

Gradu Amaiareko Lana/Trabajo Fin de Grado
Medikuntzako Gradua/Grado en Medicina

Comparación Morfométrica de Biopsias y Citobloques en Patología Tumoral de Pulmón: Estudio Piloto.

Egilea/Autora:

Elena Eguizábal Martínez

Zuzendaria/Director:

Dr. Juan Carlos López Duque

Servicio de Anatomía Patológica

Unidad Docente del Hospital Universitario de Basurto

© 2020, Elena Eguizábal Martínez

ÍNDICE:

0. Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Material y métodos:	4
2.1. Tipo de estudio.....	4
2.2. Búsqueda de biopsias y citobloques.....	4
2.3. Muestras incluidas en el estudio.....	6
2.4. Sistema de análisis.....	6
2.5. Calibración del microscopio.....	6
2.6. Variables morfométricas obtenidas.....	7
2.7. Medición del área total y el área tumoral.....	7
2.8. Análisis de resultados.....	11
3. Revisión bibliográfica:.....	13
3.1. Búsqueda de artículos.....	13
3.2. Revisión bibliográfica.....	13
4. Resultados:.....	18
4.1. Biopsias y citobloques del año 2018.....	18
4.2. Biopsias y citobloques incluidos en el estudio piloto.....	21
4.3. Resultados de las mediciones morfométricas.....	24
4.3.1. Análisis de características generales.....	24
4.3.2. Análisis de las variables morfométricas.....	27
5. Discusión.....	35
6. Conclusiones.....	42
7. Bibliografía.....	44
8. Anexos:	46
8.1. Anexo 1: aprobación del CEIC.....	46
8.2. Anexo 2: protocolo de calibración.....	47
8.3. Anexo 3: base de datos de casos de 2018.....	49
8.4. Anexo 4: medidas morfométricas obtenidas.....	57

0. RESUMEN:

La mayoría de las neoplasias pulmonares se detectan en estadios avanzados no quirúrgicos y para su diagnóstico, en la gran mayoría de los casos, únicamente se dispone de muestras de pequeño tamaño, ya sean biopsias o citologías. Las guías internacionales sobre el manejo del cáncer de pulmón han considerado, hasta fechas muy recientes, que la citología o el citobloque obtenido a partir de muestras de ella, era un material de inferior rentabilidad respecto a la biopsia. Nuestro propósito ha sido obtener datos cuantitativos sobre la cantidad de tejido tumoral existente en ambos tipos de muestra y su idoneidad para el manejo del cáncer de pulmón. Para ello hemos realizado un estudio piloto sobre biopsias y citobloques de neoplasias pulmonares procedentes del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Basurto. Se determinó la cantidad y proporción de material tumoral en estas muestras mediante morfometría con visualización directa de los portaobjetos en el microscopio. El estudio ha mostrado que los citobloques presentan un área tumoral comparable ($0,65 \text{ mm}^2$) o incluso mayor ($1,12 \text{ mm}^2$ vs $0,85 \text{ mm}^2$ p $0,032$) que las biopsias estudiadas. Se ha constatado igualmente que después de la realización de un amplio panel inmunohistoquímico y de técnicas moleculares, los citobloques son menos susceptibles al agotamiento de la celularidad tumoral ($1,06\%$) que las biopsias ($12,63\%$). En ambos tipos de muestras los carcinomas microcíticos tenían una mayor área tumoral que los no microcíticos. La morfometría es una herramienta útil con la que se podrían desarrollar estudios comparativos más amplios y con análisis de otras variables, que permitan mejorar aspectos prácticos en el diagnóstico de las neoplasias pulmonares.

1. INTRODUCCIÓN:

Un porcentaje muy elevado de las neoplasias pulmonares se diagnostican actualmente en estadios avanzados, no siendo posible obtener una pieza de resección quirúrgica para su diagnóstico anatomopatológico completo. En estos casos son fundamentales técnicas poco invasivas de obtención de muestras pequeñas como biopsias y/o material citológico (1). Además, en el último tiempo se han desarrollado terapias dirigidas para los pacientes en estos estadios que requieren para su uso la confirmación del subtipo tumoral y ciertos reordenamientos genéticos, como son EGFR, ALK y PDL1, mediante pruebas complementarias.

Pese a esta realidad clínica y sus implicaciones en el diagnóstico de un gran número de pacientes, la biopsia y la citología no fueron reconocidas y recomendadas como arma diagnóstica hasta el año 2011 cuando una clasificación propuesta por la International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS) (2), plantó las bases para el desarrollo de la última Clasificación de la OMS de los Tumores de Pulmón publicada en el año 2015 (3). En ella se incluye por primera vez una terminología estandarizada para el diagnóstico de las neoplasias de pulmón en este tipo de muestras. Además, por el pequeño tamaño de las muestras se ponen en valor las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ), especialmente para la diferenciación de carcinomas escamosos y adenocarcinomas dentro de los no microcíticos, que son el 80% del total de las neoplasias en esta localización.

Por tanto, es indispensable una gestión cuidadosa del material disponible en estas muestras pequeñas, evitando su agotamiento en todos los casos de neoplasia pulmonar. Esto es así porque el panel de pruebas complementarias, incluyendo técnicas IHQ y moleculares, empleado para llegar al diagnóstico en un caso de cáncer pulmonar es cada vez más amplio, y las muestras de las que se dispone pequeñas. Aun así, las ventajas obvias que aportan los abordajes mínimamente invasivos para los pacientes justifican la búsqueda de formas de procesamiento que permitan los diagnósticos completos en estas muestras. Algunos ejemplos de los procedimientos de obtención de ellas son la punción percutánea de masas periféricas guiada por TAC; o la endoscopia bronquial para masas centrales, a la cual en el caso

de la citología se le puede añadir la ultrasonografía, realizando lo que se conoce como Punción Aspiración por Aguja Fina guiada por Ultrasonografía Endobronquial (PAAF-EBUS) (4). Esta última técnica, ofrece, en las numerosas ocasiones en las que se punciona un ganglio mediastínico, el estadio tumoral de manera simultánea al diagnóstico (4,5).

Hasta una fecha reciente, muchas de las pruebas complementarias patológicas solo se hallaban validadas para su realización en biopsias y piezas quirúrgicas. No obstante, dado que en el 40% de los pacientes solo se cuenta con muestras citológicas para el diagnóstico (6), poco a poco se han ido validando su uso en ellas (4). Es en este punto donde toman importancia como herramienta diagnóstica los citobloques obtenidos a partir de citologías, que son los recomendados en la literatura para la realización de pruebas de IHQ y biología molecular, ya que aumentan la rentabilidad y precisión diagnóstica de este tipo de muestra (2,3,7,8).

La citología es muchas veces menos valorada por los profesionales que la biopsia, por diversas razones. Por citar algunas, se cree que la citología consigue menor cantidad de material tumoral que la biopsia; a lo que se suma que en ciertas ocasiones la utilidad de la citología se ve limitada por aprobarse más tarde el uso clínico de ciertos marcadores en ella (9). Pese a la consideración general, la citología tiene claras ventajas sobre la biopsia como son: la posibilidad de realizar múltiples pases con la aguja para obtener una muestra más representativa del tumor; la consecución de más células tumorales con menos estroma que en las biopsias (2); la obtención de un DNA de mayor calidad para las técnicas de biología molecular por los métodos de fijación usados, no basados en el formaldehído; y la oportunidad de realizar un control in situ de la muestra, lo que se conoce como ROSE, siglas en inglés de *Rapid On Site Evaluation* (7). Esta técnica, que no se realiza en los procedimientos de toma de biopsia, se basa en la participación de un profesional anatomopatólogo en el momento de la toma de la muestra, lo que ha demostrado aumentar la tasa diagnóstica y disminuir la tasa de falsos negativos producida por errores en la toma de la muestra (4,7,10).

Queda patente por la realidad clínica de las neoplasias pulmonares la necesidad de determinar que las muestras intrínsecamente pequeñas de biopsia y citología,

representada en el citobloque, son suficientes y adecuadas para el diagnóstico completo requerido. Existen estudios a este respecto comparando estas dos técnicas, pero son de carácter cualitativo (11). El objetivo del presente trabajo es realizar un análisis comparativo cuantitativo entre citobloques y biopsias empleados en el diagnóstico de cáncer de pulmón. La morfometría ha sido propuesta como una herramienta útil para este fin en la literatura (12), por lo que es la elegida para nuestro trabajo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS:

2.1. TIPO DE ESTUDIO:

Se plantea un estudio morfométrico (cuantitativo) para comparar el material tumoral disponible en muestras de biopsias, obtenidas por endoscopia bronquial o guiadas por TAC; y de citobloque, obtenidas en este caso de derrames (pericárdico y pleural), por PAAF de ganglios o masas accesibles por palpación o de manera ecoguiada, y ecobroncoscopia; todas ellas del Servicio de Anatomía Patológica (AP) del Hospital Universitario de Basurto (HUB). A su vez, se hace un análisis de carácter descriptivo de las características que tienen relación con las pruebas complementarias, el agotamiento de las muestras y la capacidad de las dos técnicas de llegar al diagnóstico específico.

La hipótesis de este trabajo es que las muestras de biopsia y citología de patología tumoral pulmonar son igualmente capaces de conseguir material suficiente para el diagnóstico patológico, que incluye en la actualidad la realización de técnicas de IHQ y biología molecular. Se decide realizar un estudio piloto que permita obtener unas primeras conclusiones sobre esta hipótesis y aportar datos sobre la metodología más apropiada para próximos estudios más extensos.

2.2. BÚSQUEDA DE BIOPSIAS Y CITOBLOQUES:

Se emplean en este estudio biopsias y citobloques de patología tumoral pulmonar obtenidos en el HUB en el año 2018.

El listado de biopsias se obtiene con el sistema de búsqueda de VITROPATH. Para ello se emplea el código del Servicio de AP del HUB de topografía pulmonar (T28),

al que se añaden los siguientes códigos de patrón morfológico: carcinoma escamoso NOS (M80703), adenocarcinoma NOS (M81403), carcinoma indiferenciado de célula pequeña tipo oat cell (M80423), carcinoma indiferenciado de célula pequeña NOS (M80413), carcinoma de células grandes NOS (M80123), y carcinoma papilar NOS (M82503). Una vez obtenido el listado se comprueba en la base de datos de informes la solicitud de pruebas de IHQ y técnicas moleculares incluidas en el protocolo de patología tumoral de pulmón del año 2018 del mismo servicio. Las determinaciones incluidas en él, así como su utilidad en el proceso diagnóstico, se encuentran recogidas en la **Tabla 1**. En este protocolo se incluían también los controles negativos de ALK y PDL1. Hay que tener en cuenta que estas tinciones y técnicas de elección pueden haber variado en la actualidad ya que es un protocolo muy dinámico al que cada vez se van añadiendo más determinaciones de utilidad desde el punto de vista diagnóstico y terapéutico.

Tabla 1. Clasificación de los distintos marcadores del protocolo diagnóstico de cáncer de pulmón del año 2018 del Servicio de AP del HUB. Adaptada del artículo de Metovic J et al. (1)

Tipo de prueba complementaria	Utilidad	Diagnóstico	Marcadores
Marcadores de IHQ	Diagnósticos	Adenocarcinoma	TTF1 Napsina A CK7
		Carcinoma escamoso	P40 P63 CK5/6
		Carcinoma microcítico	CD56
	Biomarcadores predictivos de respuesta a terapias dirigidas	Carcinoma no microcítico	ALK ROS1 PDL1
Técnicas de biología molecular	Biomarcadores predictivos de respuesta a terapias dirigidas	Carcinoma no microcítico	EGFR

El listado de citobloques, con un número de caso, se obtiene consultando el libro de registro realizado por el personal técnico del laboratorio. Se incluyen todos aquellos provenientes de la región torácica, a saber: EBUS de ganglios mediastínicos o masas, punción de líquido pleural o pericárdico y PAAF de ganglios de la región torácica, como el supraclavicular, y de otras masas de partes blandas accesibles por palpación

o de manera ecoguiada. Posteriormente, se comprueba en la base de datos de informes que las muestras sean positivas para tejido tumoral y la realización de pruebas complementarias, incluidas en el protocolo del 2018 (**Tabla 1**).

Por tanto, los criterios de inclusión en la base de datos en ambos tipos de muestra son la presencia de células malignas de origen pulmonar en ellas y la realización de pruebas complementarias. En el estudio piloto son criterios de exclusión la ausencia en el archivo de portaobjetos de alguno de los solicitados según la base de datos de informes, siendo imprescindible contar con la tinción de hematoxilina-eosina (H-E); y un nivel de tinción que impida la valoración microscópica y medición de las muestras.

2.3. MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO:

En el estudio piloto se incluyen 10 biopsias y 10 citobloques, consecutivos según el número de registro asignado a cada caso, de menor a mayor, de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión expuestos en el apartado anterior.

2.4. SISTEMA DE ANÁLISIS:

Se emplea un microscopio Nikon Eclipse-E800 acoplado a una cámara de la misma marca para el análisis de las muestras. El procesado de las imágenes se realiza manualmente con el software NIS-elementsD 4.30.02.

2.5. CALIBRACIÓN DEL MICROSCOPIO:

Debido a que se trata de un estudio cuantitativo, se plantea el hecho de que la calibración del objetivo con el que se miden las muestras puede suponer un sesgo. Buscando la mayor objetividad posible en las mediciones realizadas, se opta por calibrar el microscopio de manera manual para un mejor control sobre esta variable. Se crean, por ello, cinco nuevos objetivos y se realiza un calibrado manual de ellos con retícula de calibración según el protocolo incluido como **Anexo 2**. Este proceso se repite los siete primeros días de medición obteniendo de esas calibraciones una media en cada objetivo que se emplea a partir de ese momento (**Tabla 2**).

Tabla 2. Valores de calibración ($\mu\text{m}/\text{px}$) de los objetivos (x2, x4, x10, x20, x40). Referencia del software, calibraciones manuales del día 1 al día 7, y media calculada con las calibraciones manuales.

Objetivos	Referencia ($\mu\text{m}/\text{px}$)	Día 1 ($\mu\text{m}/\text{px}$)	Día 2 ($\mu\text{m}/\text{px}$)	Día 3 ($\mu\text{m}/\text{px}$)	Día 4 ($\mu\text{m}/\text{px}$)	Día 5 ($\mu\text{m}/\text{px}$)	Día 6 ($\mu\text{m}/\text{px}$)	Día 7 ($\mu\text{m}/\text{px}$)	Media ($\mu\text{m}/\text{px}$)
x2	1,7	1,654	1,671	1,668	1,654	1,654	1,688	1,672	1,665
x4	0,85	0,844	0,848	0,844	0,827	0,84	0,84	0,836	0,839
x10	0,34	0,338	0,338	0,337	0,338	0,337	0,338	0,337	0,337
x20	0,17	0,168	0,168	0,168	0,168	0,168	0,167	0,167	0,167
x40	0,085	0,084	0,085	0,085	0,084	0,085	0,085	0,086	0,084

2.6. VARIABLES MORFOMÉTRICAS OBTENIDAS:

En las mediciones se obtienen el área total del material remitido o área total, y el área total de tejido/celularidad tumoral o área tumoral, como medidas para la comparación de presencia y variabilidad de tejido o celularidad tumoral en las muestras. Las medidas obtenidas del portaobjetos con el corte de H-E se consideran el área total inicial o de referencia y el área tumoral inicial o de referencia. Las áreas totales y tumorales con las que se compara esta primera medida se obtienen de los portaobjetos con las tinciones IHQ solicitadas en cada caso.

2.7. MEDICIÓN DEL ÁREA TOTAL Y EL ÁREA TUMORAL:

Estas variables se obtienen de muestras de biopsias y citobloques lo que permite realizar comparaciones entre las dos técnicas. Además, el contar con un área tumoral inicial o de referencia, permite, al compararla con la del resto de los cortes observar la variabilidad del material tumoral en las muestras a lo largo del proceso de análisis que implica múltiples cortes. Lo ideal para determinar el remanente final y la variación en la cantidad de muestra disponible sería comparar las medidas obtenidas en el portaobjetos de H-E, que se sabe que es el primer corte que se realiza en todos los casos, con las realizadas sobre un nuevo corte del bloque de parafina custodiado en el Servicio de AP. Este bloque o taco contiene lo que queda tras todos los cortes realizados para las técnicas IHQ y de biología molecular. No obstante, este último corte no pudo ser realizado en este trabajo, por lo que se decide medir las tinciones disponibles, además de la H-E, para objetivar las variaciones en cantidad de material tumoral en cada caso.

Este diseño se encontró con el problema de que es imposible conocer el orden en el que se realizaron los cortes, tras el primero, para las técnicas IHQ, ya que estas se aplican de manera indiscriminada sobre los cortes adicionales que se realizan. Así mismo, se desconoce y es inconstante el reparto del área tumoral en el grosor de las muestras incluidas en los bloques de parafina, como se ejemplifica en el esquema de la **Figura 1**, por lo que tampoco se puede deducir el orden de los cortes a posteriori.

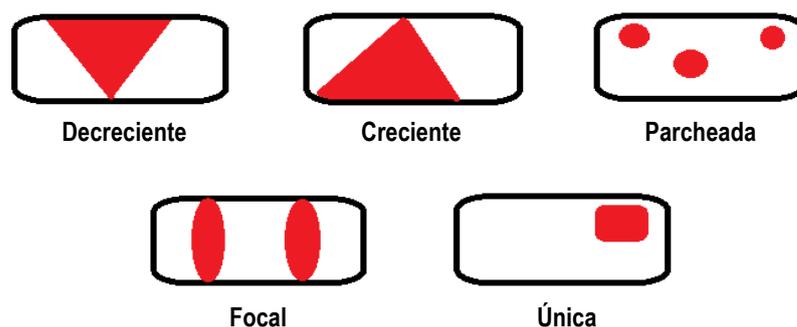


Figura 1. Representación esquemática de diferentes ejemplos de distribuciones del área tumoral en las muestras incluidas en los bloques de parafina. Área tumoral representada en rojo. Debido a la aleatoriedad, estas son solo una mínima parte de las posibilidades.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, este estudio piloto cuantifica el material tumoral disponible en cada muestra, y estudia la variabilidad del área tumoral a lo largo de los sucesivos, sin poder determinar un patrón exacto en ella por el desconocimiento del orden de realización de los cortes del microtomo sobre el bloque de parafina. Como se desconoce este orden se propone un orden arbitrario para medir las áreas de interés de todas las muestras (**Tabla 3**). Cuando no se ha solicitado una tinción determinada se salta a la siguiente disponible respetando el orden establecido para el estudio. Los controles negativos de ALK y PDL1 se miden antes que sus correspondientes tinciones.

Siguiendo este orden se realizan las medidas del área total del material remitido y del área tumoral incluida en él, tanto de las biopsias como de los citobloques seleccionados para el estudio piloto. Se miden con la herramienta *polygon* del

software NIS-elementsD 4.30.02, que permite dibujar el contorno de la imagen proyectada desde el microscopio.

Tabla 3. Relación ordinal de las tinciones IHQ que se empleó en el estudio.

Orden de medición	Tinción IHQ
1°	H-E (áreas de referencia)
2°	CK7
3°	TTF1
4°	CK5/6
5°	CD56
6°	P40
7°	P63
8°	Napsina A
9°	ALK
10°	PDL1
11°	ROS1
12°	Otras no incluidas que se pidieron a criterio del profesional al cargo del caso en orden alfabético

Para medir el área total se miden los contornos de todos los cortes incluidos en los portaobjetos, usando el objetivo x2 del microscopio. En las muestras de biopsia, cuando la longitud del cilindro no permite medirlo en su totalidad en un solo campo, se divide este pintando con un rotulador permanente sobre el portaobjetos. Se realiza la cantidad de líneas necesarias para medir cada fragmento del cilindro delimitado por ellas en un solo campo, observándose las líneas delimitantes del mismo en el momento de realizar su medida. El área de muestra bajo la línea a la izquierda del fragmento de interés se incluye en la medida de este, no así la de la derecha (**Figura 2**).

En los citobloques que no pueden ser analizados en un solo campo, se dibujan con el rotulador cuadrículas de 2x2, 2x3 o de 3x3, según sea necesario para poder medir cada fragmento en un solo campo con sus líneas delimitantes visibles. Se mide con cada fragmento el área de muestra que se encuentra bajo las líneas de la izquierda y de la parte inferior del campo (**Figura 3**).

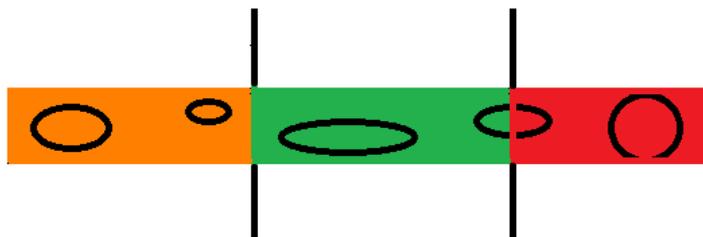


Figura 2. Representación esquemática de la medición de un cilindro de biopsia pulmonar dividido por líneas dibujadas con un rotulador. Cada color representa el área medida por campo de observación en el microscopio. Las líneas a la izquierda de un área son del mismo color que esta puesto que se incluye la parte del cilindro bajo ellas en la medición de esta.

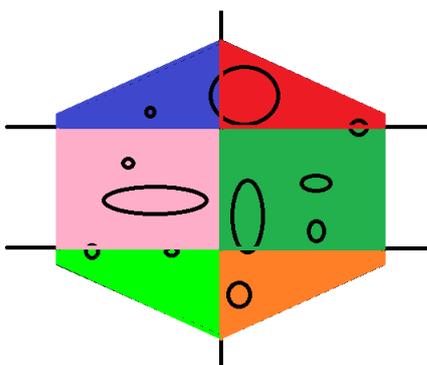


Figura 3. Representación esquemática de la medición de un citobloque dividido en una cuadrícula de 3x2. Cada color representa el área medida por campo de observación en el microscopio. Las líneas a la izquierda y en la parte inferior de un área son del mismo color que esta puesto que se incluye la parte del citobloque bajo ellas en la medición de esta.

El área tumoral se identifica con la ayuda del tutor del trabajo mediante una observación que permite conocer todas aquellas áreas de interés de inclusión en el estudio. El procedimiento de consulta se repite siempre que surgen dudas al respecto de la identificación del área que debe ser incluida.

El componente tumoral se mide en todas las tinciones solicitadas de cada muestra con el objetivo x10 que permite una mejor identificación de la celularidad o tejido tumoral. Para poder valorar las áreas de interés correctamente no se emplea en ningún caso marcaje con rotulador. En los portaobjetos de biopsias, el objetivo empleado permite observar completamente los cilindros en su eje menor, pero es insuficiente para cubrir la totalidad de su eje mayor, por lo que se sigue este último identificando y midiendo el tejido tumoral. Los citobloques no pueden ser analizados

de manera completa en ninguna de sus dimensiones con este objetivo, por lo que se hace un barrido de las muestras. Se identifica la parte de la muestra localizada más a la izquierda en el portaobjetos, y se mueve el portaobjetos en el eje “y” midiendo la celularidad tumoral en esa franja, tras lo que se desplaza el portaobjetos en el eje “x” para poder analizar el área contigua movilizándola en el eje “y” (**Figura 4**).

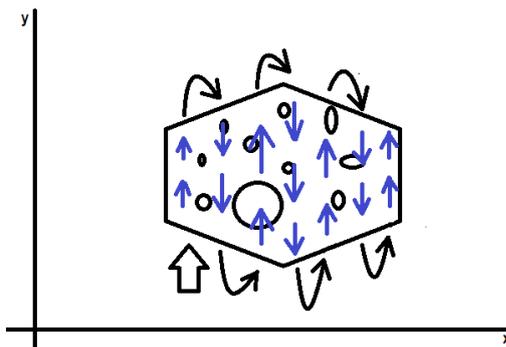


Figura 4. Representación esquemática del procedimiento realizado para la medición del área tumoral en los citobloques. Se empieza la medición donde marca la flecha gruesa blanca. Se desplaza el citobloque en el eje “x” (flechas negras) y se va midiendo el área tumoral moviendo el portaobjetos en el eje “y” en la dirección que marcan las flechas azules.

En ambos tipos de muestras, en la medición del área tumoral, se descartan aquellas zonas que presentan artefactos de la toma por compresión o estiramiento y que no permiten una correcta valoración de las células tumorales. Además, se descartan sistemáticamente en ambos grupos las áreas de necrosis, por tratarse de zonas no valorables desde el punto de vista del diagnóstico patológico y de las técnicas IHQ y moleculares. También se descartan las zonas que incluyen: tejido conectivo, restos de hematíes y restos de fibrina, utilizada en la técnica de obtención de los citobloques.

2.8. ANÁLISIS DE RESULTADOS:

Todos los resultados obtenidos tanto de la búsqueda de datos en la base de informes (**Anexo 3**) como de las mediciones (**Anexo 4**) se trasladan a una hoja de datos de Excel. Se emplea para el análisis estadístico este mismo programa, R Commander y Orange.

Los datos de cada caso extraídos de los informes que se incluyen en la hoja de datos son: código anonimizado de caso, género del paciente, localización de la lesión, técnica de obtención de muestra, diagnóstico patológico, número de tinciones IHQ, solicitud de técnicas moleculares, agotamiento de la muestra; y si se consiguió el diagnóstico completo.

Para los contrastes de hipótesis que permiten conocer la comparabilidad entre los dos tipos de muestras, y de los casos incluidos en el estudio piloto con todos los del 2018, se emplean para variables cualitativas el chi cuadrado con corrección de Yates o el test exacto de Fisher según corresponda; y en el caso de las variables cuantitativas la t de student o la prueba de Mann-Whitney según si la distribución es normal o no. Se acepta un error alfa del 0,05.

Con los datos de las variables de área total y tumoral de las muestras obtenidas en el estudio piloto, se calcula el porcentaje relativo de área total de tejido o celularidad tumoral sobre el área total del material remitido, tanto para los valores considerados de referencia como para los obtenidos del resto de las tinciones. También se calcula la diferencia entre el área tumoral máxima y la mínima en cada caso. Se registra el número de cortes que hay en cada portaobjetos, lo que permite ponderar los valores obtenidos en las mediciones en aquellos casos en los que hay más de uno. Las medias y las medianas de las variables en valor absoluto se calculan a partir de estos datos ponderados.

Para los contrastes de hipótesis se emplea el test no paramétrico para variables cuantitativas de Mann-Whitney. Se comparan las biopsias y los citobloques en las variables de área tumoral inicial y área tumoral, en valor absoluto y en forma de proporción, así como en la diferencia máximo-mínimo. Las categorías definidas para el análisis por subgrupos son carcinoma microcítico, todos los carcinomas no microcíticos, que incluye tanto los adenocarcinomas como los carcinomas escamosos, que también son dos subgrupos considerados por separado. Se hacen también comparaciones dentro de cada tipo de muestra entre estos subgrupos para todas las variables. El error alfa admitido es de 0,05 en todas las comparaciones.

3. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA:

3.1. BÚSQUEDA DE ARTÍCULOS:

La búsqueda bibliográfica se llevó a cabo en noviembre de 2019 en la plataforma Pubmed. Pese a que fue una búsqueda exhaustiva en la que se revisaron los títulos y abstracts de todos los artículos arrojados por la misma, no se encontró más que un artículo que hubiese hecho un estudio morfométrico como el de nuestro trabajo y solo había sido realizado sobre muestras de biopsia. No se encontró nada de estas características sobre citobloques, ni ningún estudio que comparase ambas técnicas.

Por un lado, se empleó el comando de búsqueda "*morphometry*" AND "*biopsy*" AND ("*lung*" OR "*thoracic*"), y se aprecia que en la mayoría de los estudios morfométricos sobre patología tumoral pulmonar se estudian mediante esta técnica las características nucleares de las células. En esta búsqueda se encontró el estudio mencionado en el párrafo anterior. Por otro lado, para buscar publicaciones de estudios morfométricos realizados sobre muestras de citología, se empleó el comando de búsqueda "*morphometry*" AND "*Cytodiagnosis*"[Mesh] AND ("*lung*" OR "*thoracic*") que no arrojó más que estudios morfométricos nucleares. También se intentó con el comando "*morphometry*" AND ("*cell block*" OR "*cytology*") AND ("*lung*" OR "*thoracic*"), que no aportó ninguna publicación de interés.

Se solicitó la ayuda del servicio de la biblioteca de la UPV/EHU para poder afinar la búsqueda y tampoco esto arrojó ningún resultado. El tutor del trabajo me proporcionó una serie de publicaciones relacionadas con el tema que han sido empleadas en el trabajo, así como algunas referencias que se encontraban citadas en dichos artículos. También se consultaron las recomendaciones en el diagnóstico de cáncer de pulmón recogidas en el Libro Blanco de Anatomía Patológica del año 2019 de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) (4).

3.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

Las neoplasias pulmonares se diagnostican en estadios avanzados en un número elevado de pacientes, que de entrada son casos no quirúrgicos (3). Por tanto, en la mayor parte de los casos solo se dispone de muestras pequeñas de biopsias o

citologías para el diagnóstico y estadiaje de la neoplasia (1,6). Este tipo de muestras por su tamaño contienen un material tumoral limitado, que debe ser aprovechado al máximo para conseguir un rendimiento diagnóstico adecuado a los estándares actuales que incluyen una creciente cantidad de pruebas complementarias, necesarias en todos aquellos casos no quirúrgicos para la adecuada aplicación de terapias dirigidas (4).

En primera instancia, conviene destacar el hecho de que la biopsia y la citología obtienen un material similar en su origen, pero estructuralmente distinto. La biopsia permite obtener tejido y la citología, células aisladas o, en el mejor de los casos, con restos de estroma; debido a que en el primer caso se utilizan agujas gruesas (BAG) y en el segundo, finas (PAAF) (13). Al margen de la aguja empleada, las técnicas de obtención de estas muestras en los casos de neoplasias pulmonares son múltiples en ambos casos. Las biopsias se sirven de distintas pruebas de imagen para guiar la punción: en el caso de masas periféricas se emplea la TAC (TAC-BAG) para puncionar de manera percutánea; y en el de masas centrales o endobronquiales se recurre a la broncoscopia. El material obtenido, cuando es suficiente en calidad y cantidad, permite el diagnóstico adecuado de la neoplasia pulmonar.

Las dos técnicas empleadas en el caso de las biopsias pueden utilizarse, así mismo, para la obtención de material citológico. A la broncoscopia en este caso se le pueden añadir técnicas como la ultrasonografía (EBUS) que facilita la localización de los ganglios mediastínicos (4). La posibilidad de puncionar estos ganglios aporta una utilidad añadida a esta técnica, permitiéndole determinar el estadio de la neoplasia además de diagnosticarla. Otra técnica que determinarlos es la PAAF guiada por ultrasonografía transesofágica (PAAF-USE), que aumenta el número de ganglios accesibles (4). De hecho, la última guía de práctica clínica de la European Society of Medical Oncology (ESMO) para el manejo de los pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico recomienda el uso de PAAF-EBUS o PAAF-EUS para la estadificación locorregional sobre el estadiaje quirúrgico con técnicas como la mediastinoscopia, la mediastinostomía o la toracoscopia (5). Otras técnicas de obtención de material citológico disponibles en el cáncer pulmonar son la punción de masas palpables o no palpables de manera ecoguiada, y el análisis de derrames pleurales o pericárdicos.

Tanto en el caso de las biopsias como en el de las citologías, una vez obtenido el material, este se procesa y se tiñe con H-E o con tinción de Papanicolau, en el caso de las muestras citológicas, para observar la morfología tumoral, la cual orienta el diagnóstico guiando la selección de técnicas IHQ. Estas tinciones complementarias se utilizan para tipificar de forma precisa el tumor, así como explorar la posibilidad de usar terapias dirigidas. En las biopsias los cilindros obtenidos se incluyen en bloques de parafina que se cortan para su tinción. En el caso del material citológico, en cambio, existen varias opciones, ya que se pueden realizar las tinciones sobre las extensiones celulares o elaborar citobloques incluyendo el material celular en bloques de parafina con un procesamiento posterior similar al de las biopsias. Esta segunda posibilidad aumenta extraordinariamente el valor de la citología, ya que, aunque en las extensiones es posible realizar técnicas de IHQ, el citobloque permite realizar un número considerablemente mayor de marcadores, así como el empleo de técnicas auxiliares de patología molecular, lo que amplía extraordinariamente el valor de las muestras citológicas (2,8). Aun así, hay que tener en cuenta que debido a la falta de estandarización del proceso de obtención de los citobloques su calidad depende en gran medida del personal técnico disponible en cada laboratorio (11).

En cuanto al número de técnicas IHQ a utilizar en cada caso, se recomienda siempre un uso muy juicioso y conservador de las mismas porque se realizan sobre muestras intrínsecamente limitadas por su tamaño. De hecho, la OMS (3) recomienda emplear únicamente un marcador para los adenocarcinomas (TTF1) y otro para los carcinomas escamosos (p40). Esto, en algunos casos, puede ser insuficiente; con todo, es recomendable realizar un panel inmunohistoquímico lo más restringido posible guiado por el profesional encargado del caso (2).

En cuanto a la validez de estas técnicas, ambas son buenas opciones para el diagnóstico del cáncer pulmonar con sensibilidades de entre el 60-85% y especificidades del 60-90% (1,14). Pese a que los datos acerca de estas características son inconsistentes a lo largo de la literatura siempre se ha tendido a pensar que la biopsia tiene una mayor especificidad y precisión diagnóstica que la citología. Esta es la razón por la que esta última técnica ha sido históricamente peor valorada, hecho que se ha podido ver favorecido, quizás, por una formación más limitada de los patólogos en la interpretación de las citologías (13). Pese a esta

valoración más negativa por parte de la comunidad científica, la citología ha demostrado ser una herramienta de extraordinario valor llegando a un diagnóstico completo hasta en el 100% de los casos con la ayuda de técnicas de IHQ (2). Hay que subrayar que, como ya se ha mencionado, en muchas ocasiones las muestras citológicas, de manera simultánea al diagnóstico, consiguen también el estadiaje de la neoplasia pulmonar. En el estadiaje, según un metaanálisis realizado por Gu P y sus colaboradores (15) la citología tiene una sensibilidad del 93% (IC 95% 91-95%) y una especificidad del 100% (IC 95% 99-100%). Cabe concluir, apoyando la validez de la citología para el diagnóstico de las neoplasias pulmonares, que ninguna de las dos técnicas ha demostrado de manera contundente ser superior a la otra en este aspecto (14), y que, siempre que sea posible, se recomienda el estudio combinado de las dos para aumentar la rentabilidad diagnóstica (2).

Como ya se ha expuesto, en la actualidad el diagnóstico y el estadiaje del cáncer de pulmón se fundamenta en muestras pequeñas, sean biopsias o citologías, sujetas a errores por este tamaño. Algunos de los problemas que surgen debido a este pequeño tamaño son los falsos positivos y negativos, que se estiman alrededor del 15%. Los falsos positivos pueden deberse a la presencia de atipia celular reactiva, enfermedades granulomatosas, y quimioterapia o radioterapia previas, entre otros. Los falsos negativos, en cambio, responden principalmente a errores de interpretación, que son patólogo-dependientes, y a errores en la toma de la muestra. Estos falsos negativos pueden deberse también a la heterogeneidad de las neoplasias pulmonares, de las que estas muestras solo alcanzan a mostrar una pequeña representación, por lo que pueden obtenerse diagnósticos incompletos por la presencia en una misma masa de distintas diferenciaciones tumorales (2). Además, las muestras, por su reducido tamaño, se pueden agotar, es decir, quedarnos sin material tumoral, antes de que se hayan podido realizar todas las determinaciones necesarias (2,3).

Para abordar este problema se han propuesto una serie de protocolos o estrategias. Entre las técnicas que tienen como objetivos aumentar la rentabilidad de la toma de muestras y disminuir todo lo posible la necesidad de nuevas exploraciones en el paciente, se encuentra el Rapid On Site Evaluation (ROSE) sobre material citológico, que es el único que permite este abordaje. El ROSE consiste en la presencia de un

patólogo en la sala de exploración durante el proceso de obtención de la muestra. Su misión es validar el material que se va obteniendo tanto desde el punto de vista diagnóstico como indicando su idoneidad por la cantidad del mismo, para pruebas complementarias. En ese sentido, el patólogo, puede indicar si son necesarios más pases, más punciones o el muestreo de otras localizaciones sospechosas en coordinación con la labor del broncoscopista. Esta técnica ha demostrado aumentar la tasa diagnóstica de la citología, disminuyendo el número de falsos negativos y el número de punciones necesarias, lo que reduce la duración y la necesidad de repetir los procesos diagnósticos, optimizando los recursos sanitarios y los de los laboratorios (4,7,10).

También se han propuesto estrategias para los laboratorios de anatomía patológica que pretenden ahorrar el material tumoral disponible para que este no se agote antes de llegar a un diagnóstico completo. Travis WD y sus colaboradores (2) proponen realizar 10-15 cortes en un primer momento tras la inclusión de las muestras en bloques de parafina, guardándolos para poder someterlos posteriormente a las tinciones que se consideren pertinentes en cada caso. Este abordaje tiene sentido puesto que cada vez que la muestra pasa por el microtomo se pierde material. El inconveniente es que en las muestras en las que finalmente no se empleen todos esos cortes puede suponer un desgaste sin sentido del bloque de parafina, reduciendo la cantidad de material disponible para la realización de técnicas moleculares. Otra estrategia, propuesta por Metovic J y sus colaboradores (1), es emplear cócteles de dos biomarcadores en una sola tinción. Cada uno de estos biomarcadores debe marcar localizaciones distintas dentro de la célula y se propone mezclar dos específicos para un mismo tipo tumoral, o para dos distintos. Este puede ser un abordaje adecuado, pero requiere de su validación mediante estudios controlados comparándolo con el método tradicional de “un portaobjetos, un marcador”.

Por la realidad diagnóstica, es de interés estudiar y determinar la capacidad de la biopsia y la citología para conseguir material suficiente para el diagnóstico. Coley SM y sus colaboradores (11) realizaron un estudio cualitativo que determinaba la presencia o no de material tumoral en biopsias y citobloques de manera comparativa. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de estas técnicas, por separado o en combinación, para conseguir suficiente material para

realizar un diagnóstico completo que incluya la realización de pruebas moleculares. No se han realizado, en cambio, estudios cuantitativos que comparen las dos técnicas en esta cualidad, pese a que se ha propuesto que es factible realizarlo empleando una técnica bastante establecida como es la morfometría (12). Esta herramienta permite obtener datos cuantitativos de las muestras, como el área tumoral de la que se dispone. De hecho, pese a la ausencia de estudios morfométricos comparativos, existen estudios que han determinado estas variables en ambas técnicas de manera separada.

El objetivo del presente trabajo es realizar una comparación similar a la llevada a cabo por Coley SM y sus colaboradores (11), pero cuantitativa, entre biopsias y citobloques procedentes de muestra de patología tumoral pulmonar, buscando determinar su grado de idoneidad relativa, tanto para el diagnóstico como para el estadiaje.

4. RESULTADOS:

4.1. BIOPSIAS Y CITOBLOQUES DEL AÑO 2018:

Se obtienen 111 resultados en la búsqueda de biopsias del año 2018 de neoplasias pulmonares en el sistema de VITROPATH. Se descartan 13 por ser citologías, 2 por no tener pruebas de IHQ ni técnicas moleculares registradas y 1 por tratarse de una metástasis de un tumor de origen Müllleriano. Se incluyen finalmente en la base de datos 95 biopsias realizadas en el año 2018 en el HUB. Las características de los pacientes y las biopsias se encuentran recogidas en la **Tabla 4**.

En la búsqueda de citobloques del mismo año en el libro de registro realizado por los técnicos de laboratorio del Servicio de AP del HUB se obtienen 344 realizados a partir de muestras citológicas obtenidas del área torácica. Se descartan 232 citobloques por no estar registrada en la base de informes la realización de pruebas complementarias en ellos. De los 113 restantes se descartan 13 por la no presencia de celularidad maligna y 6 por no tratarse de patología tumoral pulmonar, si no de 3 casos de cáncer mamario, 1 caso de linfoma no Hodgkin, 1 de endimoma, y 1 de mesotelioma. Finalmente, cumplen los criterios de inclusión 94 citobloques, cuyas características generales y las de los pacientes pueden consultarse en la **Tabla 5**.

No hay diferencias en la característica de sexo de los pacientes en ambas técnicas (p 0,836). En cuanto a las técnicas de obtención de la muestra, en los citobloques hay un mayor uso de pruebas endoscópicas que en las biopsias (77 vs 12; p <0,0001). En el término de diagnóstico, se observa que se diagnosticaron un mayor número de carcinomas microcíticos en citobloques (16 vs 3; p 0,003); y en biopsias, en cambio, más adenocarcinomas (50 vs 27; p 0,001). Esta última diferencia no se mantiene al sumar a los adenocarcinomas los casos de carcinoma no microcítico no especificado (NE) a favor de adenocarcinoma en ambos tipos de muestras (64 vs 50; p 0,065), diagnósticos patológicos con un mismo manejo clínico.

Cabe destacar que todos los casos de carcinoma no microcítico NE, tanto en biopsia como en citobloque, cuentan con un diagnóstico final a favor de carcinoma escamoso o adenocarcinoma, lo que indica que, a pesar de la morfología tumoral poco diferenciada de estas muestras, las técnicas de IHQ permitieron en todos los casos llegar a un diagnóstico. Esto es importante de cara al manejo de los pacientes por la disponibilidad de terapias dirigidas.

Respecto a las pruebas complementarias, no existe diferencia estadísticamente significativa en el número de tinciones IHQ realizadas en las biopsias (media 8,07 mediana 8) respecto a los citobloques (media 7,35 mediana 8; p 0,078) (**Figura 5**). Por otro lado, la proporción de solicitud de técnicas moleculares es significativamente mayor en las biopsias (88,42% vs 57,44%; p <0,0001).

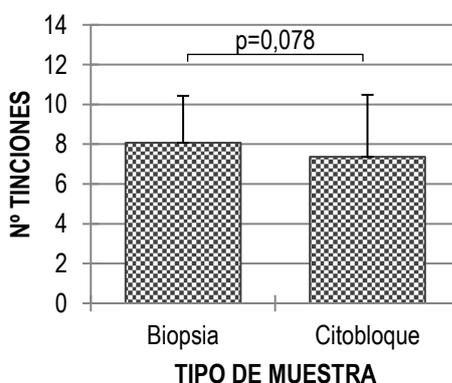


Figura 5. Media, desviación estándar y valor p obtenido al realizar la t de student comparando número de tinciones solicitadas en las biopsias y los citobloques.

Tabla 4. Características generales de los pacientes y las biopsias incluidas en la base de datos.

Sexo	
Masculino	69 (72,63%)
Femenino	26 (27,37%)
Localización	
Lóbulo superior izquierdo	32 (33,68%)
Lóbulo inferior izquierdo	9 (9,47%)
Lóbulo superior derecho	23 (24,21%)
Lóbulo medio	3 (3,16%)
Lóbulo inferior derecho	15 (15,79%)
Otros*	13 (13,68%)
Técnica de obtención	
Biopsia endoscópica	12 (12,63%)
TAC-BAG	71 (74,74%)
Desconocido	12 (12,63%)
Diagnóstico	
C. escamoso	22 (23,16%)
Adenocarcinoma	50 (52,63%)
Carcinoma microcítico	3 (3,16%)
Carcinoma no microcítico NE, a favor de c. escamoso	6 (6,32%)
Carcinoma no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	14 (14,74%)
Nº de tinciones de IHQ	
Media	8,07
Mediana	8
Muestras con técnicas moleculares	84 (88,42%)
Muestras agotadas	12 (12,63%)
Diagnóstico completo	90 (94,74%)

*Otras localizaciones biopsias: pulmón derecho (2 casos), bronquio intermediario (1 caso), lingula (1 caso), masa hiliar izquierda (1 caso), área yuxtacisural derecha (1 caso), desconocida (7 casos).

+Otras localizaciones citobloques: pulmón (2 casos), pulmón izquierdo (2 casos), lóbulo inferior izquierdo (1 caso), lóbulo inferior derecho (1 caso), masa hiliar (1 caso), ganglio mediastínico no especificado (1 caso), ganglios 12R (1 caso), ganglio supraclavicular (1 caso), pared torácica (1 caso), desconocida (3 casos).

Tabla 5. Características generales de los pacientes y los citobloques incluidos en la base de datos.

Sexo	
Masculino	66 (70,21%)
Femenino	28 (29,79%)
Localización	
Ganglios 4R	22 (23,4%)
Ganglios 4L	9 (9,57%)
Ganglios SC	21 (22,34%)
Ganglios 11R	9 (9,57%)
Ganglios 11L	3 (3,19%)
Ganglios 10R	2 (2,13%)
Líquido pleural	12 (12,77%)
Líquido pericárdico	2 (2,13%)
Otros ⁺	14 (14,9%)
Técnica de obtención	
EBUS ganglios	68 (72,34%)
EBUS masa	9 (9,57%)
Punción efusión	14 (14,9%)
PAAF masa palpable	2 (2,13%)
TAC-PAAF	1 (1,06%)
Diagnóstico	
C. escamoso	13 (13,83%)
Adenocarcinoma	27 (28,72%)
Carcinoma microcítico	16 (17,02%)
Carcinoma no microcítico NE, a favor de c. escamoso	9 (9,57%)
Carcinoma no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	23 (24,47%)
Carcinomatosis pleural NE	5 (5,32%)
Carcinoma papilar	1 (1,06%)
Nº de tinciones de IHQ	
Media	7,36
Mediana	8
Muestras con técnicas moleculares	54 (57,44%)
Muestras agotadas	1 (1,06%)
Diagnóstico completo	94 (100%)

Por último, en el año 2018, 12 biopsias (12,63%) se agotaron, y en 5 (5,26%) de ellas no se pudieron determinar todos los marcadores, por lo que no se consiguió un diagnóstico completo. Esta proporción es significativamente mayor que en los citobloques, de los cuales solo 1 (1,06%; p 0,004) se agotó, e incluso en él se llegó al diagnóstico completo, aunque la diferencia en esta característica no es significativa (p 0,072).

4.2. BIOPSIAS Y CITOBLOQUES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO PILOTO:

Para el estudio piloto se eligen 10 biopsias y 10 citobloques que cumplen los criterios de inclusión de manera consecutiva por número de registro asignado en el servicio. En el caso de las biopsias, entre las 10 primeras una no se halla en el archivo de portaobjetos del Servicio, por lo que se incluye la undécima. En el caso de los citobloques, entre los 10 primeros números de registro, una muestra se descarta por tinción insuficiente para poder ser valorada y otra por no encontrarse la H-E en el archivo, incluyéndose el undécimo y el duodécimo citobloques de la base de datos. Finalmente, se realizan todas las mediciones necesarias en 9 casos de cada tipo de muestra (**Tabla 6**) puesto que el estudio se detiene a causa de la emergencia sanitaria provocada por el COVID-19.

Se hacen comparaciones de los casos incluidos de cada técnica con la base de datos para comprobar si es representativa pese a su limitado tamaño muestral; y también entre los casos de cada técnica incluidos en el estudio piloto para ver su comparabilidad. En ambos casos respecto a la base de datos se mantiene un mayor número de casos en hombres que en mujeres, sin diferencias estadísticamente significativas (biopsias p 0,277; citobloques p 1).

En cuanto a la localización de las lesiones en ambos tipos de muestras, se mantienen las proporciones de casos en cada una sin diferencias significativas. En ambos casos hay localizaciones no representadas por el tamaño de la muestra seleccionada para el estudio piloto. Dentro de las biopsias son lóbulo medio y todos los incluidos en el apartado otros salvo el pulmón izquierdo; y en el caso de los citobloques, los ganglios de las regiones 11R, 11L y 10R, así como las muestras de líquido

pericárdico y todas aquellas incluidas en el apartado otros a excepción de las localizaciones de pulmón y lóbulo inferior izquierdo.

Tabla 6. Características generales de los pacientes, las biopsias y los citobloques incluidos en el estudio piloto.

Biopsias		Citobloques	
Sexo		Sexo	
Masculino	5 (55,55%)	Masculino	6 (66,67%)
Femenino	4 (44,45%)	Femenino	3 (33,33%)
Localización		Localización	
Lóbulo superior izquierdo	3 (33,33%)	Ganglios 4R	3 (33,33%)
Lóbulo inferior izquierdo	2 (22,22%)	Ganglios 4L	1 (11,11%)
Lóbulo superior derecho	1 (11,11%)	Ganglios SC	2 (22,22%)
Lóbulo inferior derecho	2 (22,22%)	Líquido pleural	1 (11,11%)
Otros	1 (11,11%)	Otros	2 (22,22%)
Técnica de obtención		Técnica de obtención	
Biopsia endoscópica	3 (33,33%)	EBUS ganglios	6 (66,67%)
TAC-BAG	6 (66,67%)	EBUS masa	2 (22,22%)
		Punción efusión	1 (11,11%)
Diagnóstico		Diagnóstico	
C. escamoso	1 (11,11%)	C. escamoso	1 (11,11%)
Adenocarcinoma	5 (55,55%)	Adenocarcinoma	3 (33,33%)
Carcinoma microcítico	3 (33,33%)	Carcinoma microcítico	2 (22,22%)
		Carcinoma no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	2 (22,22%)
		Carcinomatosis pleural NE	1 (11,11%)
Nº de tinciones de IHQ		Nº de tinciones de IHQ	
Media	5,67	Media	8
Mediana	6	Mediana	8
Técnicas moleculares	3 (33,33%)	Técnicas moleculares	6 (66,67%)
Muestras agotadas	0	Muestras agotadas	0
Diagnóstico completo	9	Diagnóstico completo	9

Respecto a las técnicas de obtención de la muestra, tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas con la base de datos en ninguno de los grupos, aunque hay que tener en cuenta que en el caso de los citobloques hay pruebas diagnósticas que no están representadas en el estudio piloto. Estas pruebas son la PAAF de masas palpables y la PAAF guiada por TAC, que corresponden a un 3,19% de las técnicas de obtención en este grupo. En el caso de las biopsias las dos técnicas conocidas en la base de datos están incluidas en el estudio piloto (biopsia endoscópica p 0,12; TAC-BAG p 0,693). Las técnicas de obtención de las muestras de los citobloques del estudio piloto son EBUS de ganglios (p 0,709), EBUS de masa (p 0,246) y punción de una efusión (p 1).

Las proporciones de histotipos no presentan diferencias estadísticamente significativas, salvo en el caso del carcinoma microcítico diagnosticado a partir de muestras de biopsia cuya proporción es significativamente mayor en el estudio piloto respecto a la base de datos (33,33% vs 3,13%; p 0,008). De hecho, los 3 únicos casos del 2018 se encuentran incluidos. Los otros dos diagnósticos registrados en las biopsias son los de carcinoma escamoso (p 0,68) y adenocarcinoma (p 1), que al igual que en la base de casos es el más representado. En los citobloques, a parte de estos tres diagnósticos (c. escamoso p 1; adenocarcinoma p 0,718; carcinoma microcítico p 0,655), se registran dos carcinomas no microcíticos NE a favor de adenocarcinoma (p 1) y uno de carcinomatosis pleural NE (p 0,431). Hay diagnósticos no representados en el estudio piloto en ambos casos: en las biopsias, no se registran los diagnósticos de carcinoma no microcítico NE a favor de adenocarcinoma ni a favor de carcinoma escamoso, los cuales son un 21,06% de los casos registrados en el 2018 en el HUB; y en los citobloques, los de carcinoma no microcítico NE a favor de carcinoma escamoso y de carcinoma papilar, que en conjunto suponen un 10,63% de los diagnósticos de ese mismo año.

Las biopsias incluidas presentan un menor número de tinciones de IHQ que las de la base de datos (p 0,006). En el caso de los citobloques la diferencia no es estadísticamente significativa (p 0,698). Las biopsias incluidas en el estudio piloto presentan una menor proporción de técnicas moleculares solicitadas que las de la base de datos (33,33% vs 88,42%; p valor 0,001). En los citobloques no hay diferencias estadísticamente significativas (66,67% vs 57,44%; p 0,465).

En ninguna de las muestras incluidas en este estudio se registró el agotamiento del material tumoral tras o durante el procesamiento, es decir, todas ellas fueron válidas para conseguir un diagnóstico completo.

El análisis comparativo entre las biopsias y los citobloques incluidos en el estudio piloto revela que no existen diferencias estadísticamente significativas en las características de sexo (p 1), diagnóstico (carcinoma escamoso p 1; adenocarcinoma p 1, carcinoma microcítico p 1), proporción de muestras con técnicas moleculares (p 0,347), ni número de tinciones IHQ (p 0,097; **Figura 6**). En el término de diagnóstico de adenocarcinoma en el caso de los citobloques se suman los 2 que

tienen el resultado de carcinoma no microcítico NE a favor de adenocarcinoma, ya que en el análisis comparativo de las medidas obtenidas en el estudio piloto se emplean los datos de esta manera por el tamaño muestral del que se dispone.



Figura 6. Mediana del número de técnicas de IHQ solicitadas en las biopsias y los citobloques del estudio piloto.

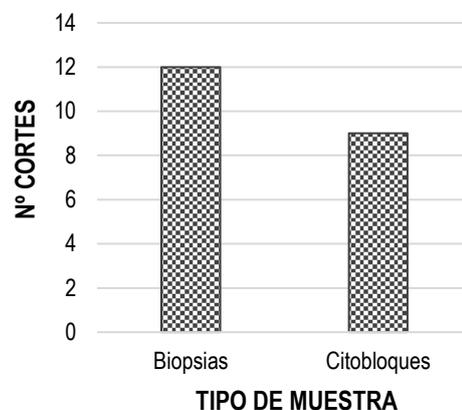


Figura 7. Mediana del número de técnicas de IHQ solicitadas en las biopsias y los citobloques del estudio piloto.

4.3. RESULTADOS DE LAS MEDICIONES MORFOMÉTRICAS:

Los datos de las mediciones morfométricas se presentan en la **Tabla 7**. El subgrupo de los carcinomas no microcíticos está conformado por los carcinomas escamosos, los adenocarcinomas y los carcinomas no microcíticos NE a favor de adenocarcinoma. El subgrupo de todos los adenocarcinomas incluye los que tienen este diagnóstico y los carcinomas no microcíticos NE a favor de adenocarcinoma, decisión tomada por el tamaño muestral del estudio piloto. En los análisis comparativos en los que se incluye el término adenocarcinoma se están empleando los datos de este subgrupo combinado y será así a lo largo de todo este apartado.

4.3.1. Análisis de características generales:

Para ver si las biopsias y los citobloques del estudio son comparables en la cuantía del material tumoral se considera importante conocer el número de cortes en cada tipo de muestra. Se observa un número de cortes significativamente mayor en las biopsias ($p = 0,034$) (**Figura 7**), sin que haya, como se menciona en el apartado anterior, diferencia estadísticamente significativa en el número de tinciones ($p = 0,097$)

Tabla 7. Resultados de las medidas morfométricas de las biopsias y los citobloques en conjunto y separados por diagnósticos.

	Todos los casos		Carcinoma microcítico		Todos los carcinomas no microcíticos		C. escamoso		Todos los ADC		Adenocarcinoma		Carcinoma no microcítico NE, a favor de ADC		Carcinomatosis pleural	
	Bx	CB	Bx	CB	Bx	CB	Bx	CB	Bx	CB	Bx	CB	Bx	CB	Bx	CB
Nº de casos	9	9	3	2	6	6	1	1	5	5	5	3	0	2	0	1
Nº de cortes																
Media	13,28	10,56	12,67	9	10,75	11,5	12	9	10,4	12	10,4	12,67	-	11	-	8
Mediana	12	9	12	9	12	10,5	12	9	12	12	12	12	-	11	-	8
Nº de tinciones IHC																
Media	5,78	7,89	5,33	7	6	8,83	4	7	6,4	9,2	6,4	9	-	9,5	-	4
Mediana	6	8	5	7	6,5	9	4	7	7	10	7	10	-	9,5	-	4
Área total inicial (mm ²)																
Media	6,16	25,13	7,94	24,06	5,28	27,28	9,05	13,53	4,53	30,03	4,53	28,9	-	31,73	-	14,35
Mediana	5,63	14,36	8,34	24,06	4,9	16,11	9,05	13,53	4,16	18,69	4,16	10,31	-	31,73	-	14,35
Área tumoral inicial (mm ²)																
Media	1,29	2,85	2,14	2,03	0,87	3,29	2,37	0,54	0,57	3,84	0,57	5,29	-	1,67	-	1,84
Mediana	0,65	0,65	1,76	2,03	0,58	0,59	2,37	0,54	0,58	0,65	0,58	0,43	-	1,67	-	1,84
Área tumoral inicial (%)																
Media	19,37	7,57	26,83	6,88	15,64	6,93	26,22	3,98	13,52	7,52	13,52	9,36	-	4,74	-	12,87
Mediana	14,02	4,24	33,07	6,88	13,69	4,09	26,22	3,98	13,36	4,2	13,36	4,2	-	4,74	-	12,87
Área total (mm ²)																
Media	5,58	27,25	7,03	40,52	4,93	25,01	8,09	14,16	4,57	26,31	4,57	24,23	-	30,03	-	15,11
Mediana	4,7	16,98	7,59	52,39	4,48	16,99	7,99	14,08	4,44	19,35	4,44	11,16	-	26,11	-	15,39
Área tumoral (mm ²)																
Media	1,28	3,91	2,3	5,55	0,84	3,64	2,19	1,01	0,68	3,16	0,68	5,45	-	1,77	-	2,43
Mediana	0,85	1,12	1,9	6,83	0,73	1,04	2,24	1,08	0,65	0,99	0,65	0,52	-	0,95	-	2,28
Área tumoral (%)																
Media	21,82	10,5	34,93	11,65	15,94	9,91	27,14	7,74	14,66	8,75	14,66	13,35	-	5,42	-	16,08
Mediana	16,53	7,18	46,14	12,91	16,05	5,3	27,04	7,45	14,96	5,01	14,96	5,07	-	5,01	-	16,14
Δ máx-mín total (mm ²)																
Media	2,26	10,57	3,62	13,54	1,59	11,07	1,07	2,36	1,69	12,81	1,69	16,46	-	7,34	-	1,61
Mediana	1,21	4,24	2,11	13,54	1,14	5,27	1,07	2,36	1,21	6,3	1,21	6,3	-	7,34	-	1,6
Δ máx-mín tumoral (mm ²)																
Media	0,72	2,75	1,17	3,8	0,5	2,7	0,7	0,61	0,46	3,12	0,46	4,43	-	1,17	-	0,91
Mediana	0,52	0,62	1,35	3,8	0,49	0,55	0,7	0,61	0,46	0,48	0,46	0,34	-	1,17	-	0,91

(Figura 6), aunque en esa característica se observa una mayor mediana en los citobloques. Por tanto, durante su procesamiento las biopsias sufren un mayor número de cortes para emplear las mismas o menos tinciones, lo cual teóricamente puede afectar a su capacidad para conseguir un diagnóstico completo.

Como se ve en el gráfico de la Figura 8 las biopsias presentan en el portaobjetos de H-E un número de cortes mayor que en el resto de las tinciones, y mayor también que en cualquier categoría de los citobloques. Los citobloques de manera general se ven sometidos a un menor número de cortes porque se considera que el material disponible en ellos es más limitado que en las biopsias. Por esto, los laboratorios cuentan con un protocolo de procesamiento más cuidadoso para los citobloques, que busca ahorrar el máximo material posible incluyendo como máximo 2 cortes en cada portaobjetos.

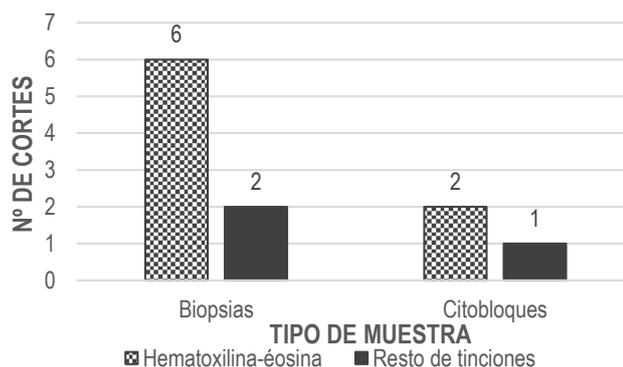


Figura 8. Mediana del número de cortes incluidos en los portaobjetos de H-E y en el resto de las tinciones en los dos grupos.

Sería de esperar que los carcinomas no microcíticos sufriesen un mayor número de cortes que los microcíticos puesto que existen marcadores IHQ cuya realización solo tiene sentido en el primer caso, como son ALK, PDL1 y ROS1. En las muestras incluidas en el estudio piloto no se observan diferencias significativas en el número de cortes y de tinciones entre estos dos histotipos, ni en las biopsias (cortes p 0,929; tinciones p 0,786) ni en los citobloques (cortes p 0,714; tinciones p 0,357). Como el número de casos en esta comparación es limitado, se decide emplear los datos de

todos los casos de 2018. En ambas técnicas se observa que se solicitan un número significativamente mayor de tinciones en los casos de carcinoma no microcítico respecto a los de carcinoma microcítico (**Figuras 9 y 10**). Esta diferencia señala que en los casos de carcinoma no microcítico teóricamente es necesaria una mayor cantidad de material tumoral para llegar al diagnóstico porque se somete a sus muestras a un mayor número de pruebas complementarias.

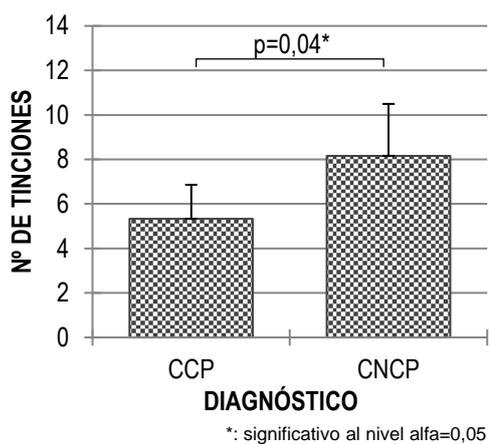


Figura 9. Media, desviación típica y valor p (t de student) número de tinciones carcinoma microcítico (CCP) vs carcinoma no microcítico (CNCP) en las biopsias.

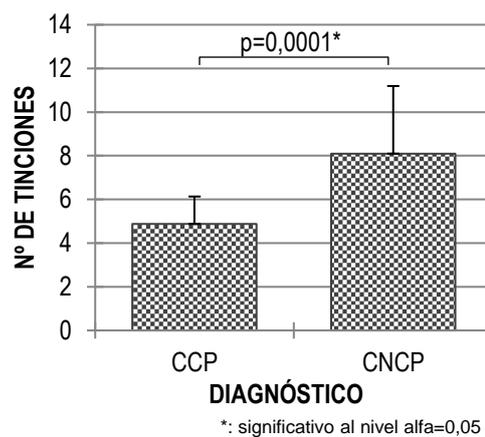


Figura 10. Media, desviación típica y valor p (t de student) número de tinciones carcinoma microcítico (CCP) vs carcinoma no microcítico (CNCP) en los citobloques

4.3.2. Análisis de las variables morfométricas:

Las variables obtenidas en el estudio morfométrico que se emplean para los análisis estadísticos expresan el material tumoral presente en cada muestra de distintas maneras. En primer lugar, el área del portaobjetos teñido con H-E de cada muestra, se considera el área tumoral inicial, y se expresa en valor absoluto y en forma de proporción o porcentaje respecto del área total del mismo portaobjetos. En segundo lugar, de las mediciones del resto de las tinciones distinta a la mencionada, se obtiene el área tumoral, también en valor absoluto y en forma de proporción o porcentaje respecto del área total. En último lugar, se cuenta con la diferencia entre el área tumoral máxima y mínima en cada muestra, en valor absoluto. A esta última

variable, en este apartado y los siguientes, se la denomina diferencia máximo-mínimo del área tumoral.

Primero se comparan las biopsias con los citobloques en las características de área tumoral inicial y área tumoral, expresadas en valor absoluto y en proporción ambas, y la diferencia máximo-mínimo del área tumoral. Se comparan todos los casos y luego se hacen comparaciones por subgrupos (carcinoma microcítico, todos los carcinomas no microcíticos, carcinoma escamoso y adenocarcinoma). El subgrupo de carcinoma escamoso por su reducido número de casos (n=2) no puede ser analizado para las características de área tumoral inicial ni para la diferencia máximo-mínimo del área tumoral.

En la característica área tumoral inicial en valores absolutos (**Figura 11**), hay que señalar que no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los análisis (todos los casos p 0,863; carcinoma microcítico p 0,8; carcinoma no microcítico p 1; adenocarcinoma p 0,841). Sin embargo, al analizar esta característica en forma de proporción (**Figura 12**) se observa una cantidad significativamente mayor de área tumoral en las biopsias respecto a los citobloques, en el análisis que incluye todos los casos (media 19,37% mediana 14,02% vs media 7,57 mediana 4,24%; p 0,008) y en el del subgrupo de carcinoma no microcítico (media 15,64% mediana 13,69% vs media 6,93% mediana 4,09% p 0,041). En el resto de los subgrupos las diferencias no son estadísticamente significativas (carcinoma microcítico p 0,4; adenocarcinoma p 0,151), pero las biopsias presentan valores mayores.

Pese a la ausencia de diferencias en el área inicial en valor absoluto, al analizar el área tumoral, en todos los casos en conjunto se observa que los citobloques tienen un área tumoral en valor absoluto significativamente mayor (media 3,91 mm² mediana 1,12 mm²; p 0,032) que las biopsias (media 1,28 mm² mediana 0,85 mm²), dato de interés por contradecir la concepción actual sobre la disponibilidad de material tumoral en las dos técnicas. En cambio, el caso de carcinoma escamoso en biopsia tiene un área tumoral mayor (media 2,19 mm² mediana 2,24 mm²) que su homólogo en citobloque (media 1,01 mm² mediana 1,08 mm² p 0,024), diferencia también presente en el área inicial (media y mediana 2,37 mm² vs 0,54 mm²). Sobre esta

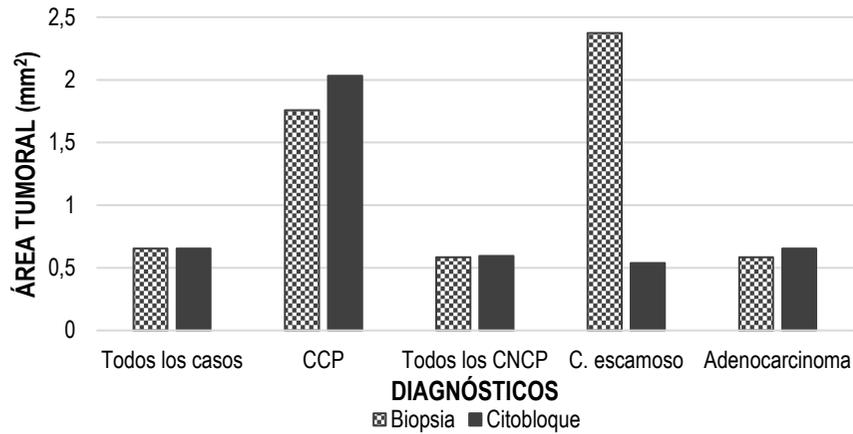


Figura 11. Medianas del área tumoral inicial en valor absoluto, de todos los casos en conjunto y separadas por histotipos, de biopsias y citobloques.

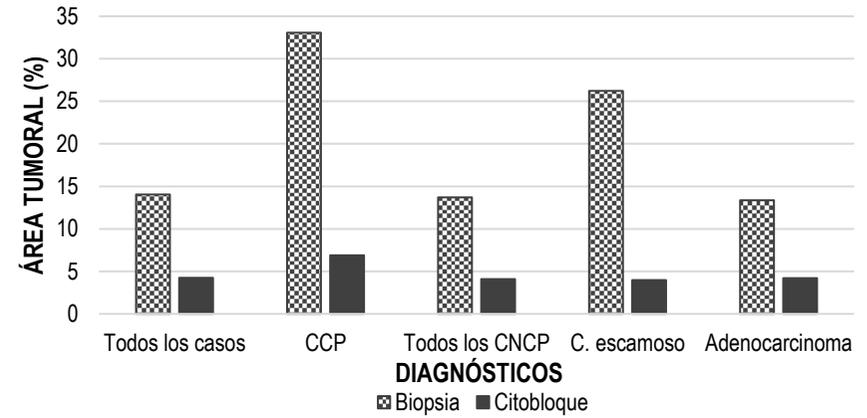


Figura 12. Medianas del área tumoral inicial en forma de proporción, de todos los casos en conjunto y separadas por histotipos, de biopsias y citobloques.

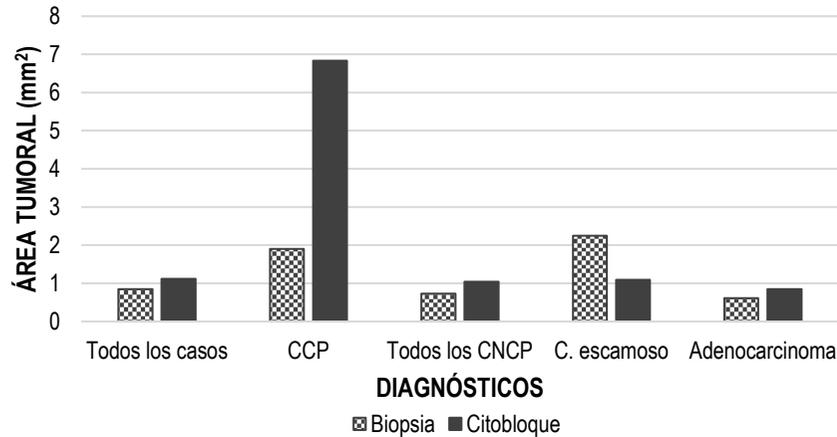


Figura 13. Medianas del área tumoral en valor absoluto, de todos los casos en conjunto y separadas por histotipos, de biopsias y citobloques.

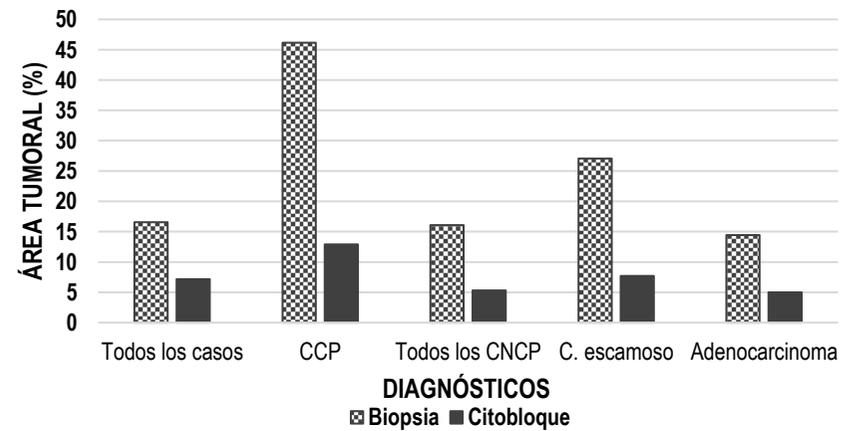


Figura 14. Medianas del área tumoral en forma de proporción, de todos los casos en conjunto y separadas por histotipos, de biopsias y citobloques.

variación respecto de la tendencia general, hay que recordar el limitado número de casos en este subgrupo; y que en el caso de los citobloques la muestra se obtiene en muchas ocasiones de los ganglios mediastínicos, donde este tipo de carcinoma puede ser necrótico, característica menos habitual en la localización primaria de donde se consiguen las biopsias. En el resto de los subgrupos no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre las biopsias y los citobloques (carcinoma microcítico p 0,063; carcinoma no microcítico 0,062; adenocarcinoma 0,086), pese a que en todos estos casos la mediana del área tumoral en valor absoluto era mayor en el caso de los citobloques, como puede observarse en el gráfico de la **Figura 13**.

Las biopsias también en esta variable muestran un área significativamente mayor al analizarla en forma de proporción (media 21,82% mediana 16,53% vs media 10,5% mediana 7,18%; p <0,0001). De hecho, en todos los subgrupos se comprueba que esta diferencia es significativa a favor de las biopsias (carcinoma microcítico p 0,03; todos los no microcíticos p <0,0001; c. escamoso p 0,028; adenocarcinoma p <0,01) (**Figura 14**).

En cuanto a la diferencia máximo-mínimo de área tumoral no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones realizadas (todos los casos p 0,667; carcinoma microcítico p 1; todos los no microcíticos p 0,699; adenocarcinoma p 0,841) (**Figura 15**).

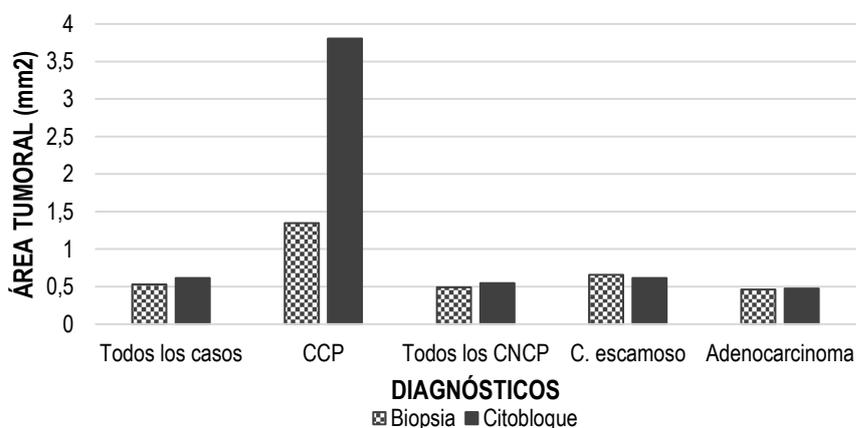


Figura 15. Medianas de la diferencia máximo-mínimo del área tumoral, de todos los casos en conjunto y separadas por histotipos, de biopsias y citobloques.

En segundo lugar, se realizan comparaciones de las mismas variables entre los histotipos de cada tipo de muestra. Se comparan los casos de carcinoma microcítico con todos los carcinomas no microcíticos, así como con sus subconjuntos de carcinoma escamoso y adenocarcinoma por separado, que también se comparan entre sí.

En el grupo de las biopsias no se observa ninguna diferencia significativa en la variable de área tumoral inicial, ni en valor absoluto ni en proporción (**Figuras 16 y 17**). Al comparar los datos de área tumoral (**Figuras 18 y 19**) se observa que esta es estadísticamente mayor tanto en valor absoluto como en porcentaje en los carcinomas microcíticos (media 2,3 mm² mediana 1,9 mm² p 0,001; media 34,93% mediana 46,14% p 0,039) respecto a todos los carcinomas no microcíticos (media 0,84 mm² mediana 0,73 mm²; media 15,94% mediana 16,05%). Los carcinomas microcíticos también demuestran tener un área tumoral en sus dos formas de expresión significativamente mayor que los adenocarcinomas (valor absoluto p 0,0002; proporción p 0,025), pero no se encuentran diferencias con el carcinoma escamoso (valor absoluto p 0,611; proporción p 0,893). Al comparar el caso de carcinoma escamoso con los adenocarcinomas, se objetiva una diferencia estadísticamente significativa a favor del primero tanto en valor absoluto (media 2,19 mm² mediana 2,24 mm² vs media 0,68 mm² mediana 0,65 mm² p 0,0005) como al calcular la proporción de área tumoral sobre el área total de la muestra (media 27,14% mediana 27,04% vs media 14,66% mediana 14,96% p 0,016).

En la diferencia máximo-mínimo del área tumoral (**Figura 20**) los casos de carcinoma microcítico (media 1,17 mm² mediana 1,35 mm²; p 0,048) demuestran tenerla significativamente superior a todos los carcinomas no microcíticos (media 0,5 mm² mediana 0,49 mm²) y los adenocarcinomas (media y mediana 0,46 mm²; p 0,036), pero no respecto al caso de carcinoma escamoso (media y mediana 0,7 mm²; p 1). No se demuestra diferencia en esta variable en la comparación de los adenocarcinomas y el carcinoma escamoso (p 0,333).

Al realizar estos mismos análisis comparativos en los citobloques no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ningún subgrupo para el área inicial en ninguna de sus formas de expresión (**Figuras 16-17**), ni para la diferencia

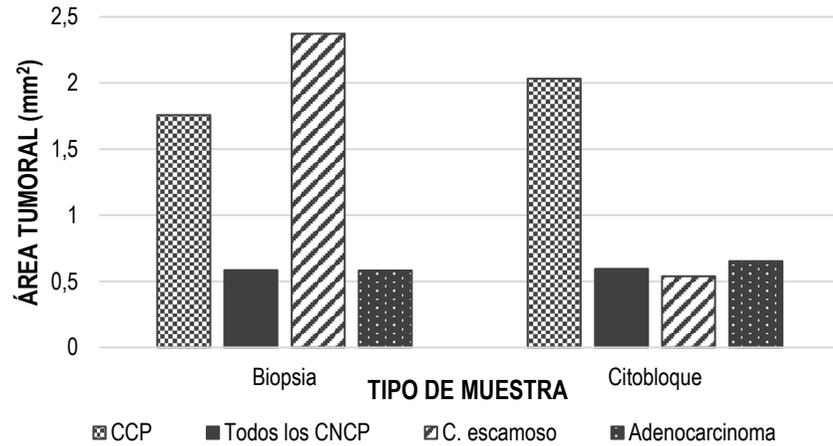


Figura 16. Medianas del área tumoral inicial en valor absoluto de los distintos diagnósticos en las biopsias y los citobloques.

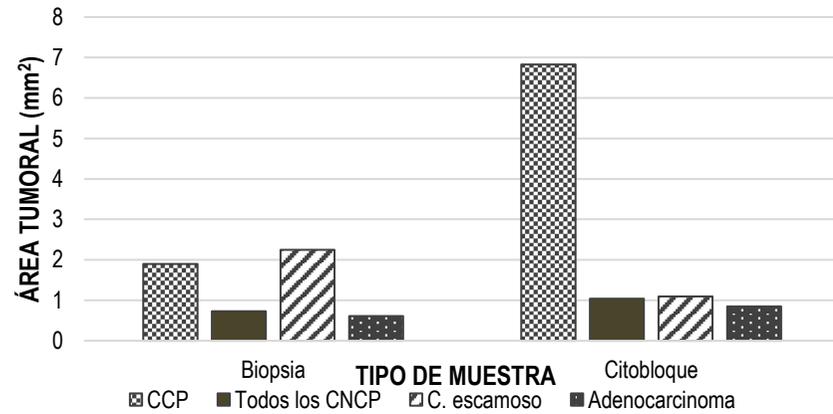


Figura 18. Medianas del área tumoral en valor absoluto de los distintos diagnósticos en las biopsias y los citobloques.

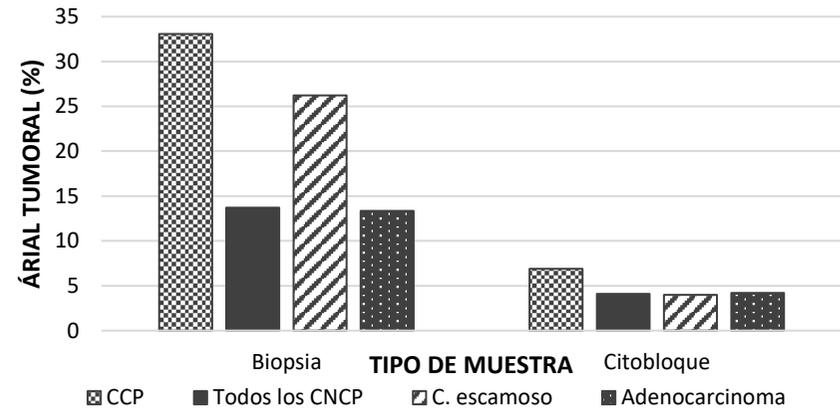


Figura 17. Medianas del área tumoral inicial en forma de proporción de los distintos diagnósticos en las biopsias y los citobloques.

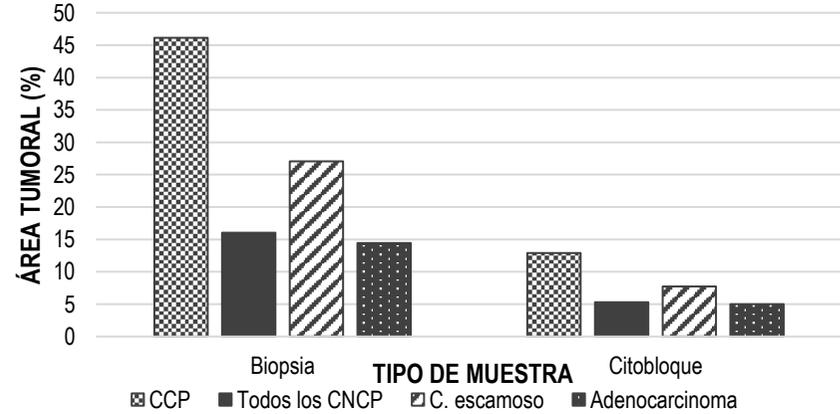


Figura 19. Medianas del área tumoral en forma de proporción de los distintos diagnósticos en las biopsias y los citobloques.

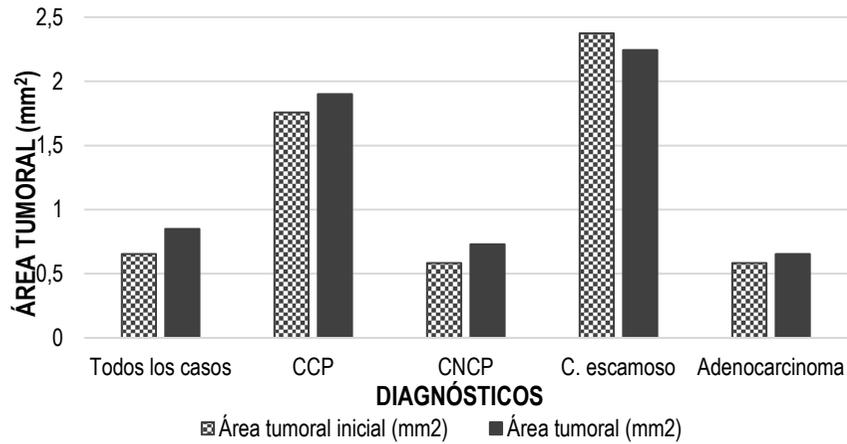


Figura 21. Mediana de las áreas tumorales iniciales y las áreas tumorales expresadas en valor absoluto en el grupo de las biopsias.

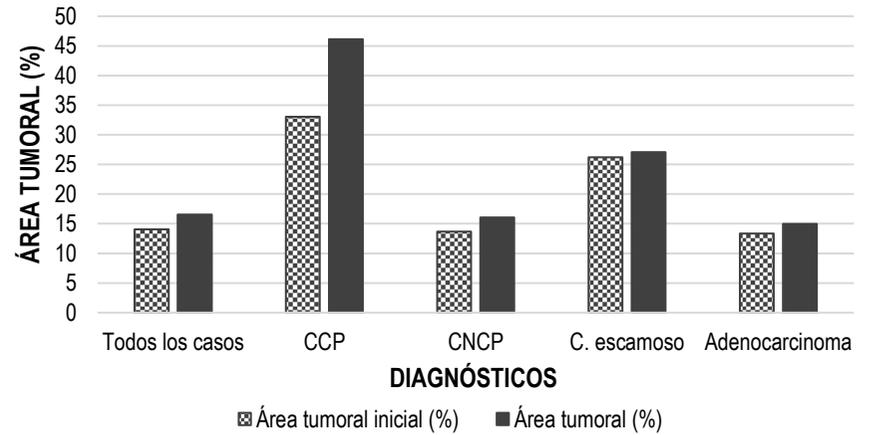


Figura 22. Mediana de las áreas tumorales iniciales y las áreas tumorales expresadas en forma de proporción en el grupo de las biopsias.

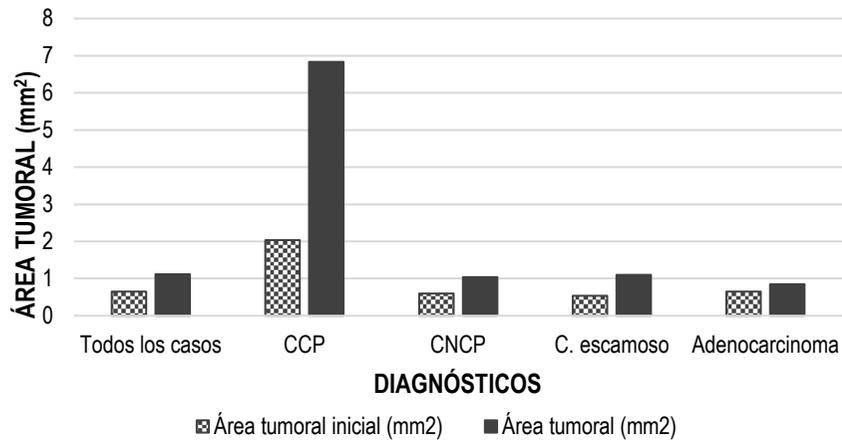


Figura 23. Mediana de las áreas tumorales iniciales y las áreas tumorales expresadas en valor absoluto en el grupo de los citobloques.

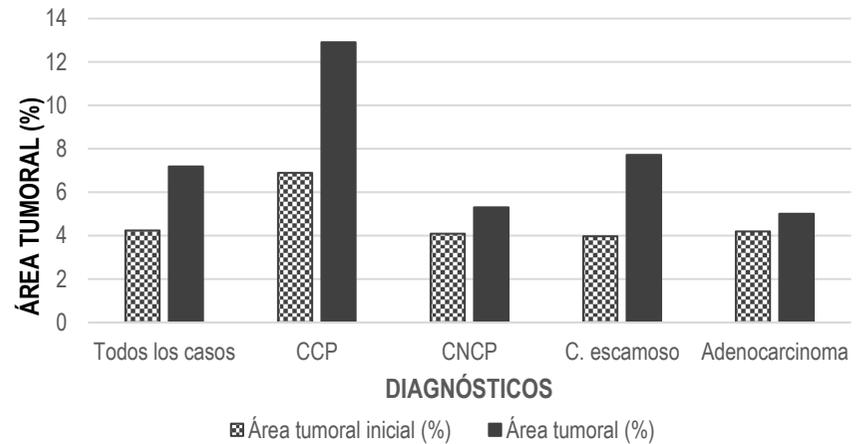


Figura 24. Mediana de las áreas tumorales iniciales y las áreas tumorales expresadas en forma de proporción en el grupo de los citobloques.

máximo-mínimo del área tumoral (**Figura 20**). En los análisis del área tumoral (**Figuras 18-19**) la única diferencia estadísticamente significativa encontrada es en la proporción de área tumoral objetivada en los casos de carcinoma microcítico (media 11,65% mediana 12,91% p 0,049) respecto a los de adenocarcinoma (media 8,75% mediana 5,01%), sin diferencias en ninguna otra comparación ni en valor absoluto ni en forma de proporción. No obstante, se observa que, en ambas formas de expresión del área tumoral, al igual que en las biopsias, los carcinomas microcíticos tienen una mayor representación tumoral.

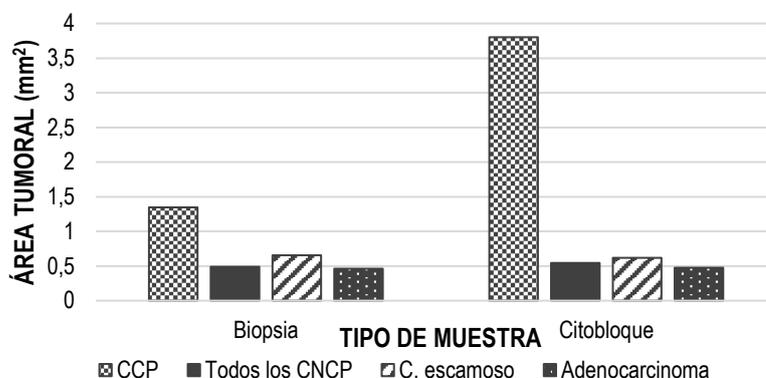


Figura 20. Medianas de la diferencia máximo-mínimo del área tumoral de los distintos diagnósticos de las biopsias y los citobloques.

Finalmente, se considera de interés comparar el área tumoral inicial con el área tumoral para poder ver si se puede presuponer que el portaobjetos de H-E, por ser el primer corte que se realiza en todos los casos del bloque de parafina, es el que cuenta con una mayor representación tumoral (**Figuras 21-24**). En los gráficos de las biopsias se observa que en ambas formas de expresión el área tumoral es mayor que el área inicial, salvo en el caso del carcinoma escamoso, en el que el área inicial es mayor que el área tumoral. En los citobloques, en todos los casos el área tumoral fue mayor que la inicial. Hay que entender que estas muestras son tridimensionales, y esta comparación indica cómo evoluciona la disponibilidad del material tumoral en función de la profundidad de los cortes. En los cilindros de biopsia, en muchas ocasiones solo se llegan a cortar las partes más superficiales, que, por esta forma

característica, son las más estrechas. Estos datos parecen indicar que en la profundidad de los bloques de parafina aumenta el área tumoral de ambas muestras.

5. DISCUSIÓN:

Un estudio piloto es una herramienta de investigación que tiene la valiosa capacidad de aportar resultados preliminares que permiten el diseño de estudios posteriores más extensos. La posibilidad de realizar un estudio cuantitativo sobre la capacidad de distintos tipos de muestras para la consecución de material tumoral es una gran oportunidad, pero para controlar su calidad son imprescindibles ciertos estándares. La calibración de los objetivos fue un punto de partida clave para la consecución de unos datos fiables y controlados. Los microscopios vienen con una calibración automática que el proveedor realiza en ellos, pero esta no puede ser revisada, por lo que se optó por la calibración manual.

Los resultados de nuestro trabajo, en primer lugar, parecen indicar que no existe una diferencia significativa en la cantidad de celularidad tumoral presente en muestras citológicas procesadas en citobloque, en relación con el parámetro equivalente de una muestra de biopsia. A partir de los datos obtenidos para las variables de área tumoral tanto inicial como en los cortes sucesivos, se observa que estas tienen en los citobloques un valor igual ($0,65 \text{ mm}^2$) o superior ($1,12 \text{ mm}^2$ vs $0,85 \text{ mm}^2$) al de las biopsias.

Sin embargo, la proporción del material tumoral respecto al área total de las muestras es menor en los citobloques. En ellos, las áreas totales iniciales y del resto de los cortes, son de $14,36 \text{ mm}^2$ y $16,98 \text{ mm}^2$, respectivamente, representando el material tumoral un 4,24% y un 7,18% en cada caso. De esta manera, el material no tumoral en cada citobloque puede llegar a representar hasta un 95% del total de la muestra, incluyendo componentes como celularidad del ganglio puncionado, sangre, revestimiento epitelial de arrastre, restos de cartílago de la pared bronquial o fibrina del procesado del citobloque. En las biopsias, en cambio, la proporción de material no tumoral es menor, por lo que su tamaño total también lo es, en concreto de $5,63 \text{ mm}^2$ en el corte inicial y de $4,7 \text{ mm}^2$ en los demás. Por esto, pese a que las biopsias tienen una representación tumoral menor o igual que los citobloques, la proporción

de esta respecto al total es mayor (14,02% vs 4,24%; 16,53% vs 7,18%). Esta disparidad de tamaños totales (**Figura 25**) hace que para futuros estudios comparativos sea más adecuado el uso del área tumoral en valor absoluto sobre su expresión en forma de proporción respecto del área total de la muestra. A fin de cuentas, lo que importa en la práctica clínica es contar con una mayor cantidad de material tumoral, y no cual sea la representación de este en el total de la muestra.

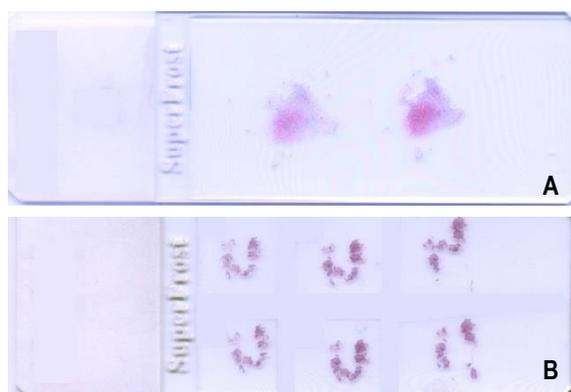


Figura 25. Portaobjetos de la tinción de H-E (referencia) de dos de las muestras incluidas en el estudio piloto. **A:** Citobloque obtenido mediante EBUS de ganglios 4R diagnosticado de carcinoma célula pequeña. **B:** Biopsia obtenida mediante endoscopia bronquial de una masa en el LSI diagnosticada de carcinoma célula pequeña. Puede observarse la diferencia en los tamaños y la cantidad de cortes incluidos en cada uno de los portaobjetos.

Entre los escasos trabajos morfométricos previos se encuentra el trabajo de Coglhin y sus colaboradores (16) que sobre muestras de biopsia encontró una proporción mayor de representación tumoral que la encontrada en nuestro trabajo (**Tabla 8**). Los carcinomas de células escamosas parecen ser los que presentan valores más similares en ambos trabajos. Una posible explicación a las diferencias en los resultados de ambos estudios puede venir de la diferente metodología empleada en la medición de las muestras. Mientras que en nuestro trabajo la medición se realizó de manera directa a través de la cámara del microscopio y sobre los portaobjetos, Coglhin y sus colaboradores emplearon un programa informático que analizaba fotografías de los portaobjetos sacadas por los investigadores. Este programa, según indican ellos mismos, ha podido infraestimar la parte no tumoral de las muestras, puesto que en

fragmentos dentro de las muestras considerados como 100% de área tumoral hay, por ejemplo, células inflamatorias y endoteliales acompañantes que el programa no tiene en cuenta. Esto puede aumentar de manera artificial la proporción de área tumoral, aunque no se puede determinar si esta es la única causa de las diferencias observadas. Otra variable que ha podido influir es la técnica empleada para la obtención de las muestras, dado que el estudio de Coghlin incluía exclusivamente muestras obtenidas mediante biopsia endoscópica, técnica con una representación limitada en nuestro trabajo (3 muestras de las 9 estudiadas). Sería de interés en futuras investigaciones la comparación entre técnicas de obtención de muestra, tanto de biopsias como de citología, para identificar la más adecuada para obtener material tumoral abundante.

Tabla 8. Medias y medianas del área tumoral obtenidas en el estudio de Coghlin et al. y del área tumoral inicial en este trabajo, expresadas en forma de proporción respecto al área total de la muestra

	Coghlin et al	Este trabajo
Todos los casos		
Media	33,4%	19,37%
Mediana	28%	14,02%
Carcinoma célula pequeña		
Media	46,5%	26,83%
Mediana	49%	33,07%
Todos los carcinomas no célula pequeña		
Media	28,2%	15,64%
Mediana	22%	13,69%
Carcinomas escamosos		
Media	32,1%	26,22%
Mediana	23%	26,22%
Adenocarcinomas		
Media	31,1%	13,52%
Mediana	27%	13,36%

Por otra parte, en el caso de las muestras citológicas con citobloques, el único trabajo morfométrico encontrado fue el de Márquez P y sus colaboradores (11). En este estudio se midieron citobloques de muestras citológicas de carcinomas no microcíticos, y la media del área tumoral obtenida en valor absoluto es de 0,51 mm², representando un 12,79% del área total de las muestras. En nuestro trabajo, en este subgrupo tumoral la mediana del área tumoral inicial y del resto de los cortes, es de 0,59 mm² y 1,04 mm², respectivamente; siendo su proporción, del 4,09% y del 5,3%.

Como se ve el área tumoral es mayor en nuestro estudio, pero la proporción de esta sobre el área total no, y esto se debe a que el área total media de los citobloques incluidos en el estudio de Marquez P y sus colaboradores es de $2,43 \text{ mm}^2$, y en el nuestro de $16,11 \text{ mm}^2$ en los cortes con H-E y de $16,99 \text{ mm}^2$ en el resto. Dado que no existe un método estandarizado para la elaboración de los citobloques (10), el hecho de que en cada uno de los trabajos solo se hayan estudiado los de un centro puede influir en el resultado de las mediciones. Para valorar la calidad de los citobloques, podría ser interesante realizar estudios morfométricos comparativos entre los obtenidos en diversos centros, a fin de poder evaluar qué técnicas de procesado son más adecuadas para conseguir un citobloque de calidad para el diagnóstico específico. Estudios de este tipo permitirían dar pasos hacia la estandarización del procedimiento. Además, la experiencia del centro en el que se realice la toma de muestra puede influir decididamente en la consecución de una mayor cantidad de material tumoral (14). En este punto puede tomar protagonismo, por ejemplo, el empleo del ROSE, y se podrían desarrollar estudios morfométricos que comprueben cuantitativamente cómo afecta esta práctica a la consecución de material tumoral.

Algo que ni Coghlin ni Márquez abordan, es la posibilidad, siempre presente, de que estas muestras, por su tamaño y la gran carga de pruebas a las que se ven sometidas, se agoten (1-3). En nuestro trabajo, se observa que, de las muestras de neoplasias pulmonares remitidas en el 2018 al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Basurto, se agotaron el 12,63% de las biopsias; y tan solo el 1,06% de los citobloques. En el 5,26% de las biopsias no se pudo llegar al diagnóstico específico por falta de material para la realización de todos los marcadores; situación que no se dio en ninguno de los casos de muestras citológicas con citobloque. Esto son porcentajes pequeños, lo que a nuestro juicio deja claro el alto aprovechamiento que en el Servicio de Anatomía Patológica se obtiene de muestras muy escasas, así como el cuidado y dedicación que su personal técnico pone en ello. No obstante, los datos son discordantes con los del estudio presentado con Coley SM y sus colaboradores (10), en el que indican que se agotaron un porcentaje menor de biopsias (2,27%), pero uno mayor de citobloques (10,81%). Esto a nuestro juicio se debe al buen manejo que se hace de los citobloques en el laboratorio del Hospital

Universitario de Basurto, pero también señala que en el procesado de las biopsias hay puntos a mejorar.

En relación con el mayor número de biopsias agotadas en nuestro estudio se observa que la mediana del número de cortes incluidos en los portaobjetos de H-E es de 6 en las biopsias, mientras que en los citobloques es de 2. Esta diferencia se mantiene en el resto de los portaobjetos de cada caso, con una mediana de 2 cortes en las biopsias y de 1 en los citobloques. La diferencia se debe al empeño de los patólogos responsables de la valoración de las muestras de citología para que solo se incluyan 2 cortes de citobloque como máximo en los portaobjetos, dado el temor, siempre presente en ellos, de agotar el material de forma prematura. Según muestran los resultados de nuestro trabajo esta sistemática debería ser aplicada a las muestras de biopsia de forma generalizada.

Otro detalle en este aspecto, que habla a favor de las muestras citológicas y de los citobloques, es la situación, bastante común, de la presencia de celularidad tumoral en más de uno de los ganglios metastásicos examinados por EBUS. En estas situaciones se selecciona aquel que presenta mayor contenido tumoral para la realización de pruebas complementarias, dejando el material de los otros en reserva para su uso posterior, si fuese necesario. Esta situación no es factible, en el caso de las biopsias de pulmón, que generalmente son muestras únicas. Por tanto, se agotan un mayor número de biopsias y en su caso no contamos con material adicional para el examen, pero en el caso de la citología sí; lo que resalta, aún más, la necesidad de un procesado más cuidadoso de las muestras de biopsia.

La morfometría es una herramienta útil para estudiar las áreas tumorales de manera separada o comparativa en las biopsias y los citobloques, pero hay que ser consciente de que aporta medidas bidimensionales, cuando las muestras, en ambos casos, son tridimensionales. La distribución del material tumoral, considerada como un volumen, es desconocida y no se puede hacer una estimación “a priori” de ella; es decir, no se sabe cuál es el comportamiento de este volumen en la profundidad del bloque de parafina, si va a ir a más o a menos, independientemente de que se trate de un bloque de biopsia o citobloque. En nuestro trabajo, se estableció como área de referencia, tanto total como tumoral, la del corte inicial de H-E, y se observó que esta

era menor que la del resto de los cortes, tanto en biopsias como en citobloques, por lo que parece que el material tumoral va a más en ambos casos desde la superficie hacia la profundidad del bloque. Así y todo, este trabajo, más allá de esta indicación, no puede precisar de forma cuantitativa la distribución volumétrica del material tumoral. Un estudio que pretenda hacer aseveraciones más concretas en cuanto a la distribución del material tumoral en los bloques debería controlar el orden de realización de los cortes en el microtomo.

Los datos referentes a la diferencia entre el área tumoral máxima y mínima en las distintas muestras hablan también de la distribución del material tumoral en términos de mayor dispersión de la celularidad o tejido tumoral, siendo su valor proporcional a esta característica. En nuestro estudio los carcinomas microcíticos demuestran tener una mayor dispersión, especialmente en el caso de los citobloques (mediana 3,8 vs 1,35). Esto puede ser por la menor cohesividad intrínseca de las células de este tipo de tumor respecto a otros histotipos de cáncer de pulmón, característica acentuada en los citobloques, ya que en la citología se obtienen células y no tejido. Esta característica, no obstante, no influye, según nuestros resultados, en la idoneidad de este tipo de muestras para establecer un diagnóstico o realizar las pruebas complementarias pertinentes. Esto es así, porque esta variable no está directamente ligada a la riqueza tumoral de las muestras.

De hecho, en el análisis por histotipos de nuestro trabajo, en concordancia con los datos publicados por Coghlin y sus colaboradores (16), se observa que los carcinomas microcíticos presentan una mayor área tumoral que los no microcíticos, de manera constante, tanto en biopsias ($1,9 \text{ mm}^2$ vs $0,73 \text{ mm}^2$) como en citobloques ($6,83 \text{ mm}^2$ vs $1,04 \text{ mm}^2$). Esto debe ser resaltado, ya que la menor presencia de material tumoral en las muestras de carcinomas no microcíticos entra en conflicto con la realidad clínica sobre la carga de pruebas complementarias que deben soportar uno y otro diagnóstico. De todos los pacientes con neoplasias pulmonares no quirúrgicas, los que se pueden beneficiar de las nuevas terapias dirigidas son los que presentan un carcinoma no microcítico (2-4). Por esto, las muestras con este diagnóstico se deben someter, en el momento en que se escriben estas líneas, como mínimo a 5 cortes más, los correspondientes a las determinaciones de ALK y PDL-1, con sus controles negativos, así como ROS-1, sin olvidar que debe quedar material

La menor proporción de solicitud de técnicas moleculares en el caso de los citobloques mencionada en el párrafo anterior, puede explicarse por la mayor cantidad de carcinomas microcíticos, que no requieren técnicas complementarias adicionales, diagnosticados en citobloques (16 vs 3). Otra posible explicación que debería de considerarse es la renuencia de las guías oficiales al uso de muestras citológicas, por considerarlas no suficientemente validadas. Sin embargo, esta actitud hacia las muestras citológicas por su aparente menor capacidad de obtener material tumoral valorable queda refutada a partir de los datos numéricos de nuestro trabajo, donde se demuestra que los citobloques consiguen la misma o mayor cantidad de material tumoral.

Como el material para las técnicas moleculares se obtiene después de haber realizado todas las pruebas inmunohistoquímicas, la determinación del remanente tras ellas pasaría por hacer otra medición morfométrica en un nuevo corte del bloque de parafina. Un análisis como este permitiría aproximar de manera cuantitativa la cantidad de material necesario para las técnicas de biología molecular, a la vez que determinaría el material hábil que queda para nuevos análisis. Pese a la ausencia de esta determinación en nuestro trabajo, podemos afirmar que, de las muestras de neoplasias pulmonares o sus metástasis ganglionares estudiadas en el año 2018 en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Basurto, el 87,37% de las biopsias y el 98,94% de los citobloques presentan tejido en los bloques de parafina y no están agotados. En esos casos queda material para nuevos análisis si fuesen necesarios, aunque se desconoce cuánto.

6. CONCLUSIONES:

Nuestro trabajo se ha orientado a analizar de manera comparativa la capacidad tanto de biopsias como de citobloques obtenidos a partir de muestras citológicas, para conseguir suficiente material tumoral para el diagnóstico de neoplasias pulmonares.

Nuestros datos indican que los citobloques presentan un área tumoral comparable o incluso mayor que las biopsias. Por otra parte, los citobloques parecen ser menos susceptibles al agotamiento del material tumoral (1,06%) que las biopsias (12,63%). También se ha observado que con frecuencia se dispone de más de un citobloque, de

un mismo paciente, con material tumoral procedente de varias estaciones ganglionares obtenido en la misma exploración. De esta manera que en caso de que uno de los citobloques se agote, se dispone de otras muestras de reserva del mismo tumor para la realización de pruebas adicionales. Esta situación no es frecuente en las biopsias, por lo que en caso de agotarse es necesario re-biopsiar al paciente.

Además, la presencia y la validación de las muestras en la sala de broncoscopias por el patólogo (ROSE) es un procedimiento de gran trascendencia para obtener una muestra citológica de calidad y una cantidad de material tumoral adecuado para su posterior estudio. No existe un equivalente de esta técnica en la biopsia.

La morfometría demuestra ser una herramienta adecuada para el análisis comparativo de las muestras de biopsias y citobloques. Con ella es factible diseñar trabajos más extensos que pueden arrojar resultados más sólidos al incluir un mayor número de muestras. A la luz de los resultados obtenidos en nuestro trabajo es preferible que en futuros estudios comparativos se empleen variables en valor absoluto por su mayor utilidad tanto morfométrica como clínica.

Por último, la morfometría puede ser una herramienta útil en diferentes estudios relacionados con el diagnóstico patológico del cáncer pulmonar. Por ejemplo, se podría comparar la cantidad de material tumoral conseguida con distintas técnicas de obtención de muestra de biopsia y citología, pudiendo evaluar la influencia del ROSE en este último caso. Sería posible, de igual manera, la evaluación de los métodos de procesado de los citobloques a fin de detectar el más adecuado para la estandarización de este procedimiento, así como el estudio de la distribución volumétrica en las muestras. La morfometría permitiría también hacer una aproximación de la cantidad de material tumoral necesario para la realización de técnicas de biología molecular.

7. BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Metovic J, Righi L, Delsedime L, Volante M, Papotti M. Role of Immunocytochemistry in the Cytological Diagnosis of Pulmonary Tumors. *Acta Cytol.* 2020;64(1-2):16-29.
- (2) Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(5):668-84.
- (3) Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243-1260.
- (4) Lozano MD. PAAF de Pulmón: distintos métodos de abordaje y manejo de las muestras para estudios moleculares. En: SEAP. Libro Blanco de Anatomía Patológica. 6ª edición. España: SEAP;2019. 131-133.
- (5) Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017;28(4):1-21.
- (6) Bubendorf L, Lantuéjoul S, Yatabe Y. ALK and ROS1 Analysis in Cytology. En: Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y. IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer. 2ª edición. EEUU: IASLC, Co; 2016. p. 85-90
- (7) Gupta N, Sekar A, Rajwanshi A. Role of FNAC, fluid specimens, and cell blocks for cytological diagnosis of lung cancer in the present era. *J Cytol.* 2015;32(4):217–222.
- (8) Sanz-Santos J, Serra P, Andreo F, Llatjós M, Castellà E, Monsó E. Contribution of cell blocks obtained through endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration to the diagnosis of lung cancer. *BMC Cancer.* 2012;21:12-34.
- (9) Wang H, Agulnik J, Kasymjanova G, Wang A, Jiménez P, Cohen V, Small D, et al. Cytology cell blocks are suitable for immunohistochemical testing for PD-L1 in lung cancer. *Ann Oncol.* 2018;29(6):1417-1422.

- (10) Collins BT, Chen AC, Wang JF, Bernadt CT, Sanati S. Improved laboratory resource utilization and patient care with the use of rapid on-site evaluation for endobronchial ultrasound fine-needle aspiration biopsy. *Cancer Cytopathol.* 2013;121(10):544-51.
- (11) Coley SM, Crapanzano JP, Saqi A. FNA, core biopsy, or both for the diagnosis of lung carcinoma: Obtaining sufficient tissue for a specific diagnosis and molecular testing. *Cancer Cytopathol.* 2015;123(5):318-26.
- (12) Marquez P, Centeno Clemente C, Garcia F, Avila M, Carcereny E, Muñoz AM, et al. Morphometric analysis of cell blocks obtained by endobronchial ultrasound-guided needle aspiration in lung cancer. *Eur Respir J.* 2017;50:834.
- (13) Al-Abbadi MA. Basics of cytology. *Avicenna J Med.* 2011 Jul-Sep; 1(1): 18-28.
- (14) Yao X, Gomes MM, Tsao MS, Allen CJ, Geddie W, Sekhon H. Fine-needle biopsy versus core-needle biopsy in diagnosing lung cancer: a systematic review. *Curr Oncol.* 2012;19(1):e16–e27.
- (15) Gu P, Zhao YZ, Jiang LY, Zhang W, Xin Y, Han BH. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for staging of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2009 May;45(8):1389-96.
- (16) Coghlin CL, Smith LJ, Bakar S, Stewart KN, Devereux GS, Nicolson MC, Kerr KM. Quantitative analysis of tumor in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol.* 2010;5(4):448-52.

8. ANEXOS:

8.1. ANEXO 1: APROBACIÓN DEL CEIC.



DE: **DR. ANTONIO ESCOBAR MARTINEZ**
SECRETARIO. CEIC HOSPITAL UNIVERSITARIO BASURTO

A: **DR. JUAN CARLOS LOPEZ DUQUE**
HOSPITAL UNIVERSITARIO BASURTO
OSI BILBAO BASURTO.
SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA

Bilbao, 20 de febrero de 2020

Estimado Dr. LOPEZ DUQUE,

Le comunicamos que en la reunión del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) celebrada el día 19 de febrero de 2020 y analizada la documentación presentada, ha sido aprobado para su realización en la OSI BILBAO BASURTO el Trabajo de Fin de Grado:

**ESTUDIO MORFOMÉTRICO COMPARADO DE BIÓPSIAS Y BLOQUES
CELULARES DE PATOLOGÍA TUMORAL DE PULMÓN: ESTUDIO PILOTO**

INFORME FAVORABLE

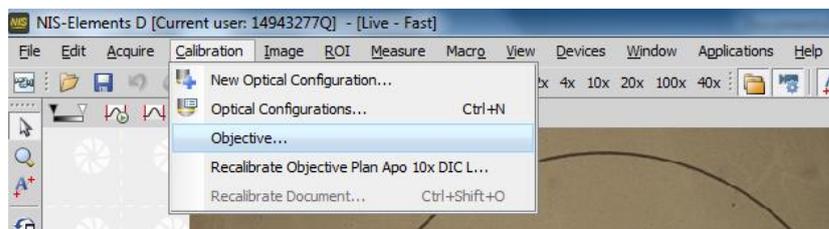
INVESTIGADOR PRINCIPAL
Dr. JUAN CARLOS LÓPEZ DUQUE
TUTELANDO A ELENA EGUIZABAL MARTINEZ
HOSPITAL UNIVERSITARIO BASURTO. OSI BILBAO BASURTO.
SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

Fdo.: Dr. Antonio Escobar Martinez
SECRETARIO
CEIC OSI BILBAO BASURTO

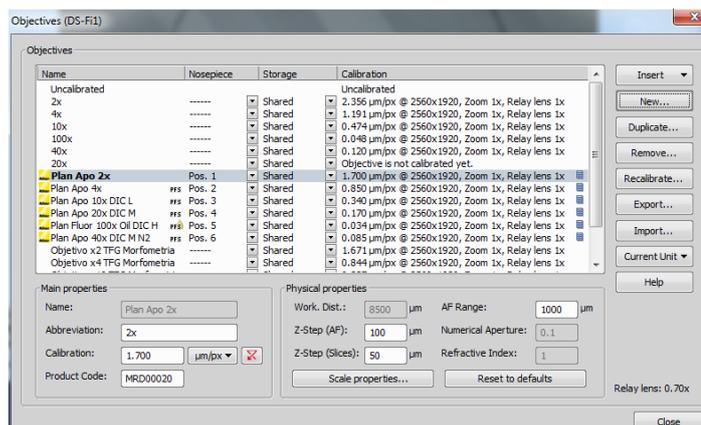
8.2. ANEXO 2: PROTOCOLO DE CALIBRACIÓN.

Protocolo calibración manual cámara NIS-elementsD 4.30.02 con retícula de calibración.

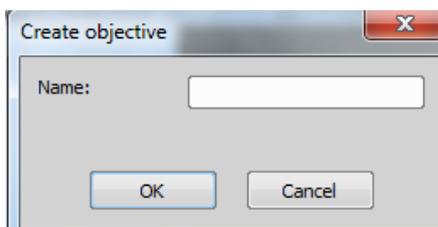
1. En la pantalla de inicio en la barra superior pulsar *Calibration* > *Objectives*.



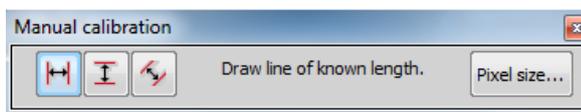
2. En la pantalla emergente aparecen todos los objetivos calibrados. Para crear uno nuevo pulsar en *New*.



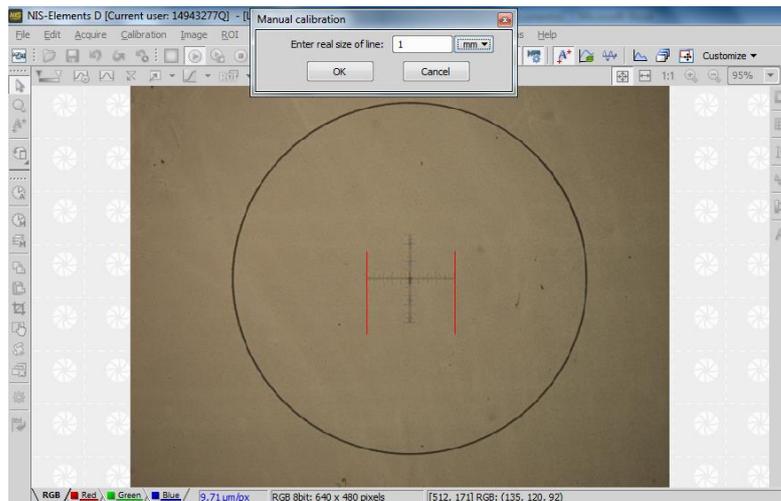
3. Poner nombre al objetivo:



4. Dibujar las líneas que delimiten una longitud conocida (pueden ser en horizontal, vertical u oblicuo).



5. Introducir la longitud conocida. Se deben elegir las unidades adecuadas.



6. Si no se quiere crear un objetivo nuevo si no recalibrar uno preexistente el proceso es el mismo, pero pulsando el botón de *Recalibrate* en la ventana de objetivos.
7. Para usar el objetivo creado se debe seleccionar en el apartado de *Nosepiece* la posición (*pos*) que le corresponda al objetivo (Por ejemplo: objetivo x2. Nosepiece: pos. 1)

8.3. ANEXO 3: BASE DE DATOS DE CASOS DE 2018.

Tabla Anexo 3. Base de datos de casos de muestras de neoplasia pulmonar remitidos en el año 2018 al Servicio de AP del HUB.

Id	Técnica	Sexo	Localización de la lesión	Técnica de obtención	Diagnóstico	Nº tinciones IHC	Técnicas moleculares	Agotado	Diagnóstico completo
1	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	C. escamoso	4	No	No agotado	Sí
2	Biopsia	Hombre	LII	TAC-BAG	Adenocarcinoma	6	No	No agotado	Sí
3	Biopsia	Mujer	Pulmón derecho	TAC-BAG	Carcinoma microcítico	7	No	No agotado	Sí
4	Biopsia	Mujer	LSI	Biopsia endoscópica bronquial	Carcinoma microcítico	4	No	No agotado	Sí
5	Biopsia	Mujer	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	7	Sí	No agotado	Sí
6	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	2	No	No agotado	Sí
7	Biopsia	Hombre	LID	Biopsia endoscópica bronquial	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
8	Biopsia	Mujer	LSD	TAC-BAG	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
9	Biopsia	Hombre	LII	TAC-BAG	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
10	Biopsia	Hombre	LII	Biopsia endoscópica bronquial	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
11	Biopsia	Mujer	LID	Biopsia endoscópica bronquial	Carcinoma microcítico	5	No	No agotado	Sí
12	Biopsia	Mujer	LID	TAC-BAG	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
13	Biopsia	Mujer	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	4	No	Agotado	No
14	Biopsia	Mujer	LID	TAC-BAG	Adenocarcinoma	6	Sí	Agotado	No
15	Biopsia	Hombre	LMD	Biopsia endoscópica bronquial	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
16	Biopsia	Mujer	Pulmón derecho	TAC-BAG	C. escamoso	4	Sí	No agotado	Sí
17	Biopsia	Mujer	LMD	TAC-BAG	C. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
18	Biopsia	Mujer	LID	TAC-BAG	Adenocarcinoma	7	Sí	No agotado	Sí
19	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	8	Sí	Agotado	Sí
20	Biopsia	Hombre	LID	TAC-BAG	Adenocarcinoma	7	Sí	Agotado	Sí
21	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	6	Sí	Agotado	Sí

22	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	7	Sí	No agotado	Sí
23	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
24	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
25	Biopsia	Hombre	LSD	Biopsia endoscópica bronquial	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
26	Biopsia	Mujer	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	3	Sí	Agotado	Sí
27	Biopsia	Hombre	LSI	Biopsia endoscópica bronquial	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
28	Biopsia	Hombre	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
29	Biopsia	Hombre	LSD	TAC-BAG	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
30	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	C. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
31	Biopsia	Hombre	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
32	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
33	Biopsia	Hombre	Desconocida	Desconocida	C. escamoso	9	Sí	Agotado	Sí
34	Biopsia	Hombre	LSI	Desconocida	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	6	No	Agotado	Sí
35	Biopsia	Hombre	LSI	Desconocida	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
36	Biopsia	Mujer	LID	Desconocida	Adenocarcinoma	12	Sí	No agotado	Sí
37	Biopsia	Mujer	LSD	Desconocida	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
38	Biopsia	Mujer	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
39	Biopsia	Hombre	LII	TAC-BAG	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
40	Biopsia	Hombre	Desconocida	TAC-BAG	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
41	Biopsia	Hombre	LID	TAC-BAG	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
42	Biopsia	Hombre	LSI	Biopsia endoscópica bronquial	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	11	Sí	No agotado	Sí
43	Biopsia	Hombre	LID	Biopsia endoscópica bronquial	Adenocarcinoma	4	No	Agotado	No
44	Biopsia	Mujer	LII	TAC-BAG	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
45	Biopsia	Hombre	LID	TAC-BAG	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
46	Biopsia	Hombre	LII	TAC-BAG	C. escamoso	7	Sí	No agotado	Sí

47	Biopsia	Hombre	LID	TAC-BAG	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
48	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
49	Biopsia	Hombre	LSD	Desconocida	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
50	Biopsia	Mujer	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
51	Biopsia	Hombre	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
52	Biopsia	Hombre	LID	TAC-BAG	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
53	Biopsia	Mujer	Desconocida	TAC-BAG	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
54	Biopsia	Hombre	Bronquio intermediario	Biopsia endoscópica bronquial	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	4	No	No agotado	Sí
55	Biopsia	Hombre	LSD	Biopsia endoscópica bronquial	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	6	Sí	No agotado	Sí
56	Biopsia	Hombre	LSD	Desconocida	Adenocarcinoma	12	Sí	Agotado	No
57	Biopsia	Mujer	LSD	Desconocida	C. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
58	Biopsia	Hombre	LII	TAC-BAG	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
59	Biopsia	Hombre	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	13	Sí	No agotado	Sí
60	Biopsia	Mujer	LII	TAC-BAG	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
61	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
62	Biopsia	Hombre	LID	TAC-BAG	C. escamoso	8	Sí	No agotado	Sí
63	Biopsia	Hombre	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
64	Biopsia	Hombre	LID	TAC-BAG	C. escamoso	11	Sí	No agotado	Sí
65	Biopsia	Hombre	LSI	Desconocida	C. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
66	Biopsia	Mujer	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
67	Biopsia	Hombre	LID	TAC-BAG	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	11	Sí	No agotado	Sí
68	Biopsia	Hombre	Desconocida	Desconocida	C. No microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	17	Sí	No agotado	Sí
69	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
70	Biopsia	Hombre	Desconocida	TAC-BAG	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
71	Biopsia	Hombre	LSD	TAC-BAG	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
72	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	C. no microcítico NE, a favor	10	Sí	No agotado	Sí

					de adenocarcinoma				
73	Biopsia	Mujer	LID	TAC-BAG	Adenocarcinoma	12	Sí	No agotado	Sí
74	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	C. No microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
75	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
76	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	10	Sí	Agotado	Sí
77	Biopsia	Hombre	Lingula	TAC-BAG	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
78	Biopsia	Hombre	Masa hilar izquierda	TAC BAG	Adenocarcinoma	11	Sí	No agotado	Sí
79	Biopsia	Hombre	LSD	TAC-BAG	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
80	Biopsia	Hombre	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
81	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
82	Biopsia	Mujer	LSD	TAC-BAG	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
83	Biopsia	Mujer	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	12	Sí	No agotado	Sí
84	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	7	No	Agotado	No
85	Biopsia	Mujer	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
86	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	Adenocarcinoma	11	Sí	No agotado	Sí
87	Biopsia	Hombre	Desconocida	Desconocida	C. escamoso	6	Sí	No agotado	Sí
88	Biopsia	Hombre	LSI	Biopsia endoscópica bronquial	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
89	Biopsia	Hombre	LSI	TAC-BAG	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
90	Biopsia	Hombre	Area yuxtacisural derecha	TAC-BAG	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
91	Biopsia	Hombre	LII	TAC-BAG	Adenocarcinoma	7	Sí	No agotado	Sí
92	Biopsia	Hombre	LMD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
93	Biopsia	Hombre	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
94	Biopsia	Hombre	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	7	Sí	No agotado	Sí
95	Biopsia	Mujer	LSD	TAC-BAG	Adenocarcinoma	7	Sí	No agotado	Sí
96	Citobloque	Hombre	Líquido pleural	Líquido pleural	Carcinomatosis pleural NE	4	No	No agotado	Sí
97	Citobloque	Mujer	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	8	No	No agotado	Sí

98	Citobloque	Hombre	Líquido pleural	Líquido pleural	Carcinomatosis pleural NE	4	No	No agotado	Sí
99	Citobloque	Hombre	Pulmón	TAC-PAAF	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	4	No	No agotado	Sí
100	Citobloque	Mujer	Ganglios SC	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	5	No	No agotado	Sí
101	Citobloque	Mujer	Pulmón	EBUS masa	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
102	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	11	Sí	No agotado	Sí
103	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	11	Sí	No agotado	Sí
104	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	12	Sí	No agotado	Sí
105	Citobloque	Mujer	LII	EBUS masa	Adenocarcinoma	5	Sí	No agotado	Sí
106	Citobloque	Hombre	Ganglios 4L	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	6	No	No agotado	Sí
107	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	C. escamoso	7	Sí	No agotado	Sí
108	Citobloque	Hombre	Ganglios 11R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	4	Sí	No agotado	Sí
109	Citobloque	Mujer	Desconocida	EBUS masa	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	8	Sí	No agotado	Sí
110	Citobloque	Mujer	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	9	No	No agotado	Sí
111	Citobloque	Mujer	Ganglios SC	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
112	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
113	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	8	Sí	Agotado	Sí
114	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	3	No	No agotado	Sí
115	Citobloque	Mujer	Ganglios 4L	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	4	No	No agotado	Sí
116	Citobloque	Hombre	Ganglios 11R	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	4	No	No agotado	Sí
117	Citobloque	Hombre	Ganglios 4L	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	4	No	No agotado	Sí
118	Citobloque	Hombre	Ganglio supraclavicular	PAAF	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
119	Citobloque	Mujer	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	5	No	No agotado	Sí
120	Citobloque	Hombre	Ganglio 11R	EBUS ganglios	C. escamoso	8	Sí	No agotado	Sí
121	Citobloque	Hombre	Ganglios 4L	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
122	Citobloque	Hombre	Ganglio SC	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	5	No	No agotado	Sí

123	Citobloque	Hombre	masa hilar	EBUS masa	C. escamoso	3	No	No agotado	Sí
124	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
125	Citobloque	Hombre	Ganglios 11L	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
126	Citobloque	Mujer	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	3	No	No agotado	Sí
127	Citobloque	Mujer	Líquido pericárdico	Líquido pericárdico	Adenocarcinoma	5	No	No agotado	Sí
128	Citobloque	Hombre	Ganglios 4L	EBUS ganglios	C. NO MICROCÍTICO NE, a favor de adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
129	Citobloque	Hombre	Líquido pleural	Líquido pleural	Carcinomatosis pleural NE	4	No	No agotado	Sí
130	Citobloque	Mujer	Líquido pleural	Líquido pleural	Carcinomatosis pleural NE	3	No	No agotado	Sí
131	Citobloque	Hombre	Líquido pleural	Líquido pleural	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
132	Citobloque	Mujer	Ganglios SC	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
133	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
134	Citobloque	Hombre	Líquido pleural	Líquido pleural	Adenocarcinoma	12	Sí	No agotado	Sí
135	Citobloque	Mujer	LID	EBUS masa	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
136	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
137	Citobloque	Hombre	Líquido pleural	Líquido pleural	Adenocarcinoma	14	Sí	No agotado	Sí
138	Citobloque	Hombre	Ganglios 11L	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	2	No	No agotado	Sí
139	Citobloque	Hombre	Ganglios 11R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	11	Sí	No agotado	Sí
140	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	12	No	No agotado	Sí
141	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	C. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
142	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
143	Citobloque	Hombre	Ganglios 11R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	4	No	No agotado	Sí
144	Citobloque	Mujer	Ganglios SC	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	4	No	No agotado	Sí
145	Citobloque	Hombre	Desconocida	EBUS masa	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
146	Citobloque	Hombre	Líquido pleural	Líquido pleural	Adenocarcinoma	2	No	No agotado	Sí
147	Citobloque	Hombre	Ganglios 10R	EBUS ganglios	C. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí

148	Citobloque	Mujer	Ganglios SC	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	5	No	No agotado	Sí
149	Citobloque	Mujer	Ganglios 4L	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	8	Sí	No agotado	Sí
150	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
151	Citobloque	Mujer	Ganglios 11R	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
152	Citobloque	Mujer	Líquido pleural	Líquido pleural	C. papilar	3	No	No agotado	Sí
153	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
154	Citobloque	Mujer	Ganglios 4R	EBUS ganglios	C. escamoso	8	Sí	No agotado	Sí
155	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	6	No	No agotado	Sí
156	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
157	Citobloque	Hombre	Desconocida	EBUS masa	C. escamoso	1	No	No agotado	Sí
158	Citobloque	Hombre	Ganglios 11R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	6	No	No agotado	Sí
159	Citobloque	Hombre	Ganglios 4L	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	6	No	No agotado	Sí
160	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	5	No	No agotado	Sí
161	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
162	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
163	Citobloque	Hombre	Ganglios 4L	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	11	Sí	No agotado	Sí
164	Citobloque	Hombre	Líquido pericárdico	Líquido pericárdico	Adenocarcinoma	2	No	No agotado	Sí
165	Citobloque	Hombre	Pared Torácica	PAAF	C. escamoso	10	Sí	No agotado	Sí
166	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	3	No	No agotado	Sí
167	Citobloque	Hombre	Ganglios 4L	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	3	No	No agotado	Sí
168	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
169	Citobloque	Hombre	Ganglios 12R	EBUS ganglios	C. escamoso	3	No	No agotado	Sí
170	Citobloque	Mujer	Ganglios 4R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	13	Sí	No agotado	Sí

171	Citobloque	Hombre	Pulmón izquierdo	EBUS masa	Adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí
172	Citobloque	Mujer	Líquido pleural	Líquido pleural	Carcinomatosis pleural NE	8	No	No agotado	Sí
173	Citobloque	Mujer	Líquido pleural	Líquido pleural	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
174	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	6	No	No agotado	Sí
175	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	C. escamoso	16	Sí	No agotado	Sí
176	Citobloque	Hombre	Ganglios 11R	EBUS ganglios	C. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
177	Citobloque	Mujer	Ganglios SC	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	5	No	No agotado	Sí
178	Citobloque	Hombre	Ganglio mediastínico	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
179	Citobloque	Mujer	Ganglios 4R	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	5	No	No agotado	Sí
180	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
181	Citobloque	Hombre	Pulmón izquierdo	EBUS masa	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
182	Citobloque	Hombre	Líquido pleural	Líquido pleural	Adenocarcinoma	4	No	No agotado	Sí
183	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	Carcinoma microcítico	5	No	No agotado	Sí
184	Citobloque	Hombre	Ganglios 4R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de c. escamoso	9	Sí	No agotado	Sí
185	Citobloque	Hombre	Ganglios 10R	EBUS ganglios	C. escamoso	8	Sí	No agotado	Sí
186	Citobloque	Mujer	Ganglios 11L	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	9	Sí	No agotado	Sí
187	Citobloque	Mujer	Ganglios 11R	EBUS ganglios	Adenocarcinoma	13	Sí	No agotado	Sí
188	Citobloque	Hombre	Ganglios SC	EBUS ganglios	C. escamoso	8	Sí	No agotado	Sí
189	Citobloque	Mujer	Ganglios 4R	EBUS ganglios	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	10	Sí	No agotado	Sí

8.4. ANEXO 4: MEDIDAS MORFOMÉTRICAS OBTENIDAS.

Tabla Anexo 4. Medidas morfométricas obtenidas en el estudio piloto empleadas en el análisis comparativo.

Id	Técnica	Diagnóstico	Tinción	Nº de cortes	Área total ponderada (mm ²)	Área tumoral ponderada (mm ²)	Área tumoral (%)	Diferencia Máx-min tumoral (mm ²)
1	Biopsia	C. escamoso	HE	6	9,05391669	2,37356595	26,21590226	0,70452561
			CK7	2	7,9945362	1,819454405	22,7587237	
			TTF1	2	8,29901635	2,24460115	27,0465927	
			CK5-6	2	7,9818097	2,523980015	31,6216511	
2	Biopsia	Adenocarcinoma	HE	6	5,638535067	0,712427467	12,63497448	0,518606033
			CK7	1	5,99690127	1,2310335	20,5278267	
			TTF1	2	5,59517575	1,00204121	17,90902118	
			Napsina A	2	5,94732125	0,986079955	16,58023694	
			CDX2	1	5,72050035	0,94353529	16,49392942	
			CK20	1	5,22021601	0,83797227	16,05244435	
3	Biopsia	Carcinoma microcítico	HE	3	8,342123733	0,654548373	7,846303822	1,34675581
			TTF1	2	9,17784665	1,83385891	19,9813636	
			CD56	1	7,58957122	0,74354485	9,796928291	
			p63	2	12,883446	1,741223885	13,51520304	
			CK AE1/AE3	1	7,93091249	0,80009285	10,08828241	
			Sinaptofisina	1	6,73188	0,64723453	9,614469212	
			Vimentina	2	5,3283215	0,4871031	9,141773821	
4	Biopsia	Carcinoma microcítico	HE	6	10,15601912	4,020565617	39,58800757	1,519748333
			TTF1	2	8,41317435	5,54031395	65,85283651	
			CD56	2	8,24434825	4,898379805	59,41500355	
			Sinaptofisina	2	8,0502589	4,710460805	58,51315919	
5	Biopsia	Adenocarcinoma	HE	4	4,163422925	0,584008935	14,02713454	0,529956225
			TTF1	1	4,11856745	0,7611007	18,47974348	
			Napsina A	2	4,354204815	0,7293649	16,75081745	
			ALK NEG	1	3,87125999	1,1072938	28,60293039	

			ALK	1	4,24828192	1,11396516	26,22154511	
			PDL1 NEG	1	4,44052471	0,85944895	19,35467104	
			PDL1	2	4,434632195	1,069067985	24,1072526	
6	Biopsia	Adenocarcinoma	HE	4	2,7682842	0,516244965	18,64855368	0,438529135
			TTF1	2	5,1551734	0,9547741	18,52069806	
7	Biopsia	Adenocarcinoma	HE	8	3,549572925	0,474280265	13,3616149	0,34311805
			TTF1	2	4,482462345	0,69327885	15,46647348	
			P40	2	4,63972252	0,57182106	12,32446677	
			ALKNEG	1,5	4,765885827	0,413670233	8,679818367	
			ALK	2	3,733124155	0,53941164	14,44933567	
			PDL1 NEG	2	4,212803955	0,46931406	11,14018276	
			PDL1	2	3,88873555	0,3501608	9,004489904	
10	Biopsia	Adenocarcinoma	HE	6	6,518469933	0,583266605	8,947906655	0,462856745
			CK7	2	5,5340888	0,612385135	11,06569043	
			TTF1	2	4,525903565	0,410463905	9,069214558	
			P40	1	5,18083269	0,58689023	11,32810622	
			ALKNEG	1	3,33700554	0,14952839	4,480915246	
			ALK	2	2,972758735	0,20499457	6,895768822	
			PDL1NEG	1	4,29252517	0,38488988	8,966514225	
			PDL1	2	3,99607376	0,30649865	7,66999481	
			ROS1	2	4,113046995	0,449011265	10,91675504	
11	Biopsia	Carcinoma microcítico	HE	6	5,315182867	1,757675083	33,06894847	0,657411497
			TTF1	2	4,29001132	2,41508658	56,29557593	
			CD56	2	4,116044335	1,899276265	46,14324119	
			P40	2	4,40194698	2,079016905	47,22948537	
			Sinaptofisina	2	4,237040535	2,05306889	48,45525723	
97	Citobloque	Carcinoma microcítico	HE	2	38,30632405	3,647874375	9,522903765	7,115094525
			CK7	1	59,3924662	8,38272422	14,11412045	
			TTF1	1	53,3144465	10,7629689	20,18771573	

			CD56	1	52,0460768	6,63991056	12,75775422	
			P40	1	52,3981335	6,82957344	13,03400137	
			Cromogranina	1	60,8547815	8,89095686	14,61012042	
			Ki67	1	55,1789627	7,12494336	12,91242715	
			Sinaptofisina	1	61,3500906	9,22536251	15,0372435	
98	Citobloque	Carcinomatosis pleural NE	HE	2	14,3579759	1,847724535	12,86897643	0,91493024
			Calretinina	2	15,39354575	2,24606972	14,5909835	
			CK AE1/AE3	2	15,7708901	2,762654775	17,5174309	
			Vimentina	2	14,15631275	2,28486276	16,14023934	
101	Citobloque	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	HE	2	44,776491	2,682269845	5,99035294	1,85482792
			TTF1	1	44,4292398	3,86823044	8,706497022	
			CK5/6	1	42,9564937	2,16865454	5,048490585	
			CD56	1	44,1551635	2,67383891	6,055552053	
			ALK NEG	1	43,9695105	2,44053897	5,550525676	
			ALK	1	46,7364756	2,7685403	5,923725023	
			PDL1 NEG	1	42,4960431	3,62369685	8,527139436	
			PDL1	1	45,1276789	4,02348246	8,915775325	
102	Citobloque	C. no microcítico NE, a favor de adenocarcinoma	HE	2	18,69196693	0,65255726	3,491110714	0,47562039
			CK7	1	26,7363551	1,12817765	4,219638936	
			TTF1	1	16,4952171	0,82673948	5,011995144	
			CK5/6	1	16,9874779	0,85025691	5,005198035	
			CD56	2	16,2894566	0,659512675	4,048708875	
			P40	1	26,1138863	0,75889466	2,90609621	
			Napsina A	1	23,8145724	0,77398321	3,250040341	
			ALK NEG	1	16,4708133	0,94905602	5,762047099	
			ALK	1	19,5311439	0,90893315	4,653763009	
			PDL1 NEG	1	19,1136945	0,81930613	4,286487523	
			PDL1	1	19,1638806	0,8220403	4,289529439	
103	Citobloque	Adenocarcinoma	HE	2	10,3067836	0,432838175	4,199546549	0,34601897

			CK7	2	11,80010865	0,60707973	5,144696104	
			TTF1	2	10,18744215	0,539874855	5,299415173	
			CK5/6	2	11,03076985	0,491676195	4,457315325	
			CD56	2	11,2984698	0,39124256	3,462792457	
			ALK NEG 1	1	9,16050643	0,40983054	4,473885185	
			ALK NEG 2	1	6,24547453	0,26106076	4,179998793	
			ALK	2	10,38855535	0,50073529	4,820066632	
			PDL1 NEG	1	6,36119377	0,30809937	4,843420608	
			PDL1	1	5,49363759	0,27451008	4,996872755	
			ROS1	1	6,15052801	0,26780237	4,354136256	
104	Citobloque	Adenocarcinoma	HE	1	68,5099413	15,3306501	22,37726352	12,90873787
			CK7	1	69,2882545	18,1586741	26,20743477	
			TTF1	1	51,7082726	15,1888524	29,37412456	
			CK5/6	1	44,4696516	13,9832766	31,44453823	
			CD56	1	41,822357	13,5121913	32,30853608	
			ALK NEG 1	1	29,1791899	7,1902307	24,64163921	
			ALK NEG2	1	27,3287699	5,72863032	20,9619033	
			ALK 1	1	37,9089126	8,60690196	22,70416472	
			ALK2	1	28,5431511	5,56342033	19,49126188	
			CD138	1	64,9252764	18,4721582	28,45141249	
			CD38	1	62,103567	17,8593314	28,75733595	
			MUM-1	1	42,5687162	12,8382174	30,15880803	
105	Citobloque	Adenocarcinoma	HE	2	7,87464335	0,120010105	1,524006862	0,03893731
			CK7	1	8,15039938	0,09384828	1,151456212	
			TTF1	2	8,0441139	0,13278559	1,650717427	
			CK5/6	2	8,9999234	0,11041617	1,226856775	
			ALK NEG	1	8,47329525	0,11197384	1,321491069	
			ALK	1	8,50781551	0,0977654	1,149124589	
106	Citobloque	Carcinoma microcítico	HE	2	9,8124885	0,4165727	4,245331854	0,492255415

			TTF1	2	12,44411825	0,894234875	7,18600432	
			CK5/6	2	12,33159755	0,908828115	7,369913844	
			CD45	2	13,86188525	0,88560687	6,388790947	
			CK (AE1/AE3)	1	12,564557	0,57473649	4,574267839	
107	Citobloque	C. escamoso	HE	2	13,52791715	0,53797763	3,976795718	0,6166093
			CK 5/6	1	15,7479053	1,15458693	7,331685758	
			ALK NEG	1	13,5695815	1,11710791	8,232441877	
			ALK	2	14,07764285	1,04126578	7,396591824	
			PDL1 NEG	1	14,1095809	1,05085225	7,447792089	
			PDL1	1	13,385298	1,076388	8,04156919	
			ROS1	1	14,0853647	1,12452548	7,983644754	