes primarios dentro del embalaje/envase secundario.

Una **tercera capa de embalaje/envase exterior** se utiliza para proteger el embalaje/envase secundario de daños físicos durante el transporte. Por lo tanto, esta capa debe tener una resistencia adecuada al peso, tamaño y composición de los paquetes interiores, a fin de garantizar la protección de los mismos. La dimensión exterior mínima debe ser de al menos 100 mm.

Los formularios de datos de espécimen, cartas, documentación suplementaria y otros tipos de información que identifiquen o describan la sustancia infecciosa deben colocarse entre el embalaje/envase secundario y las capas externas del embalaje/ensado. Si es necesario, estos documentos se pueden pegar con cinta adhesiva en el embalaje/envase secundario.

**Figura 3.** Sistema básico de embalaje/ensado triple. Ilustración creada para la 4ª edición del Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la WHO



## ESTRATEGIAS PARA LA REDUCCIÓN DEL RIESGO BIOLÓGICO EN LA MUESTRA HISTOLÓGICA

### Principios universales

El **proceso de fijación** formólica utilizado en nuestra rutina inactiva muchos virus, por ejemplo, Ébola [18]. La inactivación de los coronavirus ya fue demostrada por Darnell y col. [19], determinando que el formol y el glutaraldehído inactivaban el SARS-CoV2 de una manera dependiente de la temperatura y del tiempo. Si bien la incubación a 4° C inhibía el efecto de estos fijadores químicos, a 37° C o temperatura ambiente, el formol disminuía significativamente la infectividad del virus el día 1, mientras que el glutaraldehído inactiva el SARS-CoV2 después de incubaciones de 1 a 2 días.

Duan y col. [20] encontraron que varios coronavirus se volvieron no infecciosos después de los siguientes tiempos y temperaturas de exposición: 90 min a 56°C, 60 min a 67°C y 30 min a 75°C. La inclusión en parafina utiliza una temperatura de 60 a 65°C > 2 horas, por lo tanto, es apropiado considerar que el bloque de tejido fijado con formol e incluido en parafina tiene un riesgo bajo de infectividad por coronavirus.

Debemos valorar, no obstante, modificaciones en la recepción de muestras sobre todo la de piezas grandes quirúrgicas. Las muestras quirúrgicas pueden llegar sin fijar o con una fijación parcial y, por tanto, hay que tener en cuenta todos los criterios de bioseguridad expuestos para manipular estas piezas.

Las recomendaciones que hace la Sociedad Italiana de Anatomía Patológica y Citopatología Diagnóstica [21] es la de suspender el envío de piezas en vacío sin formol si el nivel de seguridad del laboratorio no garantiza una protección adecuada. Aquellas piezas enviadas en formol pero que requieran secciones antes de su procesamiento, se manipularán con la habilidad suficiente sin sacarlas de su suspensión en formol y las que requieran inyección directa en el órgano (p. ej. pulmón) se manipularán igualmente en la suspensión de formol.

Como norma general, no se realizará la talla de la pieza hasta su fijación completa, aunque se han descrito excepciones a esta norma. Guerini-Rocco y col. [22] comunican la detección de SARS-CoV-2 en muestras de resección quirúrgica del carcinoma de células escamosas de la lengua, fijadas en formol e incluidas en parafina, de un paciente que desarrolló COVID-19 posquirúrgico. Se detectó ARN de la cepa SARS-CoV2 en el tumor y en las muestras de glándula submandibular normal utilizando PCR a tiempo real. No se encontró, sin embargo, ARN viral en los ganglios linfáticos metastásicos o reactivos. Los autores demuestran que el ARN del SARS-CoV2 se puede detectar en muestras histopatológicas de rutina incluso antes del desarrollo de la enfermedad COVID-19 en el paciente portador. Estos hallazgos pueden brindar información importante sobre los posibles sitios de infección o reservorio de virus y resaltan la necesidad de una manipulación y fijación adecuadas, antes del procesamiento de la muestra.

### Principios particulares

Con esta misma base, parece prudente abstenerse de realizar **secciones congeladas** de pacientes que sean positivos/sospechosos de infección por SARS-CoV2 [23]. Esta recomendación es particularmente importante cuando se trata de muestras de las **vías respiratorias superiores e inferiores**. Si este tipo de actividad fuera absolutamente necesaria, el personal que manipule las muestras deberá ceñirse a estrictos criterios de bioseguridad: las secciones congeladas se realizarán preferentemente en crio-micrótomos que permitan la contención de aerosoles -si no se dispone de ellos, los crio-micrótomos se limpiarán y desinfectarán utilizando alcohol absoluto (para evitar la formación de hielo) después de cada procesamiento-. El personal deberá estar debidamente instruido y utilizar siempre el EPI adecuado.

## ESTRATEGIAS PARA LA REDUCCIÓN DEL RIESGO BIOLÓGICO EN LA MUESTRA CITOLÓGICA

Aunque la capacidad diagnóstica por citología de lesiones asociadas a COVID-19 está limitada, la exposición del personal sanitario al virus, en la variedad de muestras citológicas no fijadas recibidas de manera rutinaria, merece especial atención. Del mismo modo que en el SARS, la citología fundamentalmente se utiliza para descartar coinfecciones respiratorias, las características citológicas que se observan en los esputos son inespecíficas y reflejan un patrón de lesión pulmonar aguda subyacente. Consisten en la presencia de un mayor número de macrófagos formando agregados, cambios citoplasmáticos en forma de grandes vacuolas/citoplasmas espumosos, o cambios nucleares como multinucleación / vidrio esmerilado [24]. Los hallazgos comunicados en pacientes con MERS, muestran un alto número de neutrófilos y macrófagos en lavados bronco alveolares [25]. En base a la histopatología del SARS, MERS y COVID-19, las muestras de BAL también pueden contener metaplasia escamosa y signos de reparación, junto con la presencia de células multinucleadas y neumocitos tipo II atípicos, con agrandamiento celular y nuclear, nucléolos prominentes y cromatina laxa [26].

En algunos casos, el líquido de lavado bronco alveolar es obtenido para la identificación viral [27,28,29] porque ocasionalmente es positivo cuando los frotis de naso y oro faringe resultan negativos [30]. Por esta razón, una alícuota de esta muestra puede mandarse al laboratorio de citología.

### Principios universales

Del mismo modo que ocurría con el SARS, sabemos que el SARS-CoV2 se encuentra en muestras fecales y de orina, además de en muestras de sangre periférica y respiratorias. El SARS-CoV2 puede estar presente en pacientes no diagnosticados, en aquellos pre sintomáticos, en infecciones asintomáticas o mínimamente sintomáticas y en pacientes convalecientes, que aún pueden ser contagiosos. Dado que en la mayoría de las muestras el diagnóstico clínico puede no estar indicado en la hoja de solicitud, **todas las muestras recibidas en fresco deben considerarse potencialmente infecciosas.**

### Principios particulares

Todos los procedimientos técnicos deben realizarse de una manera que minimice la generación de gotitas o aerosoles. Los pasos preparatorios que pueden generarlos incluyen: la expulsión de aspirados de la aguja o jeringa, la extensión del material aspirado y la desecación de los frotis, bien al aire o con calor, como ocurre durante *Rapid On Site Evaluation (ROSE)* [31].

Se debe evitar agitar los frotis a mano o usar ventiladores de mano para acelerar el secado. ROSE es una medida importante para garantizar la idoneidad de las muestras. Sin embargo, durante una pandemia de un virus con transmisión respiratoria, se debe utilizar el juicio clínico para determinar si la ROSE es absolutamente necesaria, minimizando su realización. Si finalmente se decide llevar a cabo, hay que hacerlo con el equipo de protección personal (EPI) atendiendo a las indicaciones de bioseguridad propuestas [25].

La misma lectura deberemos hacer respecto al mantenimiento de una **consulta de PAAF**. Lo aconsejable es suspender su actividad y considerar individualmente la necesidad de la PAAF caso por caso, sopesando los riesgos y beneficios del procedimiento para cada paciente y para los sanitarios implicados.

**Pasos preparatorios realizados por técnicos** que pueden conducir a la formación de aerosoles/gotitas incluyen la sonicación de muestras en tubo abierto, la apertura de envases, quitar las tapas de los tubos, mezclar, agitar vigorosamente, pipetear, dividir en alícuotas, diluir, centrifugar los fluidos y desechar los sobrenadantes. Todos estos pasos deben realizarse de acuerdo a las pautas



establecidas para laboratorios BSL-2, en una campana de bioseguridad adecuada y si se requieren dispositivos de contención física (rotores, cubetas), estos deberán incluir sistemas de sellado. Todas estas operaciones se realizarán con la utilización de los EPI, recomendados para estos procedimientos de los que posteriormente se desecharán la bata y los guantes, que serán depositados en un contenedor específico para material contagioso, tal como hemos descrito anteriormente.

Dado que el virus se inactiva mediante formol y radiación gamma, la mayoría de las muestras de citología se deben fijar en soluciones de formol o alcohol >70%, que se consideran eficaces para destruir este virus. El procesado de **bloques celulares** con su inclusión en parafina también garantiza la inactivación del virus.

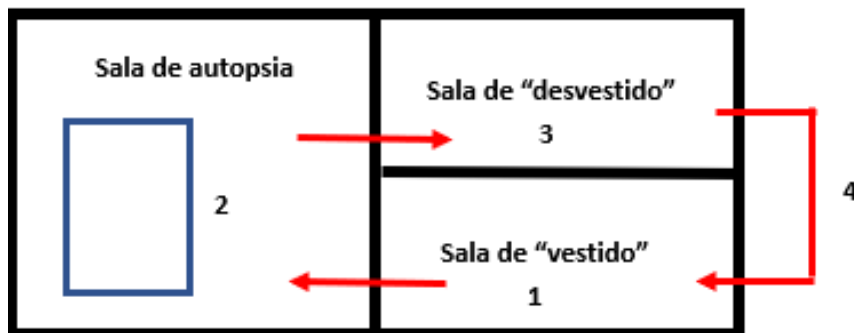
No está confirmado que los fijadores que utilizan soluciones alcohólicas mucho más débiles, como **PreservCyt** y **CytoLyt** (Hologic, Inc, Marlborough, MA) y **SurePath** (BD, Franklin Lakes, NJ) inactiven adecuadamente el virus. Ante la duda, pueden estar indicadas precauciones adicionales, como el uso de guantes, al manipular las preparaciones citológicas procesadas con estos fijadores. Otra opción sería sumergir los portaobjetos en alcohol al 95% (o similar) durante un par de minutos que inactivaría el virus, aunque también borraría las marcas de rotulador en los portaobjetos. Se pueden probar otros desinfectantes de superficies, especialmente aquellos con tiempos de contacto cortos y determinar la practicidad de su uso en estos portaobjetos.

### ESTRATEGIAS PARA LA REDUCCIÓN DEL RIESGO BIOLÓGICO EN LAS AUTOPSIAS

Como se ha reiterado a lo largo de este capítulo, el SARS-CoV2 es considerado, según consenso científico internacional, un agente de riesgo biológico 3 (clasificación Hazard). En consecuencia, las autopsias de pacientes fallecidos con infección activa por este virus deberán realizarse en salas de autopsia acondicionadas con un nivel de bioseguridad 3, conocidas como BSL-3.

Como se recuerda en el capítulo específico sobre «Bioseguridad en las salas de autopsias» publicado en el Libro Blanco de la SEAP de 2019 (Prieto y col.) [32] y se reitera en el documento específico «Procedimiento para el manejo de cadáveres de casos de COVID-19» publicado por el Ministerio de Sanidad en marzo de 2020, así como en sus sucesivas actualizaciones [33]; las instalaciones deben cumplir los siguientes requisitos mínimos. Estos requisitos, a falta de una reglamentación específica para las salas de autopsias, **se basan a su vez en los requisitos de los laboratorios BSL** [34,35,36]:

Ver tabla 3. Debemos reiterar la necesidad de mantener los circuitos independientes de limpio/sucio:



**Tabla 3.** Medidas obligatorias para sala de autopsias BSL-3.

<b>MEDIDAS OBLIGATORIAS SALA de AUTOPSIAS BSL-3</b>		
<b>LOCALIZACIÓN</b>	Aconsejable: <b>separada</b> de otras actividades que se desarrollen en el mismo edificio, mediante un vestíbulo o sala de doble puerta que puede servir como vestuario, ducha y almacén para los EPIs (antesala). (Lo más correcto y eficiente sería diseñar todas como salas BSL-3)	
<b>DOBLES PUERTAS DE ACCESO</b>	<b>cierre automático,</b> <b>mecanismo interbloqueo</b> (solo una abierta al mismo tiempo)	
<b>SALA HERMÉTICA</b>	<b>sellado de juntas externas</b> (marco y puertas, entrada de tuberías)	Para garantizar adecuada <b>estanqueidad</b> y <b>descontaminación</b> .
	<b>Ventanas: cristales resistentes a la rotura</b>	Permanecerán <b>siempre cerradas y selladas</b>
<b>VENTILACIÓN</b>	Aconsejable entrada y salida del aire controladas: <b>corriente de aire unidireccional</b> que vaya de los pasillos o zonas menos contaminadas hacia el interior de la sala (aire directamente al exterior sin recircular) Conseguir <b>Presión NEGATIVA</b>	<b>Dispositivo de monitorización visual:</b> indique y confirme la direccionalidad y <b>alarmas audibles</b> en la entrada del laboratorio (notificación fallos). Existen <b>equipos portátiles</b> de filtración, con 3 filtros (1, super-HEPA) que permiten la filtración y eliminación de virus, bacterias, formol y olores.
	Aire de salida: <b>filtro HEPA</b> (Antes de llegar al exterior). (contención de aerosoles)	<b>Instalación:</b> que permita la descontaminación con gases y la realización de pruebas de verificación del filtro.
	<b>nunca recircular</b> el aire a otros espacios	
	<b>12 renovaciones por hora, mínimo</b>	
<b>DESCONTAMINACIÓN para material infeccioso</b>	Autoclave, métodos químicos, incinerador	En la misma sala (preferiblemente) o en un local anexo
<b>GABINETE DE BIOSEGURIDAD</b>	Manejo de muestras pequeñas, formol u otras necesidades	
<b>CONEXIÓN DE AGUA</b>	<b>Independiente</b> de la del agua de bebida. Abastecimiento de agua potable: estará protegido contra el reflujo.	
<b>SUPERFICIES: paredes, piso, techo</b>	<b>Monolíticos y antideslizantes.</b> Facilitar la limpieza y descontaminación	
<b>CIRCUITO DE LIMPIO/SUCIO</b>	Necesario <b>SIEMPRE</b> , más evidente ante estas autopsias	
<b>DOCUMENTAR el diseño y los procedimientos operativos de la sala</b>	Aconsejable: Antes de iniciarse el funcionamiento de la sala se recomienda hacer una prueba de verificación de cumplimiento del diseño y parámetros operativos del establecimiento.	
<b>REEVALUACIONES</b>	Además, periódicamente, al menos una vez al año, se deberá hacer una reverificación, con INFORME por el organismo hospitalario o no pertinente.	

Por otro lado, deberemos ser más estrictos con las normas de funcionamiento durante la autopsia con este tipo de cadáveres:

**Tabla 4.** Normas de funcionamiento en la sala de autopsias.

NORMAS FUNCIONAMIENTO EN LA SALA DE AUTOPSIAS	
<b>PERSONAL</b>	<p>Reducir al mínimo imprescindible para la realización de la autopsia el número de personas presentes: un patólogo experto, un residente y un TSAPyC/auxiliar.</p> <p>Evitar personal adicional, incluyendo al personal de limpieza.</p> <p>Elaborar un <b>listado</b> de todo el personal, quien debe <b>auto vigilar</b> cualquier síntoma respiratorio en los 14 días posteriores a la última exposición a un caso confirmado para realizar el diagnóstico oportuno y proceder a su aislamiento, si fuera el caso.</p>
<p><b>PUERTAS DE LA SALA:</b> deben mantenerse <b>cerradas</b></p> <p>El médico anatomopatólogo y auxiliar de autopsia no saldrán de la sala de autopsias hasta que no hayan terminado las autopsias que tengan asignadas.</p> <p>Se impedirá la entrada de cualquier persona ajena durante la práctica de la autopsia.</p>	
<p>Preparar todo el <b>equipo necesario a mano</b> para evitar salir del área de la autopsia. Es aconsejable disponer de un <b>checklist</b>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Instrumental</b> de autopsia, incluyendo <b>material estéril</b> para la toma con asepsia</li> <li>• <b>Solución para manos</b> a base de alcohol</li> <li>• <b>Jabón común</b> (líquido en lo posible, para el lavado de manos en agua limpia)</li> <li>• <b>Toallas desechables</b> (por ej., toallas de papel)</li> <li>• <b>Contenedores</b> para elementos <b>cortantes/punzantes</b></li> <li>• <b>Detergente</b> apropiado para limpieza del ambiente y <b>desinfectante</b> para la desinfección de superficies o instrumental/equipamiento</li> <li>• <b>Bolsas plásticas grandes</b></li> <li>• <b>Bolsas para desechos clínicos</b> adecuadas</li> <li>• <b>Bolsas para ropa blanca</b></li> <li>• <b>Contenedor</b> de recolección para el equipamiento usado</li> <li>• <b>Kit para microbiología</b> (set de instrumental estéril, hisopos con medio de transporte adecuado, tubos y frascos estériles para microbiología)</li> <li>• Toallitas o solución en spray con <b>isopropil-alcohol o povidona</b> para desinfección previa a la toma de muestra para microbiología (piel, tejidos)</li> </ul>	
<p>Usar <b>tijeras o bisturís con punta roma</b> para reducir el riesgo de lesiones</p>	
<p><b>Cortar</b> los órganos sobre la mesa usando una <b>esponja</b> para proteger las manos. Usar <b>guante anti corte</b></p>	
<p>Usar una presión de agua adecuada para <b>evitar salpicaduras</b></p>	
<p><b>Esterilización de los instrumentos</b> utilizados (autoclave y/o productos químicos)</p>	
<b>AUTOPSIAS CON RIESGO ASOCIADO A AEROSOLIZACIÓN DE MICROORGANISMOS</b>	<p><b>Minimizar los aerosoles:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilizar el uso de <b>sierra eléctrica</b> con sistema de <b>aspiración</b></li> <li>• <b>Evitar las salpicaduras</b> al retirar, manejar y/o lavar órganos, especialmente pulmones e intestinos</li> <li>• <b>Evitar la extracción de los pulmones y su manipulación</b> en la medida de lo posible.</li> <li>• Toma de muestras estudio <b>histopatológico:</b> fijación inmediata en</li> </ul>

	<p>formol (volumen adecuado: 10 veces el volumen del tejido), u otros autorizados (Finefix)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Las muestras para <b>Biobanco</b> se tomarán con las recomendaciones de bioseguridad establecida por los mismos.</li> </ul>
	<p><b>LIMPIEZA</b></p> <p><b>Limpiar y desinfectar las superficies</b> que se han contaminado con tejidos, líquidos y secreciones corporales.</p> <p>La deben llevar a cabo las <b>mismas personas que han realizado la autopsia</b> (minimizar el número de exposiciones al posible riesgo).</p> <p><b>Método:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Retirar</b> la mayor parte de sustancia tisular o corporal <b>con materiales absorbentes</b>.</li> <li>Limpiar con <b>agua y detergente</b>.</li> <li>Aplicar el <b>desinfectante estandarizado</b>. Si se utiliza solución con hipoclorito de sodio: mojar la superficie y dejar actuar por contacto al menos 10 minutos y enjuagar minuciosamente</li> </ul>
	<p><b>ACTUACIÓN SOBRE EL CADÁVER DESPUÉS DE LA AUTOPSIA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Introducir</b> el cadáver en un <b>sudario</b> que reúna las <b>características técnicas sanitarias de resistencia a la presión de los gases en su interior, estanqueidad e impermeabilidad</b>.</li> <li><b>Cerrar</b> el sudario y <b>pulverizar</b> con solución de <b>hipoclorito sódico</b>.</li> <li>Tras la correcta introducción del cadáver y desinfección del sudario la manipulación exterior de éste o del ataúd que la contenga <b>no comporta riesgos</b>.</li> <li>El <b>personal que intervenga en el transporte</b> deberá ser <b>informado</b> de ello previamente, así como del procedimiento a seguir en el caso de producirse un incidente</li> </ul>

Por último, no hay que olvidar que, tal y como ya se indica en el mencionado capítulo sobre bioseguridad publicado en el Libro Blanco de la SEAP de 2019, estos casos deben ser notificados al adecuado Centro de Control y Prevención de Enfermedad y su autoridad correspondiente, previo al examen post-mortem. Además, queremos aprovechar para corregir dicho capítulo, en concreto el apartado II.2.c, que aparece redactado de la siguiente manera:

- c) Salas con **Nivel de Bioseguridad 4 (BSL-4)**: Este tipo de sala de autopsia tiene el nivel adecuado para trabajar con agentes indígenas o exóticos que pueden causar enfermedades letales, sin posibilidad de vacunación o terapia eficaz, como por ejemplo virus Ebola o agentes causantes de otras fiebres hemorrágicas (arbovirus, etc.). Como principio general, **este tipo de autopsia no se puede hacer en las salas habituales de los servicios de anatomía patológica**. Ante la posibilidad de que se trate de un caso de enfermedad grave causada por agentes altamente transmisibles (S.A.R.S. por coronavirus, por ejemplo) se debe poner en conocimiento del adecuado Centro de Control y Prevención de Enfermedad y su autoridad correspondiente, previo al examen post-mortem.

Como se ha indicado en múltiples ocasiones, el virus SARS-CoV2 es un patógeno clasificado como de Riesgo Biológico 3 HG3, y no 4. La falta del espacio entre los párrafos producida por error al maquetar podría dar lugar a una interpretación errónea del texto; quedaría de la siguiente manera:

- c) Salas con **Nivel de Bioseguridad 4 (BSL-4)**: Este tipo de sala de autopsia tiene el nivel adecuado para trabajar con agentes indígenas o exóticos que pueden causar enfermedades letales, sin posibilidad de vacunación o terapia eficaz, como por ejemplo virus Ebola o agentes causantes de otras fiebres hemorrágicas (arbovirus, etc.). Como principio general, **este tipo de autopsia no se puede hacer en las salas habituales de los servicios de anatomía patológica.**

*Ante la posibilidad de que se trate de un caso de enfermedad grave causada por agentes altamente transmisibles (S.A.R.S. por coronavirus, por ejemplo) se debe poner en conocimiento del adecuado Centro de Control y Prevención de Enfermedad y su autoridad correspondiente, previo al examen post-mortem.*

## **CUANDO SARS-COV2 YA NO SEA CAUSA DE PANDEMIA**

La organización de nuestra sociedad, conviviendo grupos de personas en un mismo espacio tiene algunos riesgos y uno de ellos es la trasmisión de enfermedades infecciosas. Una primera lectura que hemos tenido que hacer en esta pandemia es la vulnerabilidad que tiene nuestra forma de vida y el alto riesgo que corremos por vivir en sociedad: no existe actividad humana sin riesgo. Otra revelación es la capacidad de adaptación que los seres vivos y los sistemas tienen tras un impacto. Esta resiliencia para *recuperar el estado inicial del sistema cuando ha cesado la perturbación a la que había estado sometido* (RAE), es, por otro lado, necesaria y propia de un ser vivo ante una situación adversa.

Así pues, desde estos dos puntos de partida debemos abordar aquello que puede venir después de la pandemia por SARS-CoV2 y que debe constituirse en mejoras para el desempeño de nuestra tarea:

### **No existe actividad humana con riesgo cero: política de bioseguridad**

La política de bioseguridad debe estar articulada en la estructura organizativa del laboratorio. Para ser útil, el amplio concepto de bioseguridad debe acoger nuestra actividad y ser un poco más preciso que el redactado en la norma ISO15189 (C5.2: *El laboratorio debe de disponer de un espacio destinado a la realización de su trabajo que esté diseñado para garantizar la calidad, seguridad y eficacia del servicio proporcionado a los usuarios y la salud y seguridad del personal del laboratorio, de los pacientes y de los visitantes.*) [37] Debemos, pues, llenar de algún contenido el concepto de bioseguridad y su aplicación en la práctica de un laboratorio de anatomía patológica. Empecemos por algunos **principios** [38] que se deben cumplir:

- **Universalidad:** Las medidas deben involucrar a todas las secciones de un laboratorio. Todo el personal, paciente o visitante deben cumplir con las normas.
- **Uso de barreras:** Crear el concepto de evitar la exposición directa a todo tipo de muestras orgánicas, potencialmente contaminantes, mediante la utilización de materiales o barreras adecuadas que se interpongan al contacto.
- **Medios de eliminación del material contaminado:** Tras el procesado, las muestras biológicas deben eliminarse sin riesgo para los operadores y la comunidad.
- **Evaluación de riesgos:** Corresponde a un proceso de análisis de la probabilidad que ocurran daños, heridas o infecciones en el laboratorio. La evaluación debe ser efectuada por el personal del laboratorio más familiarizado con el procesamiento de los agentes de riesgo. Una vez establecido el nivel de riesgo debe reevaluarse de manera permanente. La

evaluación de riesgos debe estar asociada con el manejo y con las medidas de reducción de los mismos

- **Gestión de la evaluación de riesgos:** Implica 1) identificar los riesgos, 2) establecer pautas para mitigarlos, 3) identificar los riesgos residuales, 4) evaluar la eficiencia de la contención, 5) implementar la técnica y 6) evaluar periódicamente los riesgos y revisar la metodología.

Aunque el responsable último en materia de bioseguridad es el director del laboratorio, este/a puede delegar alguna de sus obligaciones creando la figura del **responsable en bioseguridad**. Esta persona se encargará de diseñar la política de bioseguridad del laboratorio y será el/la responsable de su aplicación. Este profesional debe ser plenamente reconocible por el resto del equipo y disponer de la autoridad suficiente para la aplicación de sus cometidos que, entre otros son:

- Planifica, organiza, dirige y administra las tareas y rinde cuentas.
- Asegura que las políticas y programas de bioseguridad y bioprotección se siguen y se aplican en el laboratorio.
- Realiza auditorias periódicas de los procesos, procedimientos, protocolos, equipamiento, insumos y de la contención.
- Verifica que todo el personal ha recibido la capacitación adecuada.
- Promueve la educación continua.
- Investiga los incidentes y accidentes.
- Interpela a los responsables de las violaciones de los protocolos.
- Notifica los incidentes, accidentes y violaciones al director.
- Asegura la adecuada descontaminación y desinfección de ambientes.
- Mantiene la vigilancia en cuanto a las actitudes del personal y el mantenimiento del ambiente.
- Establece los procedimientos para el proceso, condicionamiento, transporte eliminación de los agentes peligrosos.
- Revisa periódicamente los procesos, procedimientos y los protocolos.
- Crea un plan de emergencia por incidentes de bioseguridad.
- Redacta una memoria anual.

Por último, y como ejemplo para medir la ejecución del plan de bioseguridad podemos utilizar lo expuesto por el Ministerio de Sanidad en la Guía de Bioseguridad para los profesionales sanitarios [14]. Propone una serie de indicadores para la evaluación y seguimiento de la implantación del plan, diferenciando entre indicadores de proceso e indicadores de resultado. Un indicador de proceso, como ejemplo, podría ser el Índice de adiestramiento y entre los indicadores de resultado se podrían calcular el porcentaje de conversión a bioseguridad o la tasa de exposiciones biológicas accidentales según dispositivo:

- **Índice de adiestramiento** (por categoría profesional o ámbito laboral)

$$\text{Índice de adiestramiento} = \frac{\text{Nº de profesionales formados en el uso de material}}{\text{Nº profesionales susceptibles de ser formados}} \times 100$$

- **Porcentaje de conversión a bioseguridad** (por tipo de material)

$$= \frac{\text{Nº de unidades consumidas del material de bioseguridad x periodo de referencia}}{\text{Nº total de unidades consumidas del material x periodo de referencia}} \times 100$$

- **Tasa de exposiciones biológicas accidentales** (se calcularán las tasas de exposiciones globales y por categoría laboral)

$$= \frac{\text{Nº de exposiciones biológicas accidentales ocurridas en el año}}{\text{Nº medio de trabajadores en el año}} \times 100$$

- **Tasas de exposiciones biológicas accidentales según dispositivo** (en un mismo periodo)

$$= \frac{\text{Nº de exposiciones biológicas accidentales con el material X}}{\text{Nº unidades consumidas del material X}} \times 100$$

### **Operación de retorno a la normalidad: conseguir una resiliencia que asegure la viabilidad de la recuperación asistencial frente a la incertidumbre [39]**

En estos momentos es imposible determinar, en tiempo y recursos, las necesidades para conseguir una asistencia como la que prestaba el sistema sanitario antes de marzo 2020. Tan solo mirando alguna de las cifras publicadas, podemos introducir la magnitud del problema al que nos enfrentamos.

Utilizamos como referencia la asistencia anterior a la pandemia, suspendida parcial o totalmente estos meses y alguno de los procesos asistenciales más directamente relacionados con anatomía patológica. En nuestro país se realizan 350.000 intervenciones quirúrgicas/mes [40]. La Red Española de Registros de Cáncer [41] preveía para 2020 una incidencia de cánceres de colon y recto (44.231 nuevos casos), próstata (35.126), mama (32.953), pulmón (29.638) y vejiga urinaria (22.350), linfomas no Hodgkin (9.188), cánceres de cavidad oral y faringe (8.604), páncreas (8.338), estómago (7.577), riñón (7.300) y cuerpo uterino (6.804) y el resto, excluyendo los de piel no melanomas, hasta 277.394 casos nuevos/año. Por consiguiente, la bolsa de casos demorados y de casos incidentes va a crecer considerablemente.

La magnitud de estas cifras nos hace prever un retorno a la actividad que va a requerir algo más que un compromiso inquebrantable con nuestro sistema sanitario. Las organizaciones sanitarias están expuestas a un riesgo semejante al vivido en la pandemia: el colapso del sistema. En este segundo tiempo, sería deseable compartir el mismo grado de complicidad y admiración que la sociedad ha tenido con su sistema sanitario, pero debemos estar preparados por si esto no ocurre. La presión que van a recibir nuestros dirigentes políticos será trasladada a nuestros directivos y, desde aquí, cristalizará en toda la cadena de la práctica asistencial.

Tras la COVID-19, debemos estar preparados para trabajar en **contexto de riesgo elevado**. En este contexto convivirán las medidas de bioseguridad que vamos a tener que mantener, con la presión asistencial que acortará, más de lo deseado, los plazos para realizar una práctica segura y de calidad. Por ello, del mismo modo que hemos diseñado una política de bioseguridad, tal vez debamos diseñar otra **política para la vuelta a la normalidad tras la pandemia por SARS-CoV2**. Algunas sugerencias para construir este documento incluyen:

- Cada centro es responsable de que su **entorno de trabajo sea seguro** para la salud de sus profesionales. Debemos especificar las medidas a adoptar directamente relacionadas con las propuestas en la política de bioseguridad.
- Definir con la máxima precisión una **vuelta a la normalidad escalonada y por fases**, acordando nuevos plazos de respuesta en función de las prioridades.
- Mantener de manera escrupulosa **los controles de calidad** tanto en la tecnificación como en el diagnóstico. Es conocido que la presión precipita la toma de decisiones y nos sitúa en

escenarios con errores. Asumir posturas con autoridad, en situaciones de incertidumbre, pueden inspirar seguridad y cercanía.

- **Abandonar antiguas inercias:** «Ponerse al día cuanto antes» es una frase que no se puede ni escuchar ni emitir. La capacidad de recuperación del sistema tiene que ver con la capacidad de recuperación de sus profesionales. Debemos atender las demandas físicas y emocionales en esta recuperación de la asistencia (ver más abajo).
- **Ofrecer una visión renovada,** comprometida, responsable, creativa, solidaria, humilde, dispuesta a trabajar en escenarios desfavorables y a reexaminar las prioridades.
- **Utilizando el trabajo en remoto debemos ser conscientes** que frente a los beneficios de la comunicación virtual (rapidez, flexibilidad, reducción de costes, protección frente a la transmisión viral), perdemos parte del lenguaje corporal y lo que ello implica. Como dice Tim Bracey [42], *los humanos somos criaturas sociables: un saludo rápido por la mañana, una conversación a la hora del café, almorzar juntos, son una parte vital de la construcción de las conexiones que te hacen formar parte de un equipo y desarrollar un sentido de pertenencia y lealtad. Múltiples reuniones informales diarias, cara a cara, refuerzan esto y apoyan la creatividad y la innovación.* Es importante no olvidar que el trabajo en anatomía patológica es una actividad «en equipo» y por ello deberemos estar preparados para superar las limitaciones que nos impone el trabajo en remoto. A medida que va avanzando esta pandemia hemos aprendido a adoptar nuevas tecnologías que tienen como fin limitar la transmisión viral, pero no debemos obviar el hecho que esta manera de comunicación no tiene parámetros preexistentes a los que recurrir y no podemos estar seguros de su efectividad, sobre todo en las generaciones que ahora se están formando.
- Probablemente nada va a ser igual, porque después de todas las pandemias nada volvió a ser lo mismo: Peste de Justiniano (541), Peste negra (entre 1346 y 1353), Viruela (periodo dramático del SXVIII), Gripe española (1918-19), Gripe asiática (1957), Gripe de Hong Kong (1968) y VIH (desde 1981), todas ellas obligaron a adoptar cambios a la sociedad de ese momento.

La pandemia de nuestro tiempo, por SARS-CoV2, está en una fase emocional muy preliminar. Podemos entender parte de lo que nos está pasando si leemos una entrevista publicada en *Harvard Business Review* en marzo 2020 de Scott Berinato [43] a David Kessler, experto en duelo. Bajo el título Esa incomodidad que sientes es dolor, Kessler dice que la pérdida de la normalidad, la pérdida de conexión, la incertidumbre económica nos está pegando y estamos colectivamente de duelo: «no estamos acostumbrados a este tipo de dolor colectivo en el aire». Se trata de un dolor anticipatorio que es esa sensación que tenemos cuando el futuro nos depara incertidumbre: «nuestra mente primitiva sabe que algo malo está pasando, pero no puedes verlo», es un algo nuevo que, colectivamente, nunca habíamos sentido.

Comprender este dolor a través de las etapas del duelo puede ser un comienzo: negación, ira, negociación, tristeza y finalmente aceptación, que es donde encontramos el control: «puedo lavarme las manos, puedo mantener una distancia segura, puedo aprender a trabajar virtualmente». Pero cómo podemos compensar este intenso dolor de manera objetiva. Dice Kessler, hay que encontrar el equilibrio entre las cosas que estás pensando: «el duelo anticipatorio es la mente yendo hacia un futuro e imaginando lo peor». Para calmarnos no hay mejor remedio que «entrar en el presente» y «dejar de lado todo lo que no puedes controlar» y, además, es un buen momento para abastecerse de compasión y vivir el miedo y la ansiedad del otro.

El descubrimiento de la última etapa del dolor, el significado, se debe a los trabajos de Elisabeth Kübler-Ross y es lo que viene después de la aceptación. Nos estamos dando cuenta de la poderosa herramienta que es la tecnología para conectarnos o la importancia de un simple paseo que antes no apreciábamos, dice Kessler: «creo que seguiremos encontrando sentido ahora y cuando esto termine».

Concluye este autor que debemos detenernos ante el primer sentimiento: «me siento triste», hay que sentir su tristeza, el miedo y la ira, independientemente de que alguien más sienta algo o no. Luchar contra ella no ayuda, porque nuestro cuerpo está produciendo la sensación: «Si permitimos



que los sentimientos ocurran, ocurrirán de manera ordenada... y eso nos da poder. Entonces no somos víctimas».

Es absurdo pensar que no debemos sentir dolor ahora mismo: «déjate sentir el dolor y sigue adelante», es la última receta de David Kessler.

## CONCLUSIONES

- Existe un riesgo asociado a la pandemia de SARS-CoV2 que debe visualizarse con una percepción del riesgo asociado a la actividad en anatomía patológica.
- La adopción de medidas de bioseguridad debe de ser compatible con la realización de una actividad sin merma en los patrones de calidad.
- La muestra biológica en anatomía patológica se ha convertido en el vector de transmisión del virus, aunque sabemos que un procesado técnico correcto es la mejor garantía para evitar el contagio. Sin embargo, no debemos olvidar que no existe actividad humana con riesgo cero.
- Hay que trasladar la formación específica en bioseguridad, aprendida en la autopsia COVID-19, porque otras pandemias pueden venir y deben encontrarnos con las salas de autopsias bien dotadas, con los profesionales bien formados y bien protegidos.
- Debemos fomentar actitudes que faciliten la resiliencia al terminar estas fases de la pandemia, porque probablemente nada va a ser igual.

## Bibliografía

1. World Health Organization. Available from: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-COVID-19---11-march-2020>
2. Centers for disease control and prevention, laboratory biosafety guidelines for handling and processing specimens associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
3. World Health Organization. Laboratory biosafety manual. 3rd ed. Geneva, 2004. <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety>
4. Protocolos de vigilancia sanitaria específica. Agentes biológicos. Comisión de salud pública. Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Madrid 2001. ISBN 84-7670-616-2.
5. Vetter P, Eckerle I, Kaiser L. COVID-19: a puzzle with many missing pieces. *BMJ*. 2020;368:m627.
6. Sun P, Qie S, Liu Z, Ren J, Li K, Xi J. Clinical characteristics of 50 466 hospitalized patients with 2019-nCoV infection. *J Med Virol*; 2020
7. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult in patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395:1054-1062.
8. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV), 2020.
9. Gosney JR, Hofman P, Troncone G, et al. Cellular pathology in the COVID-19 era: a European perspective on maintaining quality and safety *J Clin Pathol* Epub ahead of print: doi:10.1136/jclinpath-2020-206789
10. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory biosafety and COVID-19: questions and answers, 2020. Available: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/biosafety-faqs.html> [Accessed 7 May 2020].

11. Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV2). Ministerio de Sanidad. Actualizado 22.04.2020
12. SEAP-IAP/SEC Medidas de seguridad durante la Epidemia por Covid 19 en un Servicio de Patología. 30 marzo 2020
13. Servicio Integrado de Prevención y Salud Laboral de la Universidad Politécnica de Valencia [https://www.sprl.upv.es/iop\\_ab\\_06.htm](https://www.sprl.upv.es/iop_ab_06.htm)
14. Guía de Bioseguridad para los profesionales sanitarios. Ministerio de Sanidad. Madrid 2015
15. Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med*; 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2004973>.
16. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019- nCoV) in suspected human cases. Available: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> [Accessed 03 Mar 2020].
17. World Health Organization. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019–2020. Geneva: World Health Organization, 2019(WHO/WHE/ CPI/2019.20).
18. Henwood AF. Ebola and histotechnologists. *J Histotechnology*. 2018 Apr 3;41(2):71–73.
19. Darnell ME, Subbarao K, Feinstone SM, et al. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *J Virol Methods*. 2004 Oct 1;121(1):85–91
20. Duan SM, Zhao XS, Wen RF, et al. Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *Biomed Environ Sci*. 2003 Sep;16(3):246–255
21. Barbareschi M, Ascoli V, Bonoldi E, et al. Biosafety in surgical pathology in the era of SARS-CoV2 pandemia. A statement of the Italian Society of Surgical Pathology and Cytology. *Pathologica Epub* 2020 Apr 1. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-14-20>
22. Guerini-Rocco E, Taormina SV, Vacirca D, et al. SARS-CoV-2 detection in formalin-fixed paraffin- embedded tissue specimens from surgical resection of tongue squamous cell carcinoma *J Clin Pathol Epub* doi:10.1136/jclinpath-2020-206635
23. Iwen PC, Stiles KL, Pentella MA. Safety Considerations in the Laboratory testing of specimens suspected or known to contain the severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV2). *Am J Clin Pathol* 2020 Mar 19. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa047>
24. Tse GM, Hui PK, Ma TK, et al. Sputum cytology of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS). *J Clin Pathol*. 2004;57: 256-259
25. Zhou J, Chu H, Li C, et al. Active replication of Middle East Respiratory Syndrome coronavirus and aberrant induction of inflammatory cytokines and chemokines in human macrophages: implications for pathogenesis. *J Infect Dis*. 2014;209:1331-1342.
26. Franks TJ, Chong PY, Chui P, et al. Lung pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a study of 8 autopsy cases from Singapore. *Hum Pathol*. 2003;34:743-748
27. Yu F, Du L, Ojcius DM, Pan C, Jiang S. Measures for diagnosing and treating infections by a novel coronavirus responsible for a pneumonia outbreak originating in Wuhan, China. *Microbes Infect*. 2020;22: 74-79.
28. Wang R, Zhang X, Irwin DM, Shen Y. Emergence of SARS-like coronavirus poses new challenge in China. *J Infect*. 2020;80:350-371.

29. Reusken C, Broberg EK, Haagmans B, et al. Laboratory readiness and response for novel coronavirus (2019-nCoV) in expert laboratories in 30 EU/EEA countries, January 2020. *Euro Surveill.* 2020;25. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000082>.
30. Winichakoon P, Chaiwarith R, Liwsrisakun C, et al. Negative nasopharyngeal and oropharyngeal swab does not rule out COVID-19. *J Clin Microbiol*; 2020. <https://doi.org/10.1128/JCM.00297-20>.
31. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory biosafety guide- lines for handling and processing specimens associated with SARS- CoV. Available at: <https://www.cdc.gov/sars/guidance/f-lab/app5.html>. Accessed March 23, 2020.
32. Prieto Cuadra, JD; Sánchez Sánchez, R; Carnicero Cáceres, S; Hierro Martín, MI. Protocolos de bioseguridad en autopsias. Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España. SEAP-IAP. 2019: 17-41
33. Documento técnico. Procedimiento para el manejo de cadáveres de casos de COVID-19. Ministerio de Sanidad. España. Versión 26-05-20. [https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Manejo\\_cadaveres\\_COVID-19.pdf](https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Manejo_cadaveres_COVID-19.pdf)
34. Centro Nacional de biotecnología. CSIC. 2017. Seguridad biológica. ANEXO 2. [https://www.cnb.csic.es/images/Julia2015/Services/Radiation\\_Protection\\_Biol\\_Safety/Guia%20basica%20de%20Seguridad%20e%20Higiene%20en%20los%20laboratorios.pdf](https://www.cnb.csic.es/images/Julia2015/Services/Radiation_Protection_Biol_Safety/Guia%20basica%20de%20Seguridad%20e%20Higiene%20en%20los%20laboratorios.pdf)
35. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). 2014. Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos. <https://www.insst.es/-/guia-tecnica-para-la-evaluacion-y-prevencion-de-los-riesgos-relacionados-con-la-exposicion-a-agentes-biologicos-ano-2014>
36. Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
37. Asociación Española de Normalización. «UNE-EN ISO 15189 Laboratorios Clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia (noviembre 2014).
38. Curso de Gestión de Calidad para Laboratorios. Módulo 11 Bioseguridad. Washington D.C 2005
39. El día después: directivos responsables de organizaciones sanitarias post-COVID-19 <https://www.redaccionmedica.com/opinion/el-dia-despues-directivos-responsables-de-organizaciones-sanitarias-post-COVID-19-7130>
40. El colapso provocado por el Covid eclipsa al resto de enfermedades [https://cincodias.elpais.com/cincodias/2020/10/22/economia/1603391691\\_175591.html](https://cincodias.elpais.com/cincodias/2020/10/22/economia/1603391691_175591.html)
41. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).
42. Bracey T et al., Histopathology during the COVID-19 pandemic: resilience through adaptation and innovation, *Diagnostic Histopathology*, <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2020.12.003>
43. <https://hbr.org/2020/03/that-discomfort-youre-feeling-is-grief>.



# Proyecto para la estimación de la carga de trabajo en citopatología, histopatología, patología molecular y digitalización (tiempo técnico) atendiendo al catálogo de muestras y procedimientos de la SEAP

## Grupo de Trabajo de Gestión Aplicada y Calidad de la SEAP

### Coordina:

**Antonio Martínez Lorente.** *Hospitales Universitarios de Torrevieja y Elx-Vinalopó.*

**Virginia de Lucas López.** *Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Madrid*

### Grupo de trabajo Patólogos:

**Alenda, Cristina.** *Hospital General Universitario. Alicante.*

**Álvarez Alegret, Ramiro.** *Hospital Miguel Servet. Zaragoza.*

**Carrasco García, Miguel Ángel.** *Hospital General Universitari de Catalunya. S. Cugat del Vallés.*

**Calatrava, Ana.** *Fundación Instituto Valenciano de Oncología. Valencia.*

**Carnicero Cáceres, Silvia.** *Instituto de Medicina Legal. Cantabria.*

**Carvia Ponsaillé, Rafael.** *Hospital Regional Universitario. Málaga.*

**Cremades Mira, Antonio.** *Hospital Universitario de la Ribera. Alzira.*

**De Álava Casado, Enrique.** *Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.*

**De Torres Ramírez, Inés.** *Hospital Universitario Vall d'Hebrón. Barcelona.*

**Durán García, Rafael.** *Hospital Universitario Virgen de la Salud. Elda.*

**García del Moral, Raimundo.** *Complejo Universitario. Granada.*

**García Rojo, Marcial.** *Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.*

**Granados Carreño, Charo.** *Hospital Universitario de Getafe. Madrid.*

**Hermida Romero, Teresa.** *Complejo Universitario de A Coruña.*

**Hierro Martín, Isabel.** *Hospital Universitario Virgen de la Victoria. Málaga.*

**Martínez Onsurbe, Pilar.** *Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares. Madrid.*

**Mate Sanz, José Luis.** *Hospital Universitario Trias i Pujol. Badalona.*

**Nieto, Santiago.** *Hospital Universitario del Henares. Coslada.*

**Olivares, Francesc.** *Parc de Salut Mar de Barcelona.*

**Ortega Pastor, Elisa.** *Hospitales Universitarios de Torrevieja y Elche-Vinalopó.*

**Pinedo Moraleda, Fernando.** *Hospital Universitario Fundación Alcorcón. Madrid.*

**Prieto Rodríguez, Mireya.** *Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Valencia.*

**Ramírez Gasca, Teresa.** *Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza.*

**Regojo Zapata, Rita M.** *Hospital Universitario La Paz. Madrid.*  
**Rojo, Federico.** *Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Madrid.*  
**Roselló Sastre, Esther.** *Hospital General Universitario. Castellón.*  
**Ruiz Díaz, Irune.** *Hospital Universitario Donostia. San Sebastián.*  
**Salas, Clara.** *Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda.*  
**Torres Nieto, Ángeles.** *Hospital Universitario Del Río Hortega. Valladolid.*  
**Viguri Díaz, María Amparo.** *Hospital Universitario Araba. Vitoria-Gasteiz.*

**Grupo de trabajo TSAPyC:**

**Bermejo Ortiz, M<sup>a</sup> Dolores.** *Hospital Regional Universitario de Málaga.*  
**Bernabé Fernández, Guadalupe.** *Complejo Universitario A Coruña.*  
**Caicedo Mafla, Vanneza.** *Hospital Universitario Fundación Alcorcón.*  
**Capa Sanz, Marina.** *Hospital Universitario La Paz.*  
**Carballar Piñero, David.** *Hospital Universitario Virgen del Rocío.*  
**Carretero Malta, Beatriz.** *Hospital Universitario de Getafe.*  
**Chico Rodríguez, Milagros.** *Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.*  
**Dobon González Gema.** *Fundación Instituto Valenciano de Oncología.*  
**Durán, María Dolores.** *Hospital General Universitario de Alicante.*  
**Estívariz, Zuriñe.** *Hospital Universitario Araba.*  
**Galera Espinosa, Ana María.** *Hospital Universitario Virgen del Rocío.*  
**García Sanchez M<sup>a</sup> Angels.** *Hospital Universitario Vall d'Hebron.*  
**García, Diego.** *Hospital Puerta de Hierro.*  
**Gayoso Alberro, Aitziber.** *Hospital Universitario Donostia.*  
**Goitia Viaña, Ana.** *Hospital Universitario Donostia.*  
**Gonzalez Rodriguez, Rocío.** *Hospital Universitario Virgen de La Victoria. Málaga.*  
**Izquierdo, Diana.** *Hospital Universitario Puerta de Hierro.*  
**Jiménez Galván, Begoña.** *Hospital Universitario Fundación Alcorcón.*  
**León Martínez Eloisa.** *Hospital Regional Universitario de Málaga.*  
**López Castro, Rodrigo.** *Hospital Virgen de las Nieves de Granada.*  
**Lousada-Lopes Cruz, Sira.** *Instituto de Medicina Legal de Cantabria.*  
**Marqués Larraz Violeta.** *Hospital Universitario Miguel Servet.*  
**Martín Céspedes, Montse.** *Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona.*  
**Martinez Rubia, M<sup>a</sup> Dolores.** *Hospital San Cecilio de Granada.*  
**Massó Castellà, Jordi.** *Parc de Salut Mar de Barcelona.*  
**Menchón Pinar Maria del Mar.** *Hospital General Universitario de Elda.*  
**Olmo Fernandez, Maria del Mar.** *Hospital Universitario del Henares.*  
**Ortega Rojo, Francisco J.** *Hospital Universitario Del Rio Hortega.*  
**Ortiz Egea, Cristina.** *Hospital Universitario Vall d'Hebron.*  
**Pascual Baldayo, Montserrat.** *Hospital General Universitario de Castellón.*  
**Pérez Díaz M<sup>a</sup> Rosario.** *Hospital Universitario Príncipe de Asturias.*  
**Ramos Pastor, Alfredo.** *Hospital Universitario Príncipe de Asturias.*  
**Rodríguez Vila, Ana.** *Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona.*  
**Sánchez Velasco, Cruz.** *Hospital Universitario de La Ribera.*  
**Sancho, Jenifer.** *Instituto de Medicina Legal de Valencia.*  
**Urbano Carrillo Marina.** *Hospital General Universitari de Catalunya. S. Cugat del Vallés.*  
**Villalba Fernández, Ana.** *Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.*

## INTRODUCCIÓN

Uno de los principios asumido en anatomía patológica es que el trabajo se hace en equipo. Sin embargo, la distribución de este trabajo tiene un primer obstáculo que es cómo medirlo. Otro principio es que la carga excesiva de trabajo –sobrecarga– conduce a fallos y tampoco podemos medirla ni saber en quién recae. Pues bien, con estos dos principios deberíamos construir un discurso preciso respecto a una carga de trabajo óptima para todo el equipo que pueda garantizar resultados con baja incertidumbre. Este podría ser otro de los principios de nuestra actividad y un buen objetivo para desarrollar este proyecto.

El primer paso para dar un grado de certeza a este discurso es salir de lo intangible y ponernos a medir, contar y consensuar las distintas variables de la ecuación. Si bien cumplimos parte del cálculo cuando abordamos en 2017 las *Directrices para la estimación de la carga de trabajo en citopatología e histopatología (tiempo médico) atendiendo al catálogo de muestras y procedimientos de la SEAP* [1], y se establecieron las unidades de carga de trabajo óptimas para un patólogo, quedó pendiente acometer el cálculo de la carga de trabajo óptima para los profesionales técnicos de anatomía patológica, TSAPyC y Citotécnicos. Entonces se consensuó que la unidad de carga laboral (UCL) de «tiempo médico» era de 6 minutos. (1UCL= 6 min), es decir, que un Patólogo con una contratación anual de 1.826 horas desarrollará, en ese periodo, el trabajo correspondiente a 13.695 UCL que garantizan niveles óptimos de resultados.

Sin embargo, antes de entrar de pleno en el discurso que ahora nos ocupa debemos definir, primero, qué es «tiempo técnico» y, segundo, cuál es su valor. Porque, «tiempo técnico» ¿es sólo tecnicar?, la respuesta es no. Un técnico realiza unas tareas imprescindibles para el funcionamiento del laboratorio que pasan mayoritariamente desapercibidas: una parte administrativa que tiene que ver con el registro de entrada de las muestras (numerar, cotejar, clasificar), otra parte de mantenimiento de los equipos (cambiar reactivos a diario, rellenar líquidos, poner a punto la maquinaria) y, además, adecuar las zonas de trabajo: preparar la talla (situar las muestra en un orden, asistir al patólogo, gestionar los casetes, limpiarlas, gestionar los residuos). Estos serían, lo que podríamos llamar, los «tiempos técnicos invisibles» frente al «tiempo técnico visible» como es procesar bloques, cortar, teñir, hacer IHQ, IF o biología molecular. Además, hay que integrar en el discurso la especialización que supone el citotécnico, tanto en la citopreparación como en el citodiagnóstico, y la nueva tarea que ha surgido con la digitalización. Los servicios que tienen implantado el sistema dicen que entre dos y tres de sus profesionales técnicos dedican la totalidad de su jornada laboral a esta actividad. Por tanto, en este proyecto debemos hacer el esfuerzo para que quede recogida toda la actividad que los profesionales técnicos realiza durante de su tiempo de trabajo.

Para dotar de otra dimensión a este proyecto vamos a analizar el peso que un fallo tiene sobre el total del proceso de anatomía patológica y a relacionarlo con sus actores. Utilizamos el ejercicio del AMFE (Análisis Modal de Fallos y sus Efectos) que nos permite trazar un mapa de los procesos e identificar en cada uno de ellos los posibles fallos y sus efectos. Primero situamos la carga total, la distribuimos en un proceso lineal y fijamos los roles. Después identificamos los puntos vulnerables y los asociamos con sus actores.

Cuando realizamos el AMFE el Servicio Sinergizado de los Hospitales Universitario de Torrevieja y Vinalopó [2], definimos 10 procesos clave (Tabla 1): 2 en fase pre analítica, 6 en fase analítica y 2 en fase post analítica que tenía como finalidad distribuir los riesgos entre los distintos roles y poder cuantificar el peso de cada profesional en el mapa global de riesgos.

**Tabla 1.** Identificación de procesos clave en el servicio sinergizado de anatomía patológica. Hospitales Universitarios de Torrevieja y Vinalopó.

<b>PROCESOS PRE ANALÍTICA</b>	Solicitud de estudio y correlación con muestras de biopsias, piezas quirúrgicas, citologías y autopsias
	Recepción de muestras de biopsias, piezas quirúrgicas, citologías y autopsias
<b>PROCESOS ANALÍTICA</b>	Técnicos de biopsias y piezas quirúrgicas
	Técnicos de citologías
	Técnicos de autopsias
	Diagnósticos de biopsias y piezas quirúrgicas
	Diagnósticos de citologías
	Diagnósticos de autopsias
<b>PROCESOS POST ANALÍTICA</b>	Validación de resultados
	Gestión de muestras

El ejercicio identificó 47 modos de fallo (Tabla 2): 11 en la fase pre-analítica, 33 en la fase analítica y 3 en fase post-analítica (se consideraron relevantes aquellos que arrojan un IPR -Índice de Prioridad de Riesgo- superior a 100).

**Tabla 2:** Distribución de modos de fallo por proceso en el servicio sinergizado de anatomía patológica. Hospitales Universitarios de Torrevieja y Vinalopó.

	Pre-analítica	Analítica	Post-analítica	Total
<b>Modos de fallo</b>	11	33	3	47
<b>IPR&gt;100</b>	2	12	2	16
<b>% IPR&gt;100</b>	18%	36%	66%	34%

Por otro lado, la distribución del mapa de riesgos, por fases, quedaría muy a expensas de la fase analítica en donde el 70% del riesgo se acumula en este proceso. Los profesionales de anatomía patológica (Patólogo/TSAPyC) tendrían distribuidos su riesgo: 0/15% en pre-analítica, 41/76% en analítica y 59/9% en post-analítica. Y el peso de cada profesional, sobre el total del mapa de riesgos, recaería de manera mayoritaria sobre los TSAPyC, con una responsabilidad del 84% del riesgo medido para todos los procesos frente al 16% de responsabilidad que tendría un Patólogo.



Manteniendo el principio que el trabajo en anatomía patológica es en equipo y que la sobrecarga sobre cualquier actor repercute en el resultado final, es necesario definir la carga laboral óptima de un servicio de anatomía patológica, y de cada uno de sus profesionales, para poder planificar correctamente los recursos disponibles y acometer los riesgos calculados que puedan derivar de situaciones de sobrecarga.

## **PROPUESTA DE OBJETIVOS PARA LA ESTIMACIÓN DEL TIEMPO TÉCNICO**

**El proyecto para la estimación de la carga de trabajo en citopatología, histopatología, patología molecular y digitalización (tiempo técnico), atendiendo al catálogo de muestras y procedimientos de la SEAP**, se basa en el espíritu de los objetivos expuestos en las Directrices para la estimación de la carga de trabajo en el tiempo médico [1], aunque deben contemplarse objetivos específicos propios del trabajo técnico. A nuestro entender son:

- Apoyar a los servicios y departamentos de anatomía patológica para equilibrar la dotación de profesionales acorde a la carga de trabajo prevista.
- Contribuir a la distribución equitativa de la carga en cualquier servicio o departamento de anatomía patológica con cualquier grado de subespecialización.
- Actuar como garante para que se preste un servicio sostenible y de alta calidad en beneficio de los pacientes.
- Facilitar la distribución equitativa del trabajo entre técnicos dentro de un mismo centro. Proporcionar información para la planificación del trabajo y dotar al personal técnico de un mecanismo de cálculo que asegure que la carga de trabajo en una jornada laboral es razonable, segura, posible y nunca excesiva. Es de interés general reducir los errores relacionados con la sobrecarga.
- Constituir una herramienta de trabajo útil para la gestión gerencial y directiva en predicción de los cambios en la demanda.
- Utilizar el sistema de medida (¿puntos?) para indicar intervalos de tiempo dentro de los cuales cada espécimen ha sido catalogado en base a grados de dificultad técnica.
- Los puntos de carga de trabajo se asignan prospectivamente según el tipo de espécimen. La reasignación retrospectiva de puntos sólo debe hacerse en circunstancias excepcionales.
- Los puntos de la carga se asignan al trabajo en preanalítica, analítica y postanalítica entendiendo que todo corresponde a «tiempo técnico» en relación a un espécimen.
- Otros aspectos relacionados con la actividad laboral como asistencia a formación continuada, investigación y participación en programas de gestión de calidad: implantación, gestión de la documentación, análisis y seguimiento de indicadores, objetivos o desarrollo de protocolos deberían estar cubiertos por el sistema de puntos.
- Es aconsejable que el sistema de gestión de información del laboratorio (LIS) permita el registro de la carga de trabajo, lo que facilitará el cálculo de la carga total del servicio o departamento.
- Debido a la constante evolución de la práctica médica y quirúrgica, cabe esperar que estas directrices sean objeto de revisión periódica.

## **UN PUNTO DE PARTIDA: CATÁLOGO DE MUESTRAS Y PROCEDIMIENTOS DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA SEAP**

Aunque fue referido en las Directrices del Libro Blanco de 2017, y suponiendo que esta información va a ser mayoritariamente leída por TSAPyC, es necesario hacer un poco de historia y poner en valor el acierto de algunos patólogos que nos precedieron. Debemos recordar al querido José Antonio Giménez que nos recordaba en el suplemento del Libro Blanco de 2011 [3], que fue a finales de los años noventa y tras dos revisiones del catálogo propuesto por el proyecto SIGNO II cuando la SEAP acometió la transformación al catálogo actual de procedimientos. Se pasó de una

catalogación por niveles, a la catalogación por detalle de cada una de las muestras y procedimientos. Sin embargo, ya advertían que este catálogo constituye un requisito básico que debe ser actualizado de una forma casi permanente y ser presentado de un modo accesible para su uso cotidiano a través de los sistemas de información. El esquema propuesto fue el siguiente:

- Tres Categorías primarias de muestras (concepto equivalente a espécimen) y una categoría primaria de procedimientos (asimilable al de técnica, método o ambos):
  - Autopsias: 9 tipos (T)
  - Biopsias: 14 grupos de procedencia topográfica (T)
  - Citologías: 14 grupos de procedencia topográfica (T)
  - Procedimientos agrupados en 6 tipos distintos (T)
- A cada T se le asigna un número variable de tipos de Especimen (muestras) o tipos de Estudio (procedimientos).
- Se establece la codificación: Categoría-Tipo-Especimen que facilite su identificación en el sistema de información.
- Tanto las muestras como los procedimientos se codifican según la clasificación SNOMED-CT aproximando la terminología en la medida de lo posible. La limitación de SNOMED-CT para aceptar topografías combinadas obliga a registrar con dos códigos aquellas que lo requieran (p. ej. mastectomía+disección axilar). (Anexos 1, 2 y 3)

### **CARGA DE TRABAJO ASOCIADA A LA ACTIVIDAD PRE-ANALÍTICA, ANALÍTICA Y POST-ANALÍTICA CONTEMPLANDO EL TIEMPO TÉCNICO. ANÁLISIS PROSPECTIVO DE LA CARGA DE TRABAJO ASISTENCIAL**

No existen referentes en la literatura a los que podamos acogernos para determinar todos los componentes de un tiempo técnico. Debemos acudir al desarrollo del tiempo médico e intentar establecer paralelismos con cada uno de los conceptos:

#### **Carga de trabajo asociada a categorías de complejidad**

Uno de los tantos aciertos de nuestros predecesores fue utilizar para el diseño de las recomendaciones recursos que ya estaban disponibles. *The Royal College of Pathologists* tiene una trayectoria de evaluación del tiempo de trabajo en Patología iniciada en 1992, que hizo su primera revisión en 1999 y, a fecha de hoy, son cuatro las ediciones de sus *Guidelines on staffing and workload for histopathology and cytopathology departments* a la que se añade en mayo de 2019 *Guidelines for autopsy practice: Postoperative deaths*.

Para el grupo de expertos del *Royal College of Pathologists* la carga de trabajo, medida en tiempo médico, debe ir asociada a un espécimen o muestra y cada uno de ellos tiene una distribución en tiempo vinculada a su complejidad: a cada intervalo de tiempo queda asociado un sistema de puntos con carácter creciente. En su segunda edición un punto equivale a seis minutos y los especímenes fueron asignados a cuatro categorías de complejidad:

- Baja: 1 punto
- Media: 3 puntos
- Alta: 5 puntos
- Muy alta: 10 puntos,

Los puntos se presentaron como matrices bidimensionales para macro y microscopia lo que limitaba, por otro lado, la flexibilidad de asignación a los distintos apartados. Este mismo criterio fue el seguido por el catálogo de la SEAP publicado en el Suplemento de 2011, con una particularidad: considerar la unidad de tiempo 10 minutos.

### **Carga de trabajo asociada a tiempo**

Posteriormente nuestros colegas del *Royal College of Pathologists* modifican, a partir de la 3ª edición la asignación de las puntuaciones, pasando de la matriz bidimensional a columnas simples de tipos de muestras con descripción macro y microscópica. El grupo de expertos tomó la decisión de asignar la carga de trabajo de los especímenes a intervalos de minutos, lo que requirió un sistema de puntos modificado:

- 1-5 minutos: 1 punto
- 6-10 minutos: 2 puntos
- 11-20 minutos: 3 puntos
- 21-30 minutos: 5 puntos
- 31-50 minutos: 8 puntos
- > 50 minutos: 12 puntos.

Además, es importante tener en cuenta que la carga laboral o de trabajo, es la suma de los minutos empleados para cada espécimen, es decir, cada contenedor tiene su propia puntuación y un caso clínico será la suma de todos los especímenes que lo compongan.

### **Carga de trabajo con carácter prospectivo**

Llegados a este punto es necesario poner atención que la carga de trabajo debe tener un carácter prospectivo: el valor de la asignación prospectiva ha sido consensuado en nuestro grupo de trabajo y es, en sí mismo, un dato transparente, universal y creíble, tanto para patólogos como para la dirección y la gerencia. Por tanto, la reasignación retrospectiva de puntos sólo debe hacerse en circunstancias excepcionales tales como error en la catalogación de la muestra, del procedimiento o ante resultados no esperados que requieran nuevas determinaciones una vez se ha completado el informe.

### **Determinación de los picos de carga en el tiempo técnico**

Por último, debemos considerar que si bien el tiempo médico tiene dos picos de incidencia: en la fase pre-analítica el tiempo dedicado a la descripción macroscópica y en la fase analítica el dedicado a la microscopia y a la confección del informe, el tiempo técnico tiene sus propios picos. Seguimos con el modelo que conocemos:

Cuando hablamos de «tiempo médico» debemos limitarlo al empleado con cada uno de los procedimientos para la conclusión en un informe diagnóstico. Por tanto, este tiempo debemos considerarlo como el tiempo de carga asistencial y debe representar entre el 75 y el 80% del tiempo de trabajo. El propio *Royal College* contempla dos tiempos distintos en el tiempo médico y aunque no lo pondera, nosotros consideramos que el 20-25% que resta está distribuido entre docencia, asistencia a comités clínicos, formación continuada, investigación y la participación en programas de calidad.

El antecedente legislativo al que referir esta afirmación proviene del Estatuto Jurídico del Personal Médico (Orden de 4 de julio de 1972, art. 67) donde dice que la jornada del personal médico es de 36 horas semanales elevando el número de horas a 42 si se desarrolla investigación o docencia. Por otro lado, las Comunidades Autónomas ofrecen una desigual interpretación de este mismo concepto dependiendo de los resultados de negociación en sus mesas sectoriales.

Hay que dar peso a los distintos picos del tiempo técnico, tanto troncales: recepción de muestras, talla, procesado, confección de bloques, corte, tinción, etiquetado, distribución, digitalización, archivado y eliminación de residuos; como específicos: técnicas de inmunohistoquímica, de inmunofluorescencia, técnicas convencionales, Mohs, intraoperatoria, citopreparación, asistencia a PAAF, EBUS/EUS, ROSE, técnicas moleculares (ISH/PCR) o el citodiagnóstico.

La nueva realidad, y como consecuencia de las obligadas medidas de bioseguridad que debemos de adoptar por la pandemia de SARS-CoV2, parece un buen momento para abordar este debate. La carga real en las jornadas laborales por todos los profesionales de un servicio de anatomía patológica ha podido variar y, probablemente, ya no esté asociada, exclusivamente, al trabajo que concluye en informes de biopsias, citologías y autopsias. Puede ser una buena oportunidad para hablar de los distintos roles, por si tienen que ser redefinidos, y con ellos sus cargas de trabajo.

## CÁLCULO DE LA CARGA DE TRABAJO CONTEMPLANDO EL TIEMPO TÉCNICO

De nuevo recordaremos lo dicho en la elaboración del tiempo médico que puede servirnos como guía. Una de las aspiraciones para nuestra especialidad es la de disponer de un sistema homologado, objetivo y universalmente aceptado respecto a la carga de trabajo. Si bien la cuantificación del trabajo respecto a las unidades de biopsias, citologías y autopsias ha sido la manera de medir la actividad de un servicio o departamento, en estos momentos ya no nos sirve. Ya en los años noventa el proyecto SIGNO (II), propuso medir el trabajo a través de las unidades relativas de valor (URV), pero tampoco funcionó. Tal vez, una de las razones fue por su carácter economicista, ya que el objetivo era normalizar la factura interna en un análisis de costes que permitiera elaborar un presupuesto. Y dos grandes críticas se vertieron, además, sobre estas URV. Por un lado, que la gestión económica de los Servicios quedaba fuera del alcance de los profesionales (aunque no fuera de su influencia) y, por otro, el insuficiente desarrollo de los sistemas informáticos de aquellos tiempos [3].

La SEAP en un compromiso constante por vertebrar con procedimientos que permitiesen la comparación entre Servicios, publica en el Libro Blanco de 1997 y en el suplemento de 1999 un catálogo de muestras y procedimientos simplificado y conceptualiza la carga laboral como *una actividad profesional desprovista de gastos fungibles asociados que el patólogo desempeña para alcanzar el objetivo final del diagnóstico expresada en tiempo o equivalente*.

Es la segunda edición del *Royal College of Pathologists*, y la publicación por aquellos años del Catálogo de procedimientos diagnósticos en anatomía patológica, editado por la Generalitat Valenciana que mutó el valor económico de las URV a valor tiempo. Esta nueva manera de medir fue ampliamente aceptada ya que venía del consenso entre un grupo de patólogos y su aceptación por parte de una administración pública. Las biopsias se clasificaron de Tipo I, II, III, IV y V y los tiempos asignados fueron 20-40-60-80-120 minutos.

En este recorrido por nuestros antecedentes, debemos rescatar una figura esencial para el cálculo: el factor  $\mu$ . Este factor permite convertir las UCL a minutos y se fijó en 10 para mantener el paralelismo con lo pactado en la Comunidad Valenciana en el año 2000. El factor  $\mu$  representa la carga media laboral que soporta un servicio y, de acuerdo a este dato, valores por debajo de 10 expresarían sobrecarga, y más sobrecarga cuanto más alejados se encuentre de la decena. Dado que el factor  $\mu$  está directamente relacionado con el tiempo médico, su valor permite planificar los recursos profesionales y ser una herramienta de gestión de cara a la dirección y la gerencia. Pero dos son las consideraciones, además, que debemos de tener en cuenta:

- Que es el tiempo médico el que marca el valor final del factor  $\mu$ : se considera, por cálculos realistas y por consenso, **6 minutos el tiempo por unidad** (tal como consideraba en su segunda edición *The Royal College of Pathologists*).
- Que el tiempo médico hay que asimilarlo a **tiempo asistencial**, esto es, el 75-80% del tiempo de una jornada laboral.

Como ejemplo, podemos considerar un servicio que tiene un convenio en el que se contemplan 1.826 horas anuales, lo que supone 109.560 minutos. Tal como hemos convenido, el tiempo asistencial representa el 75% del tiempo de trabajo, por tanto, se disponen de 82.170 minutos o de 13.695 UCL (UCL = 6 minutos) para el desarrollo de un trabajo sin sobrecarga. El número de profesionales médicos en cada unidad de anatomía patológica resultará de la división de las UCL totales del servicio y las 13.695 UCL que debe desarrollar cada patólogo.

Del mismo modo para los profesionales TSAPyC, un convenio de 1.826 horas anuales, descontando el porcentaje del tiempo asistencial, debe permitirnos contar las UCL cuando quede definida la unidad de carga y, con ello, calcular los RRHH técnicos necesarios para cubrir de manera equilibrada el flujo de trabajo de ese servicio.

### **DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA DE TRABAJO EN HISTOPATOLOGÍA**

En este apartado deberemos de tener en cuenta:

- Mantener el catálogo de procedimiento de la SEAP publicado en 2017.
- Distribuir la carga de trabajo TSAPyC a cada uno de los procedimientos. Una dificultad a solucionar es el hecho que si los procedimientos en el tiempo médico se dividían en macro y micro y había la posibilidad que cada uno fuera imputado a un profesional distinto (macro a un residente y micro a un patólogo), en la distribución de procedimientos técnicos se trata de un proceso continuo a través de varios TSAPyC.
- La organización de algunos servicios ha hecho que el personal técnico realice el proceso de macro. Es necesario abrir este debate y establecer criterios objetivos que contemplen las distintas realidades que se están produciendo.
- Se incorpora como un apartado específico el diagnóstico molecular que se detalla más adelante.
- La microscopía electrónica debe contemplarse como un elemento más de carga de trabajo y se hará en aquellas patologías que lo requieran. Hay que debatir si estas cargas deben de contemplarse de manera prospectiva, como el resto, o excepcionalmente retrospectivas.

### **DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA DE TRABAJO EN CITOPATOLOGÍA Y CITOTECNOLOGÍA**

En este apartado se han considerado tres grandes criterios para hacer la distribución de la carga:

- Procesamiento técnico de cualquier citología separando dos grandes rutinas: aquellas que requieran concentrados (citogine, orinas, líquidos) y los extendidos que serían el resto.
- La presencia o no del TSAPyC en el momento de la toma de la muestra. Toda citología tiene, por ella misma, una carga troncal y va sumando carga en función de la técnica: PAAF, ROSE (*Rapid on site evaluation*), EBUS /EUS (Ecoendoscopia lineal/*ultrasound*).

Y dos criterios no menores a tener en cuenta:

- Contemplar a efectos de carga los programas de cribado ginecológico por parte del citotécnico.
- Técnicas de determinación de HPV.

### **DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA DE TRABAJO EN PATOLOGÍA AUTÓPSICA**

Respecto a la autopsia se contemplarán dos tipos de procedimiento:

- Autopsia normal que incluye los 9 tipos recogidos en el catálogo de procedimientos de la SEAP
- Autopsia de alto riesgo tipo COVID, SIDA...

### **DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA DE TRABAJO EN TÉCNICAS MOLECULARES**

En este apartado se tendrán en cuenta los siguientes criterios para hacer la distribución de cargas.

- Nivel de automatización de los laboratorios influyendo muy notablemente en la carga de trabajo, por ejemplo, extracción automatizada de ácidos nucleicos.
- Presencia a no de biólogos que realicen tareas de interpretación.
- Análisis de alteraciones gen a gen o mediante técnicas de alto rendimiento
- Complejidad de las técnicas realizadas:
  - Nivel 1: Sin extracción (Idylla).
  - Nivel 2: ISH.
  - Nivel 3: PCR sobre DNA, kit estandarizado.
  - Nivel 4: Secuenciación, pirosecuenciación.
  - Nivel 5: NGS.

## **DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA DE TRABAJO EN DIGITALIZACIÓN DE PREPARACIONES Y BLOQUES**

Incluimos en este apartado todas las labores que tendrán un proceso técnico de digitalización o escaneado, teniendo en cuenta que tras este se procede al archivo. Esta carga de trabajo se encuentra a caballo entre las fases analítica y la post analítica.

Tareas de tecnificación del escaneado de preparaciones:

- Cargar y descargar los escáneres.
- Resolver los errores de escaneo (paradas del escáner por defecto en el portaobjetos, bloqueos accidentales del escáner, etc.).
- Eliminar las incongruencias entre LIS y en sistema informático que controla los escáneres.
- Resolver los desenfoques cuando ocurren.
- Atender las prioridades de escaneo y a los patólogos con problemas en este campo.
- Dar de alta, adecuar, reetiquetar y escanear casos antiguos que ahora se requiere revisar por nueva biopsia, revisión, etc.
- Controlar el archivo digital de los portaobjetos, su recuperación y avisar en caso de errores al proveedor de los sistemas.

Tareas de tecnificación del archivo de bloques y portas:

- Cargar e identificar adecuadamente los contenedores de bloques y portas escaneados según llegan al archivo (se almacenan sin orden ninguno).
- Escanear cada contenedor.
- Recuperar bloques del archivo según se van necesitando para hacer nuevas técnicas IHQ o moleculares.
- Recuperar portas si es necesario su reescaneo.
- Procesar todas las peticiones de bloques o portas físicos para su envío fuera del hospital (sobre todo a petición de los pacientes para ensayos clínicos, consultas de segunda opinión, etc.).

Tareas de tecnificación de asistencia a la nueva patología computacional:

- Revisar que los algoritmos automáticos de clasificación de los casos son correctos.
- Comprobar que cada caso está listo para diagnóstico (no falta ninguna técnica para escanear o hacer, el escaneo realizado es correcto, etc.).
- Mirar cada porta, identificar la técnica y aplicar los algoritmos en patología de rutina.
- Elaborar un informe estructurado de cada caso con los datos de los algoritmos incluidos en él.
- Preparar la revisión de los casos por el patólogo.
- Resolver los problemas logísticos de los casos que puedan depender del escáner, laboratorios, etc.

## MÉTODO DE TRABAJO

### Fase 0: Constitución del Grupo de Trabajo Tiempo Técnico (GTTT)

El Club de Gestión Aplicada y Calidad de la SEAP incluye a una serie de profesionales médicos que ya participaron en la elaboración del documento que estimaba la carga de trabajo del tiempo médico. Partimos de este grupo de trabajo que actuará, en virtud de la experiencia anterior, coordinando la metodología y la información para las especialidades propuestas.

La distribución de las especialidades responde a la experiencia de cada uno de los servicios y se ha asignado, previa consulta, atendiendo al reconocimiento de sus trayectorias. Los posibles sesgos de la muestra van a ser reducidos al incorporar varios servicios a cada una de las especialidades propuestas (tabla 1). Cada servicio nombrará un representante TSAPyC que participará en las reuniones del GTTT. La representante del club de TSAPyC de la SEAP se incorpora a la coordinación del proyecto.

### Fase 1: Cuaderno de recogida de datos por especialidad (CRD)

Todos los servicios asignados en cada especialidad mantendrán reuniones virtuales con los coordinadores del Grupo de Trabajo y juntos elaborarán el cuaderno de recogida de datos de esa especialidad. Este cuaderno tendrá elementos troncales y elementos específicos, si los hubiere, de esa especialidad.

Con un documento consensuado, se recogerán los datos durante un periodo de 3 meses con el fin de tener un tamaño muestral significativo. Los resultados serán enviados a los coordinadores que dará tratamiento a los datos y concluirán los resultados para esa especialidad.

### Fase 2: Propuesta de la primera versión (V.1)

Esta primera versión será ajustada del catálogo de procedimientos de la SEAP (Ver apéndice) y deberá responder a:

- Categorías de complejidad técnica
- Unidad de cagar laboral medida en tiempo
- Asignación prospectiva de la carga
- Determinación de los tipos de carga TSAPyC

Con todos los datos, se hará una primera propuesta para establecer una carga prospectiva, atendiendo a diferentes procedimientos técnicos y medida en unidades de tiempo. Esta primera propuesta se llevará a práctica durante otros 3 meses, pero en esta ocasión lo harán todos los servicios participantes en el proyecto que aplicarán esta versión V.1 para toda su actividad técnica.

La recogida de datos será remitida a los coordinadores del proyecto que elaboraran una nueva propuesta (V.2) incluyendo todas las variables ya consensuadas.

### Fase 3: Propuesta versión definitiva (V.2) para su aprobación por la Junta Directiva de la SEAP

A partir de este momento, y con la aprobación por parte de la Junta Directiva de la SEAP, se hará un documento público titulado *Directrices para la estimación de la carga de trabajo en citopatología, histopatología, biología molecular y digitalización (tiempo técnico) atendiendo al catálogo de muestras y procedimientos de la SEAP (2ª edición)* que será presentado en el Congreso de 2023 en el Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España.

## UNA PRIMERA CONCLUSIÓN

Estamos ante un reto ambicioso sobre el que no hay antecedentes en la literatura. El grupo de trabajo se constituye entre 29 servicios de anatomía patológica de hospitales distribuidos por toda la geografía de España, que representan casi la totalidad de las posibles versiones de nuestra especialidad. Además, este grupo está formado por 68 profesionales de la anatomía patológica (31 patólogos y 37 TSAPyC) que, a buen seguro, van a aportar lo mejor de su oficio para mejorar el conocimiento de todos. Y, además, es un proyecto que lleva una carga de ilusión añadida porque cumple con el principio de que la «anatomía patológica es un trabajo en equipo».

## Bibliografía

1. Martínez Lorente, A. et col. Directrices para la estimación de la carga de trabajo en citopatología e histopatología (tiempo médico) atendiendo al catálogo de muestras y procedimientos de la SEAP (2ª edición). Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España 2017 pp. 621-663
2. Martínez Lorente, A. et col. Abordaje del mapa de riesgos en Anatomía Patológica a través del análisis modal de fallos y sus efectos (AMFE) como elemento de mejora en la seguridad del paciente. (En prensa)
3. Giménez Más, JA et col. Gestión de los Servicios de Anatomía Patológica. Suplemento Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España, 2011

**Tabla 1.** Distribución de especialidades por Hospital.

Ciudad	Hospital	respiratorio	neuro	mama	infarto	traumato	embolismo	glan	digestivo	uro	derma	nefro	GYN	partes blandas, articulación y hueso	cardiovascular	oftalmica	BIOPSIAS Y PIEZAS	etiologia	citodiagnos	diagnAP	CITOPATOLOGIA	biología molecular	BIOLOGIA MOLECULAR	histopatología perinatal y adulto	AUTOPSIAS	DIGITAL	
1	BADALONA																										
2	CASTELLON																										
3	SAN SEBASTIAN																										
4	VALLADOLID																										
5	CADIZ																										
6	GRANADA																										
7	MADRID																										
8	ALAVA																										
9	ZARAGOZA																										
10	ZARAGOZA																										
11	ZARAGOZA																										
12	SEVILLA																										
13	ELDA																										
14	ALCALA DE HENARES																										
15	SAN CUGAT DEL VALLES																										
16	BARCELONA																										
17	ALCORCON																										
18	GETAFE																										
19	ALZIRA																										
20	MADRID																										
21	MALAGA																										
22	MALAGA																										
23	COPLADA																										
24	VALENCIA																										
25	ALICANTE																										
26	VALENCIA																										
27	BARCELONA																										
28	A CORUÑA																										
29	MADRID																										
30	CANTABRIA																										
31																											



**Tabla 2.** Cronograma.

<b>FASE</b>	Presentación Proyecto Tiempo Técnico	Constitución grupo de trabajo GTTT	FASE 1 Recogida de datos	FASE1 Elaboración datos	FASE 2 Propuesta (V.1)	FASE 2 Recogida datos V.1	FASE 2 Elaboración datos (V.2)	FASE 3 Propuesta (V.2)	FASE 3 Aprobación recomendaciones (V.2)	Presentación Recomendaciones SEAP Tiempo Técnico
<b>ROL</b>	Coordinadores Grupo de Trabajo Tiempo Técnico	TODOS	TODOS	Coordinadores Grupo de Trabajo Tiempo Técnico	TODOS	TODOS	Coordinadores Grupo de Trabajo Tiempo Técnico	TODOS	Junta Directiva SEAP	Coordinadores Grupo de Trabajo Tiempo Técnico
<b>TIEMPO</b>	CONGRESO SEAP 2021	2º trimestre 2021	3er trimestre 2021	4º trimestre 2021	1er trimestre 2022	2º trimestre 2022	3er trimestre 2022	4º trimestre 2022	1er trimestre 2023	CONGRESO SEAP 2023



