

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Comparación de tres métodos de Cuantificación del  
Índice Ki 67 y Significancia Clínica en Tumores  
Neuroendocrinos Diagnosticados en el Instituto  
Nacional de Enfermedades Neoplásicas**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Gabriela Ríos Martini

Lima, Perú

2016

### *Dedicatoria*

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, siempre paciente; a mis amigos, mi fuente de ayuda constante y, finalmente, a los biólogos peruanos reacios a dejar morir la investigación en nuestro país.

### *Agradecimientos*

A mis padres, por todas las posibilidades que hasta el día de hoy me siguen dando.

A mi hermana Kattyvon por su ayuda incondicional. Quiero agradecer de manera muy especial al equipo del departamento de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas por su apoyo en todo momento. Nunca olvidaré lo aprendido.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT .....	8
I. INTRODUCCIÓN .....	9
II. ANTECEDENTES .....	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
3.1 POBLACIÓN Y MUESTRA .....	17
3.2 INMUNOHISTOQUÍMICA .....	17
3.3 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE KI 67.....	18
3.3.1 <i>Conteo manual</i> .....	18
3.3.2 <i>Estimado “Al ojo”</i> .....	19
3.3.3 <i>Conteo con el Software ImmunoRatio</i> .....	19
3.4 <i>Análisis estadístico</i> .....	19
IV. RESULTADOS.....	21
4.1 SOBRE LA PATOLOGÍA DE LOS TUMORES.....	21
4.2 SOBRE LA CONCORDANCIA DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN KI 67 ENTRE PATÓLOGOS.....	22
4.3 SOBRE LA CONCORDANCIA DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN KI 67 EVALUADO POR EL SOFTWARE IMMUNORATIO	
23	
V. DISCUSIÓN .....	24
VI. CONCLUSIONES .....	27
VII. RECOMENDACIÓN .....	28
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....	29
IX. ANEXOS .....	35

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> SOBREVIDA TOTAL DE ACUERDO AL GRADO HISTOLÓGICO (GH) DE LOS TUMORES NEUROENDOCRINOS. (G1, G2, G3) .....	39
<b>FIGURA 2.</b> BLAND – ALTMAN <i>PLOT</i> DE LA VARIABILIDAD ENTRE-OBSERVADOR, FRENTE A CADA PATÓLOGO Y AL SOFTWARE IMMUNORATIO, QUE DEMUESTRA MEJOR CONCORDANCIA CUANDO EL KI 67 ES MENOR A 20% .....	40
<b>FIGURA 3.</b> MEDIAS DE ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN KI 67 ENTRE PATÓLOGOS Y EL SOFTWARE IMMUNORATIO. ....	41
<b>FIGURA 4.</b> EVALUACIÓN DE KI 67 CON EL SOFTWARE IMMUNORATIO. <b>A.</b> MUESTRA CON CONTEO MENOR A 3%. <b>B.</b> MUESTRA CON CONTEO ENTRE 3% - 20%. <b>C.</b> MUESTRA CON CONTEO MAYOR A 20%.....	42

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LOS CASOS DE TUMORES NEUROENDOCRINOS .....	35
<b>TABLA 2.</b> CALIDAD DE LA MUESTRA Y DE LA TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA .....	36
<b>TABLA 3.</b> DIFERENCIAS EN LECTURA DE KI 67 DE ACUERDO A CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS DE LA MUESTRA: VALOR P DE ESTADÍSTICA NO PARAMÉTRICA.....	37
<b>TABLA 4.</b> CLASIFICACIÓN DE KI 67 DE ACUERDO A LOS DIFERENTES MÉTODOS DE CONTEO .....	38

## RESUMEN

Los Tumores Neuroendocrinos son un grupo heterogéneo y poco frecuente de neoplasias que comparten características histológicas. En estos tumores se conoce que la actividad proliferativa tiene similar apariencia histológica y comportamiento clínico. Para ello, la Organización Mundial de la Salud propone evaluar el índice proliferativo de Ki 67, una proteína que un valor predictivo y de pronóstico patológico, en un conteo manual de entre 500-2000 células tumorales. El objetivo de este estudio fue comparar métodos, conteo manual, estimado "Al ojo" de tres patólogos y el Software ImmunoRatio, para evaluar el índice Ki 67 en 70 casos de Tumores neuroendocrinos. El conteo manual fue considerado el "Gold estándar". La concordancia entre métodos fue evaluada usando el coeficiente de correlación intraclase (ICC). Se encontró concordancia entre conteo manual y estimado "Al ojo" con ICC de 0.887 – 0.929. El estimado "Al ojo" obtuvo, para cada patólogo, una sobre-estimación en el 5.7%, 32.9% y 4.3% de casos y una estimación por debajo del estándar en el 5.7%, 0 y 4.3% de casos, respectivamente. El coeficiente de correlación para ImmunoRatio tuvo un ICC de 0.989. A su vez, ImmunoRatio produjo sobre-estimación en el 17.1% de casos y estimación por debajo al estándar en el 8.5%. La concordancia entre los tres métodos fue mayor cuando el índice de Ki 67 era menor. La celularidad, infiltración de linfocitos y neutrófilos, calidad de la muestra y tinción, no tuvieron efecto en la concordancia. El estudio concluye que el estimado "Al ojo" y el estimado del software ImmunoRatio mostraron buena precisión, especialmente cuando el índice Ki 67 era menor.

## ABSTRACT

Neuroendocrine tumors (NETs) are a group of infrequent and heterogeneous neoplasms that share uniform histologic characteristics. In neuroendocrine tumors originated from the Gastro Entero Pancreatic (GEP) tract, the proliferative activity has been recognized to have similar histologic appearance and clinical behavior. It is believed to be the same with NETs originated in almost all organs as well. In 2010, the World Health Organization proposes to assess the tumor's proliferative index, by taking the percentage of Ki 67 positive cells after manually counting a range of 500 to 2000 tumor cells. Ki 67 is a protein present in the nucleus surface of proliferating cells. This protein has a predictive and prognostic value. The aim of this study was to compare different methodologies used to evaluate Ki67 in Neuroendocrine Tumors (NET). Ki67 was evaluated using three methods in 70 NET cases: manual-count, eyeballed-estimate made by 3 pathologists, and ImmunoRatio software. Manual-count was the standard method. The agreement among the three methods was evaluated through intra-class correlation (ICC). The study found agreement between manual-count and eyeballed- estimate with ICC: 0.887- 0.929. The eyeballed-estimate produced, for each pathologist respectively, up-gradation in 5.7%, 32.9%, and 4.3% cases; and down-gradation in 5.7%, 0, and 4.3% cases. Agreement for ImmunoRatio-count had ICC of 0.989. ImmunoRatio produced up-gradation in 17.1% and down-gradation in 8.5% cases. Agreement between all methods was higher at low Ki 67. Cellularity, immune-cell infiltration, staining and sample quality did not affect agreement. In conclusion, the eyeball-estimate and ImmunoRatio showed good accuracy, especially at low Ki-67.

# I. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Las neoplasias neuroendocrinas o tumores neuroendocrinos (TNE) son un tipo de cáncer que surge a partir del sistema neuroendocrino difuso; este se encuentra compuesto por células que tienen propiedades tanto del sistema nervioso como endocrino. La mayoría de estas células se encuentran localizadas en órganos de los sistemas digestivo y respiratorio. En menor frecuencia, en glándulas, paraganglios, y otros tejidos. Estos tumores se caracterizan por ser de lento crecimiento. Sin embargo, pueden ser mortales dependiendo el grado de diferenciación, presencia de metástasis o por cuadros de sobreproducción hormonal. Aunque se suponen poco frecuentes, datos recientes demuestran que los TNE son cada vez más comunes alrededor del mundo, de tal forma que ha ido ganando más importancia como tema de interés e investigación en los últimos años

En el 2010, la Sociedad de Tumores Neuroendocrinos de América del Norte (NANETS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), propuso que los tumores neuroendocrinos del tracto Gastro Entero Pancreático sean clasificados sobre la base del recuento mitótico y el índice de proliferación Ki 67: G1 o bajo grado (mitosis  $<2/10$  hpf o  $2\text{mm}^2$ , o índice Ki 67  $<3\%$ ), G2 o grado intermedio (mitosis de 2 a  $20/10$  hpf, o índice Ki67 de  $3\%$  a  $20\%$ ), y G3 o de alto grado (mitosis  $>20/10$  hpf, o índice Ki67  $>20\%$ ). El índice de proliferación Ki 67, por lo general, se puede determinar incluso en casos de pequeñas biopsias.

En este marco, Ki 67 es una proteína que se encuentra en el núcleo de células en proliferación y que se expresa en las fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M del ciclo celular. Células en estado quiescente o de reposo en la fase G<sub>0</sub>, no expresan Ki 67 positivo. Esta proteína fue identificada originalmente

por Gerdes y colaboradores en Alemania a principios de 1980, haciendo uso de un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra un antígeno nuclear de línea celular descendiente de linfoma de Hodgkin. Hasta el día de hoy, el método de análisis de Ki 67 es la evaluación más prevalente inmunohistoquímica. Por medio de la inmunotinción con el anticuerpo monoclonal Ki 67, es posible evaluar la fracción de crecimiento de las poblaciones de células neoplásicas.

Si bien la OMS sugiere el método de conteo manual entre 500 y 2000 células para obtener el índice Ki 67 y así asegurar una evaluación más precisa del índice de proliferación de los tumores neuroendocrinos, hasta la fecha no existe un consenso final a nivel mundial para este análisis. Por lo tanto, en muchos países, incluyendo el Perú, el índice de proliferación Ki 67 todavía no está implementado dentro de la patología rutinaria estándar y queda por establecer la significancia clínica que representan estas limitaciones.

Por otro lado, el análisis basado en softwares digitales (o análisis computarizado), es pensado de tener potencial de reproducibilidad en interpretación de datos cuantitativos de tinciones inmunohistoquímicas en comparación al análisis microscópico tradicional. ImmunoRatio, por ejemplo, es un software de análisis cuantitativo de marcadores nucleares y está disponible al uso del público de forma gratuita.

El objetivo de este estudio fue comparar tres diferentes métodos de análisis del marcador nuclear Ki 67, conteo manual, estimación “Al ojo” de tres patólogos y el análisis del software ImmunoRatio, y determinar la significancia clínica en casos de tumores neuroendocrinos del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas 2007 – 2013 .

## II. Antecedentes

Los tumores neuroendocrinos (TNE) han sido estudiados ampliamente desde hace muchos años. El primer TNE bien diferenciado fue identificado por Siegfried Oberndorfer, quien en 1907 acuñó el término "carcinoide" o "como-carcinoma", reconociendo las características malignas relativamente bajas de este inusual tumor. Los tumores neuroendocrinos son principalmente caracterizados por la presencia de células con gránulos secretores de hormonas específicas.

Las características patológicas de un tumor dependen del órgano de origen, el grado de diferenciación, el estadio del tumor y la producción de hormonas. Tradicionalmente, los tumores neuroendocrinos han sido clasificados por su origen, tal como el tracto pulmonar, páncreas u otros órganos gastrointestinales.

En la publicación de Solcia y colaboradores (2000), la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una nueva clasificación patológica de los TNE gastroenteropancreáticos en base a la clasificación celular, tamaño del tumor primario y el sitio, marcadores de proliferación celular, capacidad de invasión local o vascular, y la producción de sustancias biológicamente activas. La clasificación rendía a los tumores neuroendocrinos como: 1) tumores endocrinos benignos bien diferenciados; 2) endocrino bien diferenciado carcinoma con potencial maligno de bajo grado y 3) pobremente diferenciado carcinoma endocrino con potencial maligno de alto grado. Subsecuentemente, Lamberts y colaboradores (2001) revisaron diferentes marcadores tumorales de neoplasias neuroendocrinas utilizados tanto para diagnóstico como para seguimiento, y repasan potenciales combinaciones que puedan elevar la sensibilidad de estas pruebas.

Mengel y colaboradores (2002) analizaron la reproducibilidad entre laboratorios y entre observadores de la evaluación del marcador de

índice proliferativo Ki 67 para determinar el crecimiento de células tumorales así como el efecto en toma de decisiones clínicas y pronóstico. Más adelante, Vilar y colaboradores (2007) realizaron una revisión sobre el rol de la expresión del marcador de proliferación Ki 67 en la neoplasia digestiva de tipo Neuroendocrina (TNE) con el fin de identificar subgrupos específicos de pacientes que obtienen mayor beneficio con quimioterapia.

Bosman y colaboradores (2010), en representación de la OMS, puso en marcha una nueva clasificación. Esta clasificación es para los tumores neuroendocrinos del tracto digestivo y está basada en el grado de diferenciación G1 o bajo grado (mitosis  $<2/10$ hpf o  $2\text{mm}^2$ , o índice Ki 67  $<3\%$ ), G2 o grado intermedio (mitosis de 2 a  $20/10$  hpf, o índice Ki67 de  $3\%$  a  $20\%$ ), y G3 o de alto grado (mitosis  $>20/10$  hpf, o índice Ki67  $>20\%$ ). La clasificación de TNE de pulmón, por ejemplo, sigue siendo basada en el trabajo de Travis y colaboradores y no ha sido cambiada desde 1981. Ante esto, Volante y colaboradores (2015) realizaron una revisión acerca de la clasificación de tumores neuroendocrinos de pulmón. Recalaron que no existe clasificación y pronóstico para neoplasias neuroendocrinas de pulmón, así como la definición de las modalidades de tratamiento y estrategias clínicas, que se basan en histotipos tumorales. Sin embargo, coinciden que la evaluación de índice proliferativo de Ki 67 puede ser una herramienta fiable y útil para determinar el comportamiento biológico y clínico de estos los tumores, con especial referencia a los carcinoides, tanto en biopsias como en resecciones quirúrgicas.

Por otro lado, Jonat y Arnold (2011) revisaron y brevemente la información sobre el uso de Ki 67 durante la toma de decisión en el tratamiento de cáncer de mama, mencionando que la inclusión del análisis de esta proteína a nivel clínico significa su uso como marcador de predicción y pronóstico. Así también, Ito y colaboradores (2011)

realizaron un estudio epidemiológico en Japón que tuvo como muestra a pacientes con Tumores Neuroendocrinos del tracto Gastroenteropancreático y Tumores Neuroendocrinos Gastrointestinales, en el cual estimaron que la prevalencia general en Japón en el año 2005 era de 2.23 y 3.45 por 100,000 personas, respectivamente. En el mismo año Kulke y colaboradores (2011), realizaron un consenso de recomendaciones clave para la evaluación de TNE pancreáticos por separado de los TNE de con diferentes primarios y la exclusión de los pacientes con grados histológicos pobremente diferenciados de los ensayos, ya que se centraron en histologías de bajo grado.

Entonces la necesidad de obtener el mejor método para este análisis comenzó a ser de prioridad. Así, Tang y colaboradores (2012) compararon la cuantificación de Ki 67 en tumores neuroendocrinos del Sistema Gastroenteropancreático (TNE/GEP) mediante el uso de dos diferentes métodos, análisis de imagen digital y conteo manual. Para ello realizaron un estudio de concordancia para evaluar diferentes técnicas de cuantificación Ki 67 incluyendo: análisis de imagen digital, el conteo manual de más de 2000 células y estimación "Al ojo" del porcentaje dado por 18 patólogos incluyendo personas con experiencia en la evaluación de Ki 67, así como otros que tenían poca experiencia previa. El análisis de imagen digital y el conteo manual fueron tuvieron un coeficiente de correlación intraclase de 0,98.

Así también Young y colaboradores (2013) compararon conteo manual y estimación "Al ojo" en TNE/GEP y encontraron que el nivel de concordancia mejoraba cuando había un menor porcentaje de Ki-67.

Inwald y colaboradores (2013) evaluaron el uso rutinario de Ki 67 como marcador de pronóstico en cáncer de mama, y analizaron las asociaciones entre los parámetros histopatológicos comunes de Ki 67 y el contexto clínico. Incluyeron un total de 3658 pacientes con cáncer

de mama invasivo, utilizados también para el análisis estadístico. Asociaron la expresión de Ki 67 con los parámetros histopatológicos comunes y encontraron la correlación más importante entre la clasificación de grado y el índice de Ki 67.

Con el mismo interés, McCall y colaboradores (2013) compararon dos parámetros usados para determinar el índice de proliferación Ki 67 e índice mitótico en 361 casos de tumores neuroendocrinos pancreáticos (PNET) del hospital John Hopkins (EE.UU). Examinaron las características histopatológicas e índice de sobrevida de 500 células por caso y las compararon con los grados determinados según los índices Ki 67 y mitótico, respectivamente. Demostraron que las calificaciones según índice mitótico e índice Ki 67 en TNE del páncreas son a menudo discordantes, y cuando el grado de Ki 67 es mayor que el grado de mitosis, los resultados clínicos y las características histopatológicas son significativamente peores que aquellos donde el grado 1 es concordante en ambos métodos. A una conclusión similar llegaron Vélayoudom-Céphise y colaboradores (2013), quienes describieron características patológicas de los tumores neuroendocrinos y describieron que otras células pueden confundirse con células tumorales cuando se realiza el conteo de Ki 67.

Hasegawa y colaboradores (2013) evaluaron la viabilidad de la clasificación de tumores neuroendocrinos pancreáticos (TNEP) mediante el índice de Ki 67. Encontraron que la tasa de concordancia se elevaba a 90% cuando las muestras con menos de 2000 células tumorales eran excluidas. Un año después, Reid y colaboradores (2014) realizaron una revisión de conceptos actuales, consensos y controversias acerca de los tumores neuroendocrinos del páncreas. Repasaron el método de diagnóstico, la clasificación de estos tumores según el índice proliferativo Ki 67 y el valor de los intervalos de corte. La gran controversia recae en la falta de un método estándar para el

conteo de Ki 67, aunque mencionan al conteo manual por imagen capturada en ordenador la más práctica por el momento.

Más adelante, Miller y colaboradores (2014) evaluaron la utilidad del índice de Ki 67 en el diagnóstico de 161 pacientes con tumores neuroendocrinos Gastroenteropancreático con respecto al estadio de la enfermedad en la práctica clínica. Además, compararon los niveles de Ki 67 en tumores primarios y metástasis en un subgrupo de pacientes para dilucidar la necesidad de múltiples biopsias en diferentes sitios de la enfermedad. Encontraron que hubo metástasis de la enfermedad en 46,1% de los tumores grado 1, 77,8% en grado 2, y 100% de los tumores grado 3. Concluyeron que los pacientes que muestran un elevado índice de proliferación Ki 67 presentan con metástasis en la gran mayoría de casos; los diferentes sitios de la enfermedad pueden expresar niveles de proliferación Ki 67 heterogéneos.

Kim y colaboradores (2014) evaluaron la significancia clínica de Ki 67 y las expresiones de p53 en 34 pacientes con cáncer de cabeza de páncreas entre los años 2008 y 2013. Pese a que no encontraron una correlación entre Ki 67 y expresión de p53, los pacientes que expresaban ambos marcadores experimentaron recurrencias tumorales más frecuentes dentro de 1 año después de la resección quirúrgica. Para Ki 67, determinaron que existía una relación importante entre este y el grado patológico, metástasis de nódulos linfáticos y estado clínico.

En datos recientes, Blaker y colaboradores (2015) realizaron un estudio del análisis computarizado del índice de proliferación celular Ki 67 en 62 pacientes con linfomas de células de manto. Desarrollaron dos software para el proyecto, 'ImmunoPath' y 'Manual Counter', en los cuales un patólogo experimentado y un estudiante de doctorado

trabajaron áreas representativas de cada biopsia. Alternativamente realizaron conteo manual de 1000 células por caso de todas las imágenes digitalizadas, así como también estimación semi-cuantitativa. Encontraron una fuerte correlación entre el conteo manual y análisis de imagen computarizado de las mismas imágenes.

Hijioka y colaboradores (2015) cuestionaron la clasificación de la OMS (2010) de realmente caracterizar carcinomas neuroendocrinos del páncreas, concluyendo que estos neoplasmas están compuestos de subgrupos heterogéneos con diferentes perfiles de acuerdo a su índice proliferativo Ki 67 y mutaciones KRAS. Finalmente, Kroneman y colaboradores (2015) realizaron un estudio con el fin de comparar tres métodos de cuantificación del índice proliferativo de Ki 67 con el resultado clínico, afín de determinar el mejor método para la práctica clínica en tumores neuroendocrinos pancreáticos (PNET), el primer un promedio de estimación “Al ojo” por tres patólogos; el segundo fue conteo de al menos 500 células tumorales; y finalmente, análisis de imágenes digitales seleccionando 8-10 regiones realizó en 97 tumores neuroendocrinos pancreáticos resecados. Se emplearon los tres métodos de cuantificación: Los tres métodos de cuantificación para el índice Ki 67 tenían un acuerdo casi perfecto. La concordancia entre el conteo manual y análisis de imágenes digitales y entre el conteo manual y la estimación promedio “Al ojo” fueron 0,97 y 0,88, respectivamente. La concordancia entre estimación “Al ojo” entre los tres patólogos fue de 0,86. Los tres métodos correlacionaron la sobrevida de los pacientes con el sistema de la OMS en el 2010. Los puntajes de estimación “Al ojo” fueron significativamente menores que los de los otros dos métodos y tendían a rebajar más tumores de grado 1, pero tenían mayor capacidad predictiva para la sobrevida y la recurrencia.

## III. Materiales y Métodos

### 3.1 Población y Muestra

Se consideraron 70 casos para el estudio. La población del estudio representa todos los casos de Neoplasia Neuroendocrina diagnosticados en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) durante el periodo 2008 – 2013 y fueron sujetos a la firma de consentimiento informado para uso posterior en estudios llevados a cabo por el departamento de Investigación del INEN. No se tomaron en cuenta para el estudio aquellos casos que no contaban con muestras de resección o biopsia para análisis inmunohistoquímico. Las localizaciones primarias de las neoplasias fueron páncreas, estómago, esófago, vías biliares, hígado, pulmón, cérvix, mediastino, antro, ovarios, colon, recto y canal anal.

Todo el estudio se llevó a cabo en el departamento de investigación y laboratorios asociados del INEN.

### 3.2 Inmunohistoquímica

Los bloques de tejido incluidos en parafina fueron utilizados para la tinción inmunohistoquímica. Se cortaron zonas de tejido de tres micrómetros de grosor. La tinción se realizó con el anticuerpo monoclonal de ratón Ki67 (clon MIB-1 Dako, Glostrup, Dinamarca) 0,175 mg/ml usando el kit de detección EnVision (Dako) en una LabVision Autostainer (Thermo Scientific, Fremont, California). El protocolo de tinción consistió en desparafinación usando EZ Prep, la recuperación de antígeno se realizó durante 30 minutos usando el Cell Conditioner (tampón de Tris-EDTA); la incubación con el anticuerpo monoclonal Ki 67 por 32 min a 37°C (clon MIB-1, dilución 1/20 hecha

Dako Background Reducing Diluent (BRD) (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Las láminas fueron coloreadas con hematoxilina II durante 8 minutos y luego con reactivo Bluing durante 4 minutos. Los tejidos de control positivo (ganglios linfáticos) fueron inmunomarcados en paralelo con todos los casos de estudio. Las láminas marcadas fueron deshidratadas y cubiertas en un medio de montaje a base de xileno. El análisis inmunohistoquímico se realizó en el departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. La inmunoreactividad Ki 67, para todos los métodos de evaluación, fue expresada como el porcentaje de células tumorales con tinción nuclear.

### **3.3 Métodos de Cuantificación de Ki 67**

Las láminas con tinción inmunohistoquímica fueron escaneadas con Dako Automated Cellular Imaging System ACISIII (Carpinteria, CA) usando un objetivo x10. Las imágenes resultantes de sección entera fueron revisadas por un patólogo para determinar el patrón y la uniformidad de la tinción. El umbral para el tamaño y forma de las células tumorales fue calibrado manualmente para excluir las células del estroma. Es decir, células con coloración marrón (3,3-diaminobenzidina) y células de color azul (hematoxilina) fueron separadas espectralmente.

Los métodos de conteo llevados a cabo fueron: (1) Conteo Manual, (2) Estimación 'Al ojo' de 3 patólogos clínicos y (3) Conteo con el Software ImmunoRatio.

#### **3.3.1 Conteo manual**

Se tomaron capturas digitales usando un microscopio Leica dm750 (40x) conectado a una cámara digital Leica icc50hd con el software 2.6v. Se realizaron tomas digitales de 5 diferentes campos (formato JPEG, resolución 2048x1536) de las áreas del

tumor con mayor proliferación, incluyendo un mínimo de 400 células tumorales por captura. (Total aproximado de 2000 células).

Se contaron alrededor de 2000 células tumorales (362-2962, media 1641) en cada imagen capturada, la inmunorreactividad de Ki 67 se expresó como porcentaje de células positivas en el total de células tumorales.

### **3.3.2 Estimado “Al ojo”**

Un total de tres distintos patólogos evaluaron las imágenes capturadas de tejidos de TNEs. Cada uno realizó una estimación del índice de proliferación Ki 67 basado en una inspección sin realizar un conteo formal de células.

### **3.3.3 Conteo con el Software ImmunoRatio**

El análisis de las imágenes capturadas se realizó haciendo uso del Software de alcance público ImmunoRatio. Se usaron las mismas 5 imágenes previamente evaluadas por conteo manual y estimado “Al ojo”. El análisis del software proporcionó una imagen ‘semi-coloreada’ con porcentajes de proliferación celular según tinción Ki 67.

## **3.4 Análisis estadístico**

Para este estudio, el conteo manual de Ki 67 fue tomado en cuenta como ‘Gold estándar’, la concordancia con los otros métodos fue evaluado haciendo uso del *plot* Bland – Altman y el coeficiente de correlación intraclase. Se graficaron el *plot* de Bland – Altman, la diferencia de medias entre los métodos de conteos y los límites de

concordancia (Límites de concordancia: media  $\pm$  desviación estándar). El coeficiente de correlación intraclase fue estimado usando un modelo de varianza. A su vez, los intervalos de confianza (ICs) fueron calculados usando aproximación normal asintótica. Se atribuyó el valor máximo de 1 cuando había correlación positiva y 0 cuando la correlación era pobre. Se atribuyeron valores de 0.0-0.2, 0.2-0.4, 0.4-0.6, 0.6-0.8 y 0.8-1 correspondientes a correlación leve, regular, moderada, substancial y casi perfecta.

La influencia de características patológicas (fibrosis, celularidad, infiltración de células del sistema inmunitario, calidad de tinción IHQ, calidad de la muestra, grado histológico, tipo de biopsia) sobre la concordancia entre las metodologías fue analizada usando la U Mann – Whitney (entre fibrosis y celularidad) y el test de Kruskal – Wallis (Calidad de muestra, infiltración de células del sistema inmunológico, tinción de IHQ y grado histológico tipo de biopsia).

Los datos fueron almacenados en el programa Microsoft Excel 2010 y procesados haciendo uso del adelante procesados con el Software SPSS versión 23.0 y paquete R versión 3.1.2.

## IV. Resultados

### 4.1 Sobre la patología de los tumores

La mediana de edad en el estudio fue de 60 años. El 61.4% de la población correspondió a mujeres y el 38.6% a hombres. La mayor incidencia de tumor primario se encontró en el tracto intestinal (18.5%), seguida por los órganos del sistema reproductivo femenino (15.7%), páncreas (14.3%), el hígado y la vesícula biliar (12.9%), el esófago y el estómago (11.4%), pulmón y timo (8.6%), cabeza y cuello (7.1%) y tracto urinario (7.1%). La mayoría de casos tenían estadio clínico 4 (52.9%) y 3 (27.1%). Bajo la metodología de recuento manual, considerada la 'Gold estándar' para el estudio, se encontró que el 58.6% de casos tuvieron un conteo de Ki 67 mayor a 20%, el 22.9% de casos entre el 3-20% y 18.6% menor a 3% (Tabla 1). El 65% de los pacientes murió y la mediana de seguimiento fue de 3.6 años (IC95%: 1.9 a 5.3). El análisis de sobrevida en relación al conteo manual encontró una asociación inversa entre Ki 67 y la sobrevida global ( $p < 0.001$ ). Así, los casos con Grado 3 (G3) mostraron mal pronóstico con una sobrevida media de 10 meses. El 67.1% de los casos tenían solo una biopsia simple mientras que el 32.9% de tumores fueron sometidos a resección.

Con respecto a la calidad de las muestras se encontró alta celularidad en el 44.3%, alto grado de fibrosis en el 12%, alto grado de infiltración de linfocitos en el 14.3% y un grado moderado de infiltración de neutrófilos en el 12.9%. El 78.6% de muestras fueron consideradas de buena calidad para el estudio mientras que 45% presentaron buena calidad de tinción inmunohistoquímica.

## 4.2 Sobre la concordancia del Índice de proliferación Ki 67 entre patólogos

En la comparación del estimado “Al ojo” realizada por tres patólogos del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), se encontró la tendencia de sobre-estimar el grado del tumor en 4 (4.2%), 23 (32%) y 3 (13.6%) casos, para los patólogos A, B y C respectivamente. De igual manera, se encontraron 4 (5.7%), 0 y 3 (13.6%) casos en los que los patólogos A, B y C, mostraron tendencia a disminuir el grado de los tumores. Se encontró alta concordancia entre los métodos de conteo manual y estimado “Al ojo”, con un ICC de 0.887 (95% CI, 0.825-0.928) para el patólogo A, 0.917 (95% CI, 0.870-0.950) para el patólogo B y 0.929 (95% CI, 0.889-0.955) para el patólogo C.

El estimado “Al ojo” tuvo mejor concordancia con el conteo manual de Ki 67 cuando el índice era menor a 3% ,  $-0.88 \pm 0.74$  para el patólogo A,  $0.66 \pm 0.78$  para el patólogo B y  $-1.88 \pm 5.30$  para el patólogo C ( $p=0.107$ ). La concordancia entre los mismos, pero con índice de proliferación Ki 67 de 3% a 20%, presentaron  $1.81 \pm 5.27$  para el patólogo A,  $6.06 \pm 3.29$  para el patólogo B y  $-0.07 \pm 4.57$  para el patólogo C ( $p=0.183$ ). Se encontró baja concordancia cuando el nivel de proliferación era mayor a 20%, de tal forma que el patólogo A obtuvo  $-6.13 \pm 16.0$ , el patólogo B  $12.85 \pm 15.0$  y el patólogo C  $-3.13 \pm 17.4$  ( $p=0.004$ ).

El *plot* Bland – Altman indicó que los niveles de concordancia fueron más elevados cuando el índice de proliferación era menor. (Tabla 4 y Figura 2).

Al evaluar si la celularidad, el grado de fibrosis, nivel de infiltración células del sistema inmune o el tamaño y calidad de la muestra tuvieron algún efecto en la consistencia entre-observadores, no se encontró mayor asociación ( $p>0.05$ ). Así, únicamente el estimado

“Al ojo” del patólogo A presentó baja precisión cuando las muestras tenían alta celularidad ( $p=0.013$ ). (Tabla 3)

### **4.3 Sobre la concordancia del Índice de Proliferación Ki 67 evaluado por el Software ImmunoRatio**

Al comparar el conteo manual (Gold estándar) con el conteo del programa ImmunoRatio se encontró sobre-estimación de grado en 12 casos (17.14) y disminución de grado en 6 casos (8.57%). La concordancia para estos dos métodos obtuvo un ICC de 0.989 (95% IC, 0.841-0.935).

El conteo con el software ImmunoRatio obtuvo un correcto conteo de índice de proliferación Ki 67 cuando este era menor a 3%. ( $-1.25\pm 2.47$ ) y entre los rangos de 3-20% ( $2.18\pm 4.60$ ). Cuando el índice era mayor a 20% la concordancia fue menor ( $11.01\pm 15.31$ ). (Tabla 4) (Figura 2)

Al evaluar si la celularidad, el grado de fibrosis, nivel de infiltración de neutrófilos y linfocitos o el tamaño y calidad de la muestra tuvieron algún efecto en el conteo hecho por el software ImmunoRatio, no se encontró ninguna asociación ( $p>0.05$ ). (Tabla 3)

## V. Discusión

El índice de proliferación de un tumor es un elemento clave para la evaluación patológica y la decisión clínica de diferentes neoplasias malignas. Existe una aceptación general de que el índice de proliferación de Ki 67 se correlaciona positivamente con la actividad mitótica, invasión linfo-vascular, necrosis y estadio de un tumor [4,24]. Diferentes estudios han demostrado la pobre reproducibilidad entre observadores para la interpretación de valores de Ki 67. A través de los años, ha habido intentos de proveer una estandarización del índice de proliferación Ki 67 en los diagnósticos histopatológicos [7,34-35]

El índice de proliferación Ki 67 es un elemento crítico para el manejo de tumores neuroendocrinos y ha sido incorporado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2010 como un factor a tomar en cuenta para la clasificación de este tipo de tumores. Así, la OMS recomienda que para tumores neuroendocrinos Gastro-Entero-Pancreáticos (GEP-NET), que el conteo manual de Ki 67 sea considerado el "Gold estándar". Sin embargo, existe poca información acerca de la reproducibilidad de esta técnica en tumores neuroendocrinos con otra localización [29,30,17]. Este estudio utilizó el conteo manual de índice de proliferación Ki 67 como su estándar y, bajo ese método, el análisis de sobrevida encontró que para los 70 casos evaluados un menor porcentaje de Ki 67 está asociado con mejor pronóstico. La comparación de conteo manual de Ki 67 versus el estimado "Al ojo" realizado por tres patólogos, encontró que esta última, un método de la práctica clínica diaria, presenta una precisión similar al Gold estándar. Sin embargo, las pequeñas diferencias de los conteos entre observadores fueron, en ocasiones, suficiente para cambiar el grado del tumor neuroendocrino. Se recalca que estadísticamente, el mayor coeficiente de correlación entre

observadores y conteo manual se consiguió cuando el índice de Ki 67 era menor a 3%. De manera similar, Young y colaboradores encontraron una menor precisión para el estimado “Al ojo” cuando el índice de Ki 67 era bajo, en un estudio de 95 casos de tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos [21,42]. La comparación de conteo manual de Ki 67 frente al Software ImmunoRatio encontró que este último es un método objetivo con exactitud comparable. (ICC 0.989)[13]. De manera semejante, diferentes estudios han encontrado que con el uso de este software se obtienen resultados similares al conteo manual de Ki 67 [34]. El software digital evalúa cada célula tumoral con una metodología objetiva. La implementación de análisis digitales patológicos requiere sustancial contribución de patólogos durante la creación e implementación de softwares [34, 8-28].

Existen diferentes estudios que describen algunos de los factores que pueden producir diferentes cálculos de Ki 67 entre observadores. Algunos estudios describen que cuando hay bajo nivel de celularidad se puede producir una sobre-estimación de Ki 67. De la misma manera, un alto valor de infiltración de linfocitos y neutrófilos puede influenciar en la sobre-estimación de Ki 67 dado que estas células tienen un alto índice de proliferación [32,38].

La calidad de tinción de Ki 67 también ha sido asociada a variación en la evaluación de Ki 67 [6].

De la misma manera, la calidad del tejido de la muestra, la presencia de necrosis y/o fibrosis han sido descritas como factores influyentes en la interpretación de Ki 67[41].

Este estudio usó casos de tumores neuroendocrinos con diferentes localizaciones primarias para ilustrar el desafío que significa la evaluación de Ki 67 en un grupo heterogéneo de tumores, para los cuales este biomarcador provee información clínica relevante. Esto es particularmente relevante cuando se toma en consideración que un error en el diagnóstico de un Carcinoma neuroendocrino pobremente diferenciado (G3) conlleva a una estrategia terapéutica inadecuada o

innecesaria a un paciente con una enfermedad potencialmente progresiva. Este estudio encontró que la mayor discrepancia en evaluación de Ki 67 ocurrió en tumores con grados G2 y G3 (OMS – Ki 67>2%). Una limitación adicional de la evaluación de Ki 67 es la heterogeneidad intratumoral inherente [41] y el hecho que solo una pequeña parte del tumor, ya sea por resección o biopsia, puede ser evaluada con tinción inmunohistoquímica para Ki 67. Entonces, una evaluación global del estado proliferativo no puede ser realizado, porque es imposible tomar como muestra un tumor en su totalidad. Este problema puede ganar mayor relevancia en tumores en los cuales un alto grado focal es un componente de su perfil biológico [38]. Sin embargo, en este estudio no se encontró ninguna asociación importante entre estos factores y las diferencias entre evaluaciones de Ki 67. Sí se encontró una asociación estadística con la calidad de las muestras ( $p = 0.054$ ) y la celularidad ( $p= 0.03$ ) en los datos de un solo patólogo.

La proteína Ki 67 ha sido respaldada por la Organización Mundial de la Salud como adecuada para determinar grados de tumores neuroendocrinos del tracto gastroenteropancreático. Se debería reconocer que la evaluación del índice proliferativo Ki 67 tiene algunas desventajas, como diferir en resultado entre distintos patólogos e incluso usando softwares digitales. Adicionalmente, estudios recientes encuentran que el comportamiento de la enfermedad no es homogéneo molecularmente, ni tampoco en la respuesta al tratamiento [11]. Entonces, la determinación una estrategia de terapia específica debería estar sujeta a las características clinicopatológicas de un tumor individual.

## VI. Conclusiones

- i. Se logró determinar la presencia de la proteína Ki 67 en todas las muestras analizadas y sometidas a tinción inmunohistoquímica.
- ii. Se cuantificó el índice proliferativo Ki 67 con cada uno de los métodos de evaluación.
- iii. Se concluye que la evaluación manual, considerada 'Gold estándar' obtuvo resultados muy cercanos a los métodos de conteo 'Al ojo' y mediante el Software ImmunoRatio.
- iv. La correlación entre los tres métodos fue más alta cuando el índice de Ki 67 era menor.
- v. Al comparar tres métodos de cuantificación se corroboró la significancia clínica en el desenlace de la enfermedad

## VII. Recomendación

Se recomienda que el uso de software de análisis digital debería ser incluido en los reportes patológicos de uso rutinario.

## VIII. Referencia Bibliográfica

1. Arisawa, Emilia Angela Loschiavo, Moraes, Elisabete, da Rocha, Rosilene Fernandes, & de Almeida, Janete Dias. (2010). Marcadores biológicos: PCNA e Ki 67 breve revisão. *Brazilian Dental Science*, 2(1).
2. Blaker, Yngvild N, Brodtkorb, Marianne, Maddison, John, Hveem, Tarjei S, Nesheim, John Arne, Mohn, Hans Martin, . . . Smeland, Erlend B. (2015). Computerized image analysis of the Ki-67 proliferation index in mantle cell lymphoma. *Histopathology*.
3. Bosman FT, Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N.D. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 4th edition ed. France: IARC Press, International Agency for Research on Cancer; 2010.
4. Cho, C. S., Labow, D. M., Tang, L., Klimstra, D. S., Loeffler, A. G., Levenson, G. E., ... & Blumgart, L. H. (2008). Histologic grade is correlated with outcome after resection of hepatic neuroendocrine neoplasms. *Cancer*, 113(1), 126-134.
5. Cserni, Gábor, Vörös, András, Liepniece-Karele, Inta, Bianchi, Simonetta, Vezzosi, Vania, Grabau, Dorthe, . . . Foschini, Maria Pia. (2014). Distribution pattern of the Ki67 labelling index in breast cancer and its implications for choosing cut-off values. *The Breast*, 23(3), 259-263.
6. Cross SS, Start RD, Smith JH. (1990) Does delay in fixation affect the number of mitotic figures in processed tissue? *J Clin Pathol*. 1990;43(7):597-9.
7. Grzybicki, D. M., Liu, Y., Moore, S. A., Brown, H. G., Silverman, J. F., D'Amico, F., & Raab, S. S. (2001). Interobserver variability associated with the MIB-1 labeling index. *Cancer*, 92(10), 2720-2726.
8. Hedvat CV. Digital microscopy: past, present, and future. *Arch Pathol*

*Lab Med.* 2010;134(11):1666-70.

9. Harvey, J., Thomas, C., Wood, B., Hardie, M., Dessauvagie, B., Combrinck, M., ... & Sterrett, G. (2015). Practical issues concerning the implementation of Ki-67 proliferative index measurement in breast cancer reporting. *Pathology*, 47(1), 13-20.
10. Hasegawa, Toshiyuki, Yamao, Kenji, Hijioka, Susumu, Bhatia, Vikram, Mizuno, Nobumasa, Hara, Kazuo, . . . Kondo, Shinya. (2013). Evaluation of Ki 67 index in EUS–FNA specimens for the assessment of malignancy risk in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endoscopy*, 10, 0033-1344958.
11. Hijioka, S., Hosoda, W., Mizuno, N., Hara, K., Imaoka, H., Bhatia, V., ... & Yogi, T. (2015). Does the WHO 2010 classification of pancreatic neuroendocrine neoplasms accurately characterize pancreatic neuroendocrine carcinomas?. *Journal of gastroenterology*, 50(5), 564-572.
12. Inwald, EC, Klinkhammer-Schalke, M, Hofstädter, F, Zeman, F, Koller, M, Gerstenhauer, M, & Ortmann, O. (2013). Ki 67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast cancer research and treatment*, 139(2), 539-552.
13. Isola J, Tuominen V. ImmunoRatio web application. 2010. Available: <http://153.1.200.58:8080/ImmunoRatio/>. Version: 1.0c. Institute of Biomedical Technology, University of Tampere, Finland.
14. Ito, Tetsuhide, Sasano, Hironobu, Tanaka, Masao, Osamura, R Yoshiyuki, Sasaki, Iwao, Kimura, Wataru, . . . Nakao, Kazuwa. (2010). Epidemiological study of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in Japan. *Journal of gastroenterology*, 45(2), 234-243.
15. Jonat, W, & Arnold, N. (2011). Is the Ki 67 labelling index ready for clinical use? *Annals of oncology*, 22(3), 500-502.
16. Kim, Hohyun, Park, Chan Yong, Lee, Jae Hyuk, Kim, Jung Chul, Cho, Chol-Kyoon, & Kim, Hee Jun. (2015). Ki 67 and p53 expression as a predictive marker for early postoperative recurrence in pancreatic

head cancer. *Annals of surgical treatment and research*, 88(4), 200-207.

17. Kloppel G, Rindi G, Perren A, Komminoth P, Klimstra DS. The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement. *Virchows Arch*. 2010;456(6):595-7.
18. Kroneman, Trynda N, Voss, Jesse S, Lohse, Christine M, Wu, Tsung-Teh, Smyrk, Thomas C, & Zhang, Lizhi. (2015). Comparison of Three Ki 67 Index Quantification Methods and Clinical Significance in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Endocrine pathology*, 26(3), 255-262.
19. Kulke, Matthew H, Siu, Lillian L, Tepper, Joel E, Fisher, George, Jaffe, Deborah, Haller, Daniel G, . . . Hobday, Timothy J. (2011). Future directions in the treatment of neuroendocrine tumors: consensus report of the National Cancer Institute Neuroendocrine Tumor clinical trials planning meeting. *Journal of Clinical Oncology*, 29(7), 934-943.
20. Lamberts, Steven WJ, Hofland, Leo J, & Nobels, Frank RE. (2001). Neuroendocrine tumor markers. *Frontiers in neuroendocrinology*, 22(4), 309-339.
21. Lejeune M, Jaen J, Pons L, Lopez C, Salvado MT, . . . , Bosch R. (2008) Quantification of diverse subcellular immunohistochemical markers with clinicobiological relevancies: validation of a new computer-assisted image analysis procedure. *J Anat.*;212(6):868-78.
22. McCall, Chad M, Shi, Chanjuan, Cornish, Toby C, Klimstra, David S, Tang, Laura H, Basturk, Olca, . . . Choti, Michael A. (2013). Grading of well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors is improved by the inclusion of both Ki67 proliferative index and mitotic rate. *The American journal of surgical pathology*, 37(11), 1671.
23. Mengel M, von Wasielewski R, Wiese B, Rudiger T, Muller-Hermelink HK, Kreipe H. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki 67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol*. 2002;198(3):292-9.

24. Miller, HC, Drymouisis, P, Flora, R, Goldin, R, Spalding, D, & Frilling, A. (2014). Role of Ki 67 proliferation index in the assessment of patients with neuroendocrine neoplasias regarding the stage of disease. *World journal of surgery*, 38(6), 1353-1361.
25. Modlin, I. M., Oberg, K., Chung, D. C., Jensen, R. T., de Herder, W. W., Thakker, R. V., ... & Moss, S. F. (2008). Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *The lancet oncology*, 9(1), 61-72.
26. Oberndorfer S. (1907) Karzinoide Tumoren des Dünndarms. *Frankf Z Pathol*; 1:426-432.
27. Reid, Michelle D., Balci, Serdar., Saka, Burcu., & Adsay, N Volkan. (2014). Neuroendocrine tumors of the pancreas: current concepts and controversies. *Endocrine pathology*, 25(1), 65-79.
28. Remes SM, Tuominen VJ, Helin H, Isola J, Arola J. Grading of neuroendocrine tumors with Ki 67 requires high-quality assessment practices. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(9):1359-63.
29. Rindi, G., Klöppel, G., Alhman, H., Caplin, M., Couvelard, A., De Herder, W. W., ... & Körner, M. (2006). TNM staging of foregut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Archiv*, 449(4), 395-401.
30. Rindi, G., Klöppel, G., Couvelard, A., Komminoth, P., Körner, M., Lopes, J. M., ... & Scoazec, J. Y. (2007). TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Archiv*, 451(4), 757-762.
31. Rouzbahman, Marjan, & Clarke, Blaise. (2013). *Neuroendocrine tumors of the gynecologic tract: select topics*. Paper presented at the Seminars in diagnostic pathology.
32. Scholzen, Thomas, & Gerdes, Johannes. (2000). The Ki 67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, 182(3), 311-322.
33. Solcia E, Kloppel G, Sobin L. (2000) *Histological Typing of Endocrine Tumours. WHO International Histological Classification of Tumours*. Berlin: Springer.
34. Tang, Laura H., Gonen, Mithat, Hedvat, Cyrus, Modlin, Irvin M, & Klimstra, David S. (2012). Objective quantification of the Ki67

proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods. *The American journal of surgical pathology*, 36(12), 1761-1770.

35. Tang, Laura H., GM, Hedvat C, Modlin IM, Klimstra DS. (2011) An objective assessment of Ki67 proliferative index quantification in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (NETs). *Mod Pathol.*;22:170A.
36. Tang LH, Klimstra DS. (2011). Conundrums and Caveats in Neuroendocrine Tumors of the Pancreas. *Surg Pathol Clin* ;4(2):589-624.
37. Tang LH SJ, Vakiani E, Dhall D, Klimstra DS. (2008) High grade transformation of differentiated neuroendocrine neoplasms (NENs) of the enteropancreatic system—a unique entity distinct from de novo high grade neuroendocrine carcinoma (HGNECa) in pathogenesis and clinical behavior. *Mod Pathol.*; 21:137A.
38. Vélayoudom-Céphise, F. L., Duvillard, P., Foucan, L., Hadoux, J., Chougnet, C. N., Leboulleux, S., ... & Caramella, C. (2013). Are G3 ENETS neuroendocrine neoplasms heterogeneous? *Endocrine-related cancer*, 20(5), 649-657.
39. Vilar, E., Salazar, R., Pérez-García, J., Cortes, J., Öberg, K., & Tabernero, J. (2007). Chemotherapy and role of the proliferation marker Ki-67 in digestive neuroendocrine tumors. *Endocrine-Related Cancer*, 14(2), 221-232.
40. Volante, Marco., Gatti, Gaia., & Papotti, Mauro. (2015). Classification of lung neuroendocrine tumors: lights and shadows. *Endocrine*, 1-5.
41. Yang Z, Tang LH, Klimstra DS. (2011) Effect of tumor heterogeneity on the assessment of Ki67 labeling index in well-differentiated neuroendocrine tumors metastatic to the liver: implications for prognostic stratification. *Am J Surg Pathol.*;35(6):853-60.
42. Young HT, Carr NJ, Green B, Tilley C, Bhargava V, Pearce N.

Accuracy of visual assessments of proliferation indexes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *J Clin Pathol.* 2013;66(8):700-4.

## IX. Anexos

**Tabla 1.** Características clinicopatológicas de los casos de tumores neuroendocrinos

	n	%
Casos	70	
<b>Edad</b>		
Media (rango)	60 (20, 80)	-
<b>Sexo</b>		
Femenino	43	61.4
Masculino	27	38.6
<b>Estadio clínico</b>		
I-II	14	20.0
III	19	27.1
IV	37	52.9
<b>Localización</b>		
Timo	3	4.3
Pulmón	3	4.3
Cabeza & cuello	5	7.1
Hígado	7	10.0
Cérvix	8	11.4
Útero-ovario	3	4.3
Urinario	5	7.1
Tracto Intestinal	13	18.5
Esófago & Estomago	8	11.4
Vejiga	2	2.9
Páncreas	10	14.3
Otros	3	4.2
<b>Tipo de biopsia</b>		
Biopsia	47	67.1
Resección quirúrgica	23	32.9
<b>Grado Tumoral (Según conteo manual Ki 67)</b>		
G1 (3%)	13	18.9
G2 (3-20%)	16	22.9
G3 (20%)	41	58.6

**Tabla 2.** Calidad de la muestra y de la tinción inmunohistoquímica

	n	%
Casos	70	
<b>Calidad de la muestra</b>		
Buena	55	78.6
Mala	15	21.4
<b>Calidad de la tinción IHQ</b>		
Buena	32	45.7
Regular	20	28.6
Mala	18	25.7
<b>Fibrosis</b>		
No	61	87.1
Si	9	12.9
<b>Celularidad</b>		
Bajo	12	17.1
Medio	27	38.6
Alto	31	44.3
<b>Linfocitos</b>		
Bajo	14	20.0
Moderado	44	62.9
Alto	10	14.3
<b>Neutrófilos</b>		
Ninguno	23	32.9
Bajo	35	50.0
Moderado	9	12.9

**Tabla 3.** Diferencias en lectura de Ki 67 de acuerdo a características patológicas de la muestra: valor p de estadística no paramétrica.

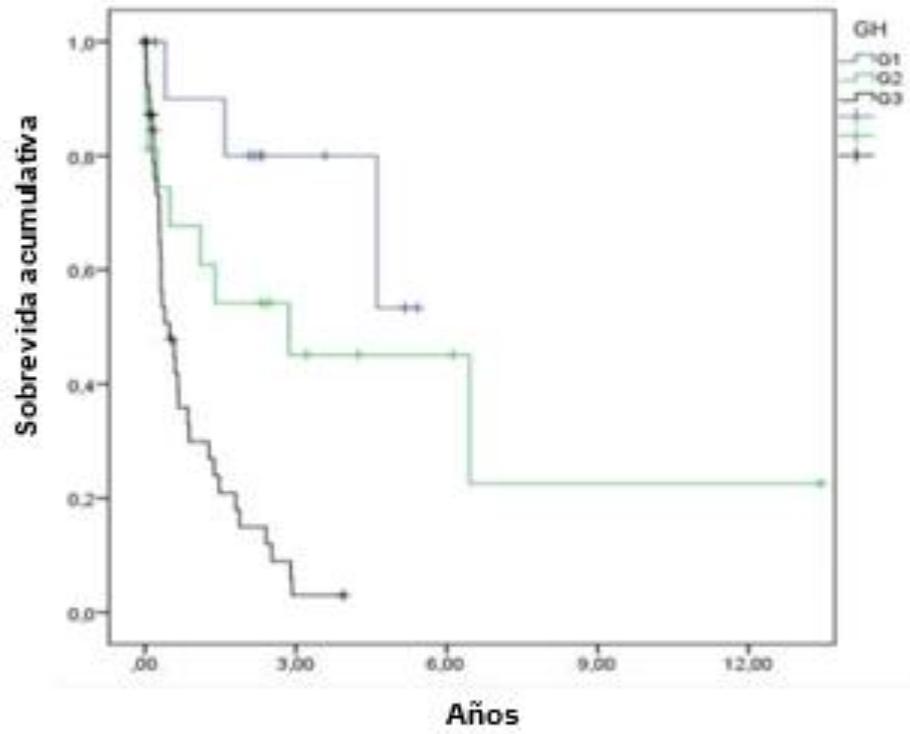
\*Test de U Mann – Whitney, \*\*Test de Kruskal – Wallis.

		Calidad de Muestra*	Calidad de IHQ**	Celularidad**	Linfocitos**	Neutrófilos**	GH**	Tipo de biopsia**
Manual	–						0.01	
Patólogo A	0.425	0.080	0.541	0.013	0.773	0.842	3	0.731
Manual	–						0.00	
Patólogo B	0.680	0.198	0.295	0.702	0.841	0.102	1	0.232
Manual	–						0.46	
Patólogo C	0.305	0.704	0.640	0.803	0.583	0.202	7	0.099
Manual	-						0.00	
ImmunoRatio	0.617	0.238	0.489	0.284	0.574	0.216	3	0.071

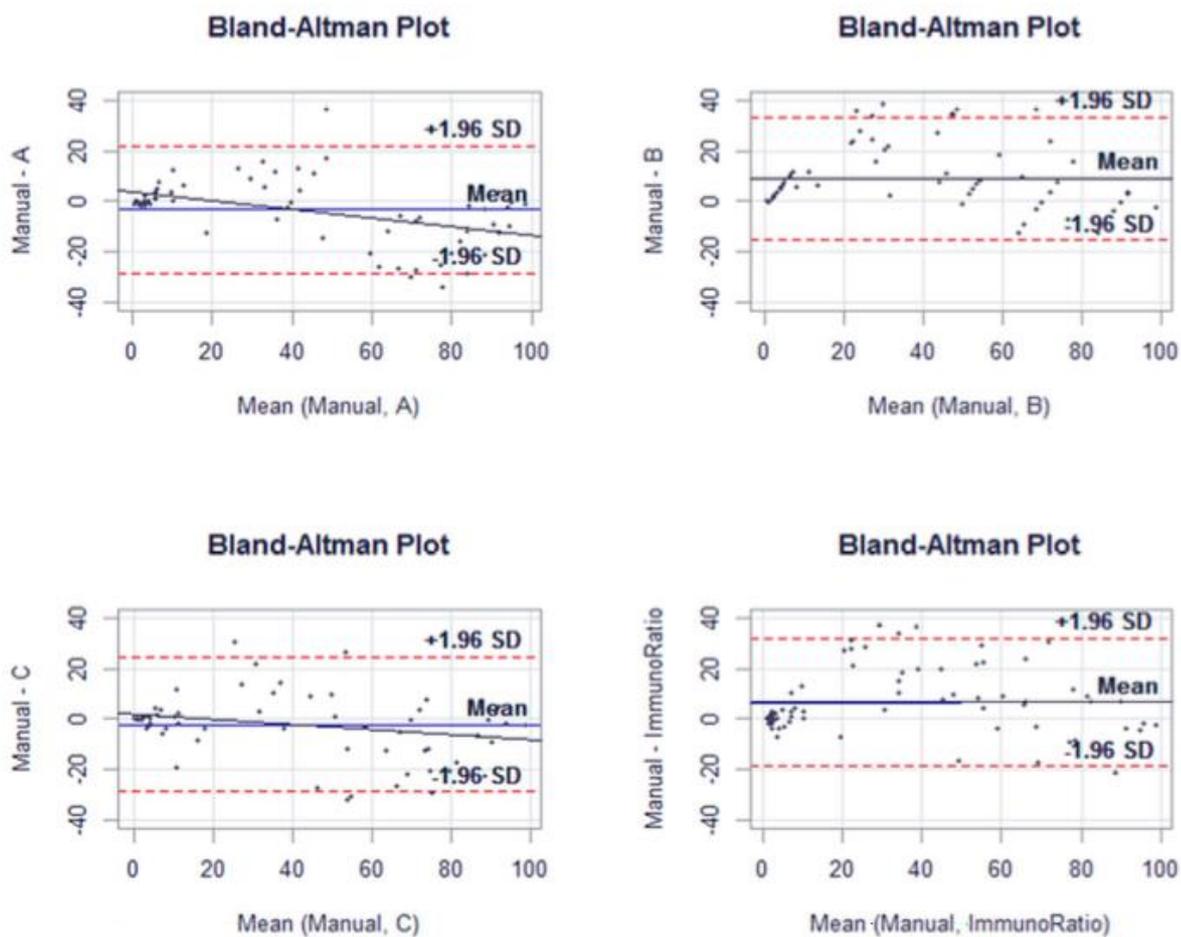
**Tabla 4.** Clasificación de Ki 67 de acuerdo a los diferentes métodos de conteo

	Total	Manual						Clasificación	
		< 3		3-20		>20		Inferior	Superior
		n	%	n	%	n	%		
Casos	70 (%)	13	18.6	16	22.9	41	58.6		
<b>Patólogo A</b>									
	13								
< 3	(18.6)	10	76.9	3	18.8	0	-	-	3 (23.1)
	16								
3-20	(22.9)	3	23.1	12	75.0	1	2.4	3 (18.8)	1 (6.3)
	41								
>20	(58.6)	0	-	1	6.3	40	97.6	1 (2.4)	-
<b>Patólogo B</b>									
	26								
< 3	(37.1)	13	100.0	13	81.3	-	-	-	13 (50.0)
	13								
3-20	(18.6)	0	-	3	18.7	10	24.4	-	10 (76.9)
	31								
>20	(44.3)	0	-	0	-	31	75.6	-	-
<b>Patólogo C</b>									
	10								
< 3	(14.3)	10	76.9	0	-	0	-	-	-
	22								
3-20	(31.4)	3	23.1	16	100.0	3	7.3	3 (13.6)	3 (13.6)
	38								
>20	(54.3)	0	-	0	-	38	92.7	-	-
<b>ImmunoRatio</b>									
	13								
< 3	(18.6)	8	61.5	5	31.3	0	-	-	5 (38.5)
	22								
3-20	(31.4)	5	38.5	10	62.5	7	17.1	5 (22.7)	7 (31.8)
	35								
>20	(50.0)	0	-	1	6.3	34	82.9	1 (2.9)	-

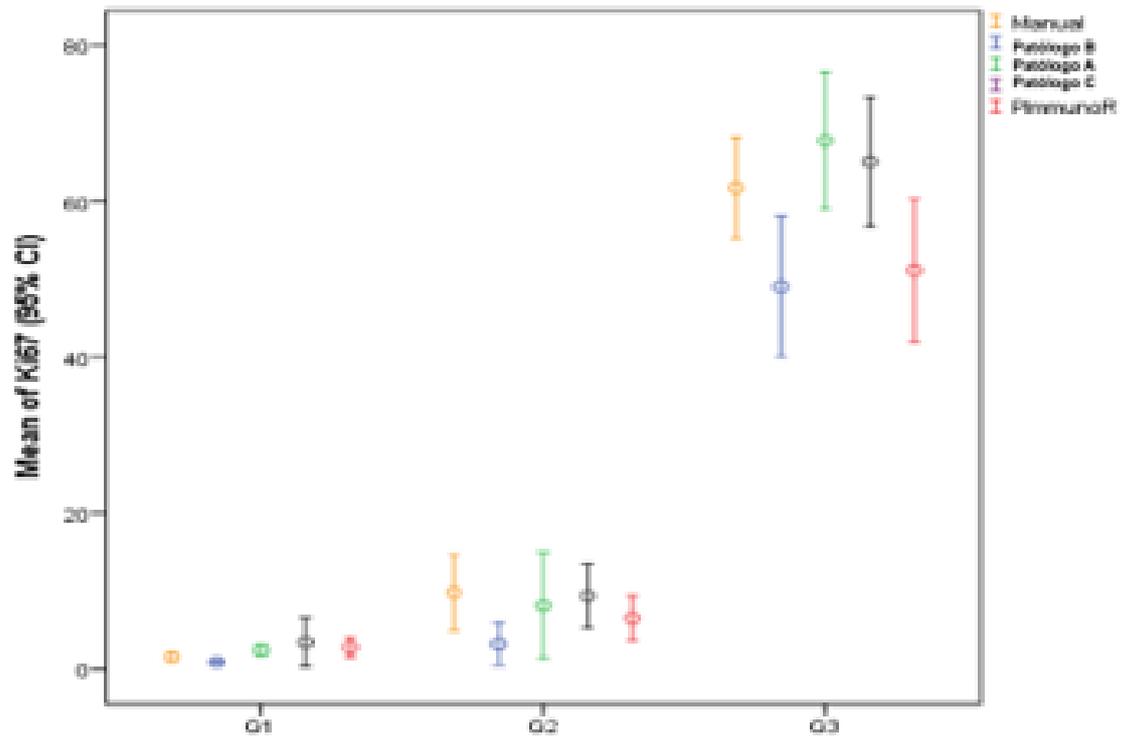
Concordancia en relación al conteo manual: Patólogo A 88.6%, Patólogo B 67.1%, Patólogo C 91.4% e ImmunoRatio 74.3%.



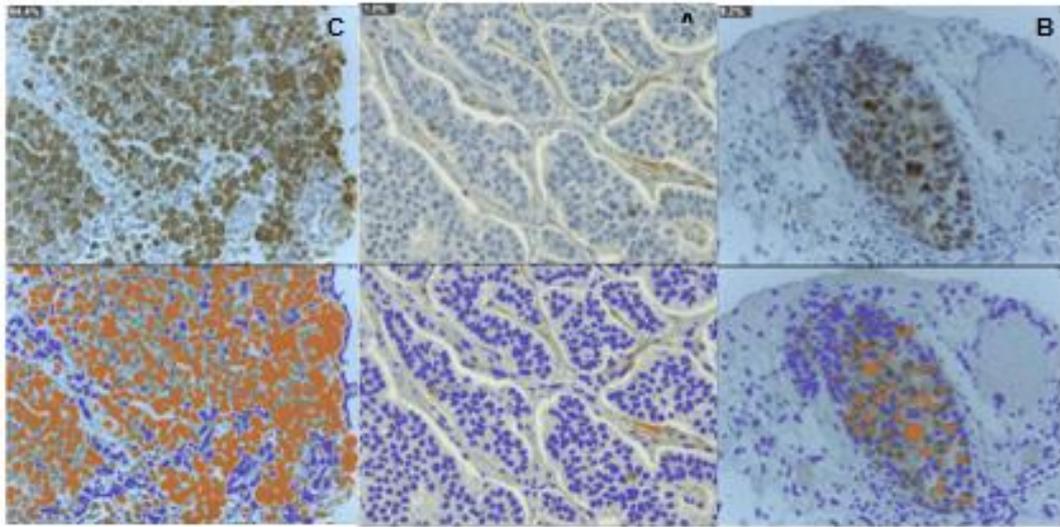
**Figura 1.** Sobrevida total de acuerdo al grado histológico (GH) de los tumores neuroendocrinos. (G1, G2, G3)



**Figura 2.** Bland – Altman *plot* de la variabilidad entre-observador, frente a cada patólogo y al Software ImmunoRatio, que demuestra mejor concordancia cuando el Ki 67 es menor a 20%



**Figura 3.** Medias de Índice de proliferación Ki 67 entre patólogos y el Software ImmunoRatio.



**Figura 4.** Evaluación de Ki 67 con el Software ImmunoRatio. **A.** Muestra con conteo menor a 3%. **B.** Muestra con conteo entre 3% - 20%. **C.** Muestra con conteo mayor a 20%.