



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Construcción de una herramienta de Patología Digital para la identificación de células ganglionares: Apoyo diagnóstico en Enfermedad de Hirschsprung**

Andrés Felipe Siabatto Cleves

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina

Departamento de Patología

Bogotá D.C., Colombia

2023

**Construcción de una herramienta de Patología Digital para la identificación  
de células ganglionares: Apoyo diagnóstico en Enfermedad de  
Hirschsprung**

Andrés Felipe Siabatto Cleves  
Trabajo de grado  
Especialidad en Patología Anatómica y Clínica

Tutor:

Dra. Natalia Olaya Morales  
Docente del Departamento de Patología, Facultad de medicina  
Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de medicina, Departamento de patología  
Bogotá D.C., Colombia

2023

## **Grupo Desarrollador**

### **Dra. Paula Andrea Toro Castaño**

Patóloga Universidad Nacional de Colombia

### **Dr. Germán Corredor Prada**

Investigador asociado. Profesor Emory University, Atlanta, Georgia, EEUU

### **Dra. Fernando Fierro Ávila**

Cirujano Pediatra. HOMI - Fundación Hospital Pediátrico La Misericordia.

Maestría en Bioética.

Profesor titular. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

### **Dra. Natalia Olaya Morales**

Patóloga. Hospital Universitario Nacional

Docente asistente. Patología Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C.

### **Dra. Edna Margarita Quintero**

Patóloga. HOMI - Fundación Hospital Pediátrico La Misericordia. Bogotá, D.C., Colombia

### **Kevin Maldonado Cañón**

Médico. Asistente de Investigación

Maestría en Epidemiología Clínica

### **Andrés Felipe Siabatto Cleves**

Residente de Patología Clínica y Quirúrgica  
Universidad Nacional de Colombia

# Resumen

**Palabras clave: Enfermedad de Hirschsprung, células ganglionares, aganglionosis, biopsia rectal, Deep learning**

El objetivo del presente estudio fue desarrollar una herramienta de software basada en patología digital capaz de apoyar el proceso diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung mediante la identificación automática de células ganglionares en láminas histológicas de biopsias rectales.

Se seleccionaron biopsias colorrectales de 25 pacientes, realizadas en HOMI-Fundación Hospital Pediátrico La Misericordia para valoración de inervación, todas correspondientes a pacientes con inervación preservada. Posteriormente, haciendo uso de una cámara digital acoplada a un microscopio, se tomaron fotos de las láminas de histología, buscando representar células ganglionares en diferentes niveles y estados de maduración. Los núcleos fueron segmentados utilizando una herramienta libre (Stardist®) y a continuación fueron anotados manualmente (células ganglionares y no ganglionares) por dos patólogos, uno de ellos experto.

Se obtuvieron un total de 39918 núcleos, de los que se seleccionó 2076 (346 células ganglionares y 1730 no ganglionares). De estos núcleos seleccionados se extrajo un set de 100 características relacionadas con forma, color y textura. Para evaluar la utilidad de estas características en la discriminación de los núcleos se utilizó una metodología de validación cruzada, dividiendo de manera aleatoria los núcleos en un set de entrenamiento y un set de validación (70 y 30% respectivamente). Utilizando la prueba de Wilcoxon se seleccionaron las 4 características con mejor desempeño, y fueron estas las características utilizadas para entrenar un clasificador basado en inteligencia artificial (análisis de discriminación lineal). La herramienta de clasificación fue aplicada entonces al set de validación y su desempeño fue evaluado en cada una de las iteraciones realizadas (500), en términos de exactitud, precisión, sensibilidad y especificidad. El desempeño global fue valorado utilizando el área bajo la curva ROC (AUC).

El producto fue una potencial herramienta diagnóstica para enfermedad de Hirschsprung de bajo costo y fácil implementación, con un muy buen desempeño en la discriminación entre células ganglionares y células no ganglionares (AUC = 0.98), y que podría ser utilizada por patólogos enfrentados a biopsias rectales tomadas en áreas distantes con disponibilidad limitada de expertos o pruebas complementarias.

## **Construction of a Digital Pathology Tool for the Identification of Ganglion Cells: Diagnostic Support in Hirschsprung's Disease**

**Key Words: Hand- crafted features, Hirschsprung disease, Artificial intelligence, Machine learning, Diagnostic Errors**

### **Abstract**

The main objective of the present study was to develop a software tool based on digital pathology capable of supporting the diagnostic process of Hirschsprung's disease by automatically identifying ganglion cells in histological slides of rectal biopsies.

Rectal biopsies performed at HOMI-Fundación Hospital Pediátrico La Misericordia for innervation assessment were selected, all corresponding to patients with preserved innervation. Subsequently, using a digital camera attached to a microscope, photos of the histological slides were taken, aiming to represent ganglion cells at different levels. The nuclei were segmented using a free tool (Stardist®) and then manually annotated (ganglion and non-ganglion cells) by two pathologists, one of whom was an expert.

A total of 39918 nuclei were obtained from which 2076 were selected (346 ganglion cells and 1730 non-ganglion cells). From these selected nuclei, a set of 100 features related to shape, color, and texture was extracted. To evaluate the utility of these features in discriminating the nuclei, a cross-validation methodology was used, randomly dividing the nuclei into a training set and a validation set (70% and 30% respectively). Using the Wilcoxon test, the features with the best performance were selected, and these features were used to train an artificial intelligence-based classifier (linear discriminant analysis). The classification tool was then applied to the validation set, and its performance was evaluated in each of the iterations (500) in terms of accuracy, precision, sensitivity, and specificity. The overall performance was assessed using the area under the ROC curve (AUC).

The result was a potential low-cost and easily implementable diagnostic tool for Hirschsprung's disease, with very good performance in discriminating between ganglion cells and non-ganglion cells (AUC = 0.98), which could be used by pathologists faced with rectal biopsies taken in distant areas with limited availability of experts or complementary tests.

# Contenido

1. Introducción
2. Justificación
3. Objetivos
  - 3.1 Objetivo general
  - 3.2 Objetivos específicos
4. Marco conceptual
  - 4.1 Enfermedad de Hirschsprung
    - 4.1.1 Aspectos generales
    - 4.1.2 Fisiopatología
    - 4.1.3 Diagnóstico
    - 4.1.4 Tratamiento
  - 4.2 Patología Digital
    - 4.2.1 Microscopía virtual
  - 4.3 Inteligencia artificial, machine learning y Deep learning en la patología digital
5. Plan de investigación
  - 5.1 Esquema general del estudio
  - 5.2 Procedimientos del estudio
    - 5.2.1 Obtención de la Aprobación del Comité de Ética de HOMI - Fundación Hospital Pediátrico La Misericordia.
    - 5.2.2 Selección de láminas histológicas para digitalización
    - 5.2.3 Fuente de Datos
    - 5.2.4 Construcción de base de datos correspondiente al proyecto
    - 5.2.5 Sustracción de los bloques del archivo de patología de HOMI - Fundación Hospital Pediátrico La Misericordia.
    - 5.2.6 Revisión y digitalización de las láminas histológicas
    - 5.2.7 Segmentación y anotación de los núcleos
    - 5.2.8 Exportación de los núcleos a mascararas binarias
    - 5.2.9 Anotación de los núcleos
    - 5.2.10 Extracción de las características
    - 5.2.11 Selección de características
    - 5.2.12 Entrenamiento de la inteligencia artificial
    - 5.2.13 Aplicación al set de validación
6. Resultados
  - 6.1 Características seleccionadas
  - 6.2 Desempeño global
7. Discusión
8. Conclusiones
9. Administración del estudio
  - 9.1 Confidencialidad
  - 9.2 Anonimización
10. Consideraciones éticas
11. Productos

Bibliografía

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Hirschsprung es el producto de una alteración de la migración o diferenciación de las células de la cresta neural, dando como resultado ausencia de células ganglionares en los plexos mientérico y submucoso colónicos. El resultado es una motilidad intestinal alterada, que se manifiesta con signos de obstrucción intestinal en neonatos, y estreñimiento crónico en niños mayores. La enfermedad de Hirschsprung se asocia con complicaciones que pueden poner en peligro la vida del paciente afectado, entre ellas destaca el megacolon tóxico. La incidencia mundial está estimada en 1:5000 nacidos vivos; en Colombia, un estudio encontró una incidencia del 20.58% en las biopsias colorrectales valoradas en un hospital de referencia.

Radiológicamente, en imágenes contrastadas se evidencia una zona de transición dilatada, adyacente a un segmento de intestino de apariencia normal. El estándar de oro diagnóstico es el examen histopatológico del fragmento intestinal comprometido, en el que no se observan células ganglionares. La evaluación de la inervación intestinal requiere de un profesional experimentado que realiza un análisis exhaustivo de varios niveles de tejido. Este es un proceso sujeto a errores que pueden resultar en morbilidad asociada a intervenciones quirúrgicas no requeridas, aganglionosis residual, o en complicaciones asociadas con una intervención tardía (ej. Megacolon tóxico). Debido a la importancia del diagnóstico adecuado y oportuno, la hematoxilina eosina se complementa con estudios de histoquímica e inmunohistoquímica que requieren experiencia y entrenamiento para su interpretación, y que tienen una disponibilidad limitada (más aún en países en vías de desarrollo como Colombia). Por lo tanto, se requieren herramientas de apoyo diagnóstico que sean de fácil interpretación y acceso.

La patología digital consiste en el uso de herramientas tecnológicas para permitir la digitalización, acceso remoto, consulta, almacenamiento e identificación celular o estructural basada en láminas histológicas. Brinda la posibilidad de obtener medidas objetivas de hallazgos histopatológicos y constituye una herramienta factible para fortalecer la enseñanza de la patología. Se ha intentado implementar en enfermedad de Hirschsprung para la identificación de células ganglionares, utilizando herramientas de aprendizaje de máquina y obteniendo resultados promisorios en cuanto a sensibilidad y especificidad.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una herramienta diagnóstica que permitiera la identificación automática de probables células ganglionares en láminas histológicas teñidas con hematoxilina eosina (previa digitalización), disminuyendo costos con respecto al uso de inmunohistoquímica, ahorrando tejido, disminuyendo el tiempo invertido para la revisión de las biopsias, y facilitando el diagnóstico en laboratorios de patología que no cuentan con los recursos humanos o económicos de los centros de referencia.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung constituye un verdadero reto pues la totalidad del proceso está sujeto a errores. Desde la biopsia, que puede ser tomada en las zonas equivocadas o involucrando una cantidad insuficiente de tejido, pasando por el medio de transporte/almacenamiento, el procesamiento macroscópico y, finalmente, la interpretación de la histología.

La interpretación de las láminas teñidas con Hematoxilina y eosina requiere una evaluación juiciosa y experiencia para identificar células ganglionares en estadios diferentes de maduración. La inmunohistoquímica, una herramienta diagnóstica que podría ayudar en el proceso, implica un mayor uso de tejido, de recursos y experiencia que permita su adecuada interpretación.

Los errores diagnósticos derivan en la realización de procedimientos quirúrgicos innecesarios, persistencia de la obstrucción intestinal o intervención quirúrgica tardía. Esta última asociada con complicaciones como megacolon tóxico (con mortalidad tan alta como el 80%), y dificultades en el establecimiento de anastomosis.

En países industrializados, 2/3 de los casos son diagnosticados durante el periodo neonatal y el 95% antes del primer año. En Colombia, casi la mitad son diagnosticados después del primer año de vida, esto asociado con la limitada experiencia y disponibilidad de recursos diagnósticos en las regiones distantes. Este requerimiento podría ser subsanado utilizando patología digital, una herramienta que podría disminuir costos, haciendo posible que laboratorios de patología muy distantes de los centros de referencia, o sin apoyo de patólogos experimentados, hagan el diagnóstico apropiado, disminuyendo también la morbimortalidad asociada con la enfermedad.

En algunos estudios previamente publicados se ha tomado como punto de partida láminas sometidas a tinciones de inmunohistoquímica para entrenar modelos de aprendizaje de máquina, sin embargo, la inmunohistoquímica implica un costo adicional tanto monetario como en tiempo y tejido. En vista de esto último, sería ideal desarrollar una herramienta que sea capaz de identificarlas en cortes teñidos con hematoxilina eosina, pues representaría un ahorro en estos aspectos.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar una herramienta informática basada en Patología Digital que contribuya a la identificación de células ganglionares en biopsias rectales obtenidas de pacientes con sospecha de enfermedad de Hirschsprung.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desarrollar una herramienta computacional que permita identificar células ganglionares de manera automática en biopsias rectales tomadas a pacientes con sospecha de Enfermedad de Hirschsprung
- Evaluar el desempeño de la herramienta desarrollada en termino de características operativas, eficacia y precisión.

## **4 MARCO CONCEPTUAL**

### **4.1 Enfermedad de Hirschsprung**

#### **4.1.1 Aspectos generales**

La enfermedad de Hirschsprung es producto de una alteración en el desarrollo del sistema nervioso entérico, con alteración de la migración y la maduración de las células de la cresta neural (1). Se caracteriza por la ausencia de células ganglionares en los plexos mientérico, submucoso y de Henle del intestino distal, dando como resultado ausencia de peristaltismo del intestino afectado, ocasionando obstrucción funcional (1) (2) (3). Estos cambios se asocian con un aumento en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en las fibras nerviosas parasimpáticas de la lámina propia, la muscular de la mucosa y la muscular propia del recto, el sigmoides y el colon descendente; producto de una liberación no controlada de acetilcolina (4).

En países industrializados,  $\frac{2}{3}$  de los casos son diagnosticados en el periodo neonatal, y un 95% antes del primer año (3). En Colombia las cosas son bastante distintas; en series de casos se ha visto que el 44% son diagnosticados después del primer año de vida, y en menos de  $\frac{1}{3}$  de los casos el diagnóstico se da en el periodo neonatal (3). Esto probablemente producto de la falta de consenso en el manejo del estreñimiento, la falta de criterios para realizar las biopsias rectales e informes de patología equívocos o inexactos (3).

La región afectada varía, viéndose aganglionosis en el recto del 100% de los pacientes; en el sigmoides (enfermedad de segmento corto) en 75-85%; colon ascendente y transversal 10% de los casos cada uno; colon ascendente e íleon distal en 5-10% de los casos (1) (3) (5) (6).

Es uno de los trastornos más comunes de la motilidad intestinal, con una incidencia mundial de alrededor de 1:5000 nacidos vivos y existe un predominio de presentación en el sexo masculino (1) (2).

Dentro de sus complicaciones se incluye el desarrollo de enterocolitis (11-24% de los recién nacidos con esta patología), complicación más asociada a morbimortalidad (5).

Algunos de los afectados tienen otras anomalías asociadas como alteraciones del desarrollo de tejidos derivados de la cresta neural; por ejemplo, alteraciones de la pigmentación y sordera neurosensorial (1).

#### **4.1.2 Fisiopatología**

Para explicar la aparición de esta alteración, se han propuesto una variedad de teorías, las dos predominantes son (1) (7):

1) Las células nunca alcanzan el intestino distal porque se diferencian a células ganglionares de manera más temprana de lo que deberían.

Modelos animales han mostrado que las mutaciones en los genes de la endotelina y SOX10 pueden producir una maduración/diferenciación temprana de las células de la cresta neural, lo cual deriva en una depleción del número de células progenitoras y un impedimento para su migración (1).

2) Las células ganglionares alcanzan su destino, sin embargo, en su sitio de destino ocurre muerte celular o tienen problemas para proliferar.

Es probable que la enfermedad de Hirschsprung sea una entidad heterogénea, con múltiples mecanismos etiológicos diferentes, de manera que cada de estas teorías puede ser cierta en casos individuales (1). Esta última apreciación se ve respaldada en la variedad de genes que se han visto afectados en el estudio de esta enfermedad (1).

Uno de los genes en los que se encuentra más comúnmente alteraciones es el oncogén RET (en casos familiares o de afectación de segmento largo), y genes relacionados como la neurturina y el factor neurotrópico derivado de células gliales (1). Otros genes que han sido asociados con la enfermedad incluyen ZFH1B, PHOX2B, L1CAM y NRG-1 (1). Otras familias de genes se ven también afectadas son los genes que codifican para los receptores de endotelina A y endotelina B (1).

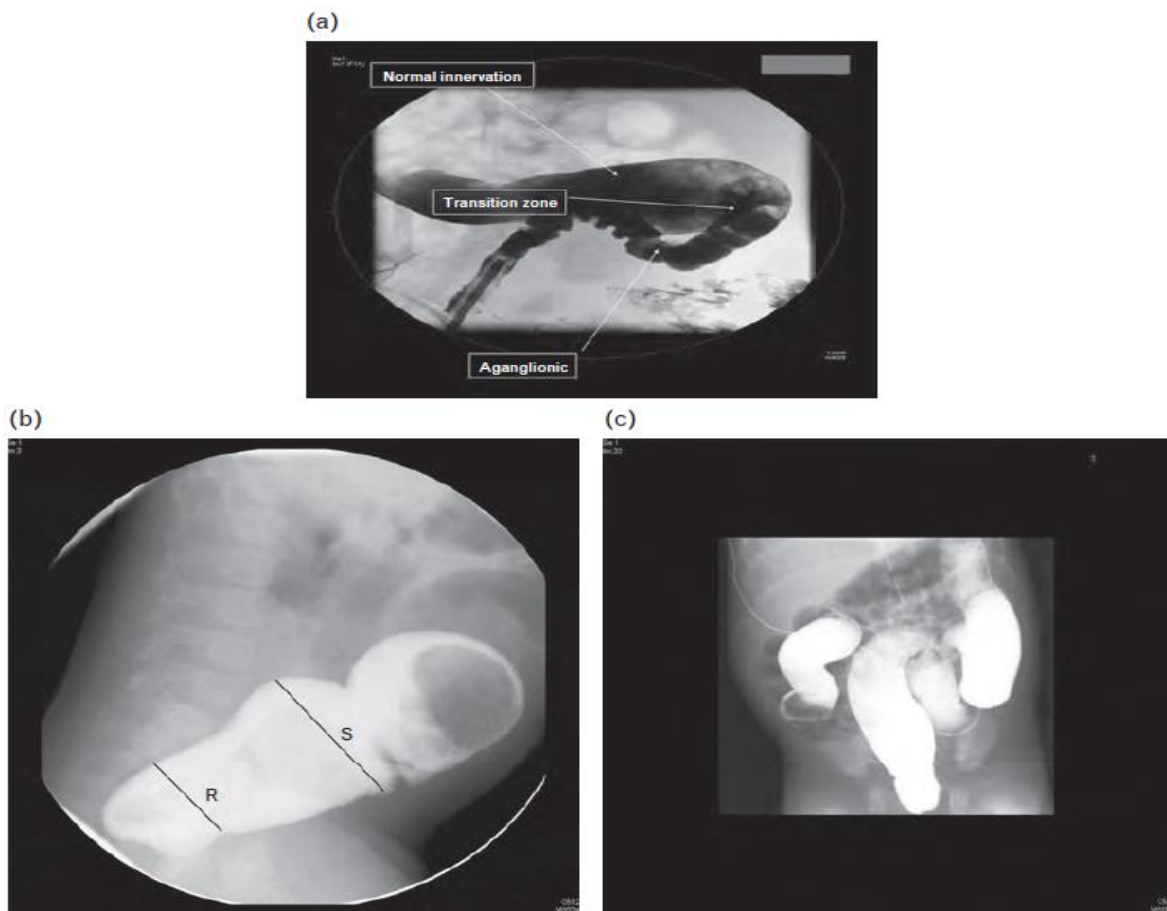
#### **4.1.3 Diagnóstico**

La enfermedad tiene una expresión clínica amplia que incluye un fenómeno de obstrucción intestinal distal neonatal (vómito, distensión abdominal y ausencia de deposición de meconio en las primeras 24 horas), enterocolitis y estreñimiento crónico en niños mayores (1) (2) (5).

La mayoría de los niños con enfermedad Hirschsprung presentan signos de obstrucción intestinal, caracterizada por distensión abdominal, vómito bilioso e intolerancia a la alimentación (1). El retardo en el paso de meconio (más allá de las 24 horas), es un hallazgo característico; sin embargo, no se presenta en el 10% de los casos (1) (2). Otros pueden presentar perforación intestinal o del apéndice como evento inicial (1).

La expresión en imágenes diagnósticas, generalmente colon por enema, es la presencia de una zona de transición, definida como una región de intestino marcadamente dilatada que se encuentra en vecindad del segmento agangliónico

(ver imagen 1) (1) (5). Existen situaciones que limitan la observación de la zona de transición: Presencia de colitis (el más común), uso de una técnica radiológica inadecuada, preparación inadecuada y enfermedad de Hirschsprung total, adicionalmente, hasta el 75% de los casos no presentan zona de transición (6). En 12% de los casos esta zona de transición imagenológica no coincide con la zona de transición histopatológica (2). Un diagnóstico radiológico adecuado disminuye las complicaciones intraquirúrgicas y postquirúrgicas (6).



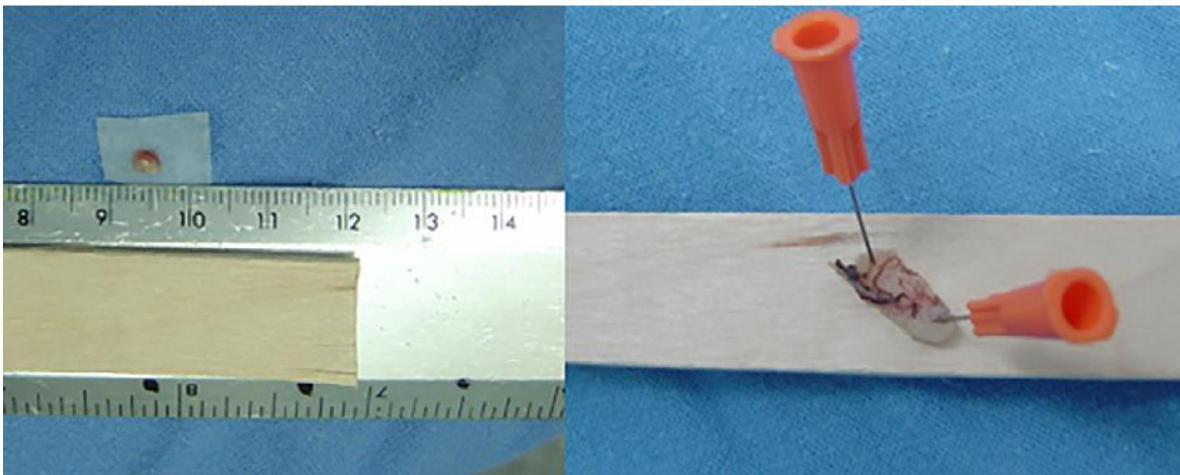
**Imagen 1.** A) Enema con contraste soluble en agua que muestra una zona de transición en la flexura esplénica B) La vista lateral es la más importante para identificar la zona de transición. En este caso, la relación del diámetro del recto y el diámetro de rectosigmoide (índice rectosigmoide), es menor a 1 C) Retención del contraste en una imagen 24 horas posterior. Imagen tomada de: Langer J. Hirschsprung disease. *Current Opinion in Pediatrics*. 2013;25(3):368-374.

Existen otros medios diagnósticos como la manometría anorrectal (sensibilidad 91% especificidad 94%), que permite identificar la ausencia de relajación involuntaria del esfínter anal interno en pacientes con aganglioneosis; y que constituye un medio diagnóstico de tamización (5).

El estándar de oro diagnóstico es el examen histopatológico de la biopsia de recto, que tiene una sensibilidad de 93% y especificidad de 98% (2) (5) (6). La valoración

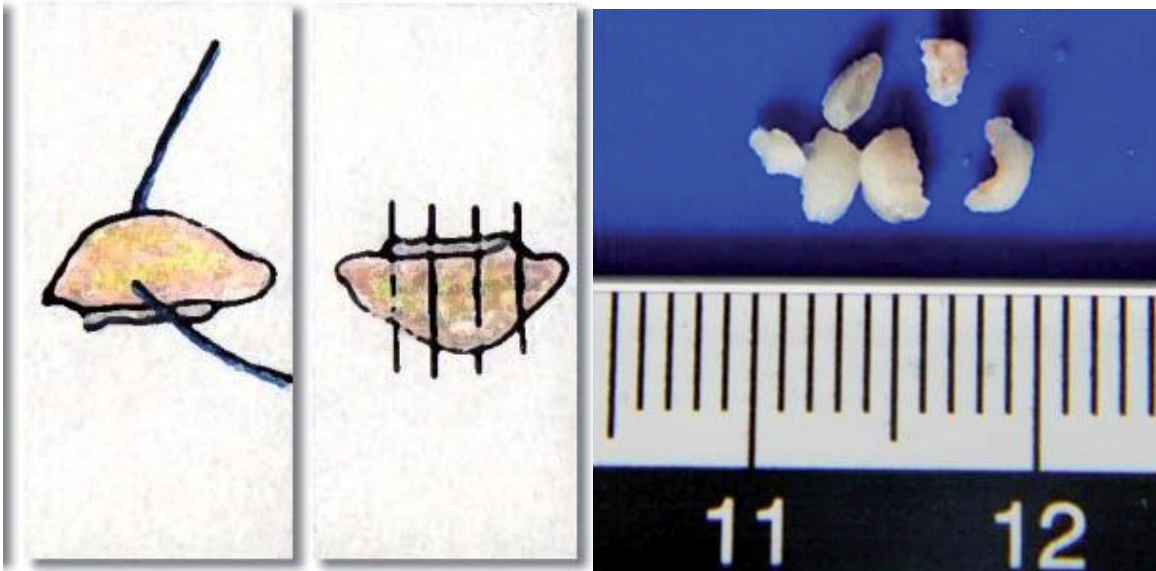
prequirúrgica comúnmente se hace en muestras incluidas en parafina (2). El diagnóstico se establece por la ausencia de células ganglionares en los plexos nerviosos del recto; la presencia de células ganglionares en el colon no descarta la enfermedad (5) (6). Por lo general la hematoxilina eosina es suficiente para hacer el diagnóstico, sin embargo, ocasionalmente es necesario recurrir a herramientas como la histoquímica o inmunohistoquímica para esclarecer casos en que la morfología no es suficiente (3) (5) (6).

La biopsia rectal es tomada usando herramientas de succión o quirúrgicamente por vía transanal, e idealmente, debe ser tomada 3 cm por encima de la línea dentada (6). Es de vital importancia que, tras extraer el espécimen, el cirujano se cerciure de que existe una cantidad adecuada de submucosa (ver imagen 2) (6). La muestra obtenida debe ser enviada al laboratorio de patología, fijándose de inmediato en formol al 10%; se puede poner la muestra en un papel filtro, con la superficie mucosa hacia el papel (6). El medio de transporte dependerá de los estudios que se planee realizar, sin embargo, se debe tener presente nunca usar solución salina (6). Lo recomendado es tomar biopsia de al menos 3 niveles (puede oscilar de acuerdo con protocolos institucionales), cada uno apropiadamente marcado indicando a qué distancia de la línea pectínea fue tomado (3).



**Imagen 2.** En la imagen se observa una biopsia rectal obtenida por succión. Muestra una adecuada cantidad de submucosa, tejido blanquecino que puede diferenciarse de la mucosa, que tiene un tono rojizo. El tamaño de la biopsia oscila entre 3 a 5 mm. Es recomendable fijar el espécimen plano en una pieza de madera o plástico. Imágenes tomadas de: De La Torre L, Wehrli L. Error traps and culture of safety in Hirschsprung disease. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2019;28(3):151-159

Una vez en el laboratorio de patología, el patólogo debe orientar y cortar los especímenes de manera adecuada, garantizando que al incluir el tejido se obtenga una adecuada representación de la submucosa (3). Con el fragmento de tejido orientado de manera que la submucosa mire hacia el papel, se realizan cortes paralelos por el eje menor, cada uno a 1 mm de distancia (ver imagen 3 y 4) (3).



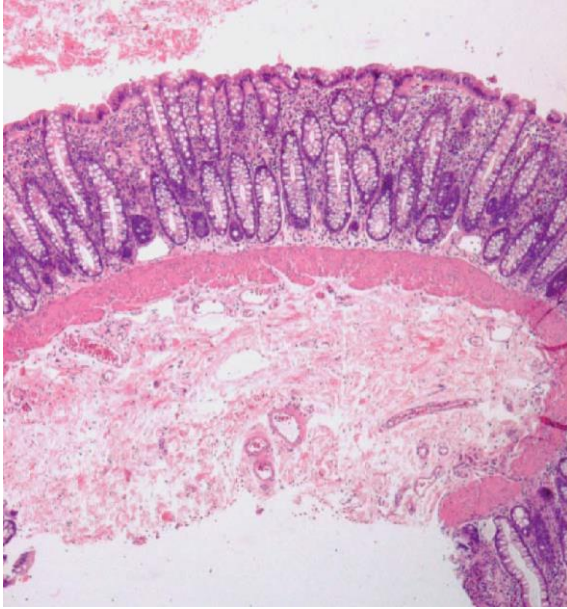
**Imágenes 3 y 4.** A la izquierda la manera como se reciben las muestras cuando se realizan por vía endorrectal. Con la mucosa mirando hacia el papel, se realizan cortes paralelos obteniendo fragmentos como los que se observan a la derecha. Imagen tomada de: Jaramillo Barberi Lina Eugenia. Diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en biopsias de mucosa-submucosa del recto: una propuesta de trabajo. Rev Col Gastroenterol [Internet]. 2011 Dec; 26(4): 277-284. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en).

Posteriormente, se solicita al histotecnólogo realizar un seriado que oscile (de acuerdo con protocolos nacionales e institucionales), entre 50 y 100 cortes, que serán teñidos con hematoxilina eosina (3). Es importante ordenar el seriado desde el principio, evitando así que se desperdicie tejido al montar varias veces el bloque (ver imagen 5) (3). Generalmente queda un pequeño remanente de tejido en el bloque, este puede ser utilizado para continuar el seriado o realizar inmunohistoquímica (3).



**Imagen 5.** Se observa en dos láminas el seriado de dos fragmentos de tejido. Imagen tomada de: Jaramillo Barberi Lina Eugenia. Diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en biopsias de mucosa-submucosa del recto: una propuesta de trabajo. Rev Col Gastroenterol [Internet]. 2011 Dec; 26(4): 277-284. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en).

El estudio histológico debe realizarse de manera cuidadosa, garantizando una evaluación cuidadosa de todos los cortes antes de hacer la aseveración de que no existen células ganglionares en la muestra (3). Es importante determinar si la biopsia obtenida es adecuada a nivel histológico (ver imagen 6) (3).



**Imagen 6.** Biopsia adecuada. La suma del espesor de la mucosa y la muscular de la mucosa es igual al espesor de la submucosa (H & E 40X) Jaramillo Barberi Lina Eugenia. Diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en biopsias de mucosa-submucosa del recto: una propuesta de trabajo. Rev Col Gastroenterol [Internet]. 2011 Dec ; 26(4): 277-284. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en).

Si se observan células ganglionares, aún en sitios que no parecen corresponder a plexos, el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung es automáticamente descartado (3) (6). El diagnóstico de innervación normal es el más fácil de establecer, es el más frecuente y por lo general la revisión de pocos niveles es suficiente para confirmarlo (3).

Los hallazgos histológicos dependen de la longitud del segmento afectado; así, la Enfermedad de Hirschsprung de segmento corto mostrará filetes nerviosos gruesos, grandes y aumento de la densidad estructural, producto del reemplazo de las células gliales por las células de Schwann, que se hipertrofian y otorgan un aspecto similar al de un nervio periférico; este hallazgo es raro cuando el segmento agangliónico es mayor de 15 cm (3)(6)(7). La enfermedad de segmento largo (predominantemente la aganglionosis total de colon), mostrará una disminución o casi ausencia de plexos; en estos casos la correlación con los hallazgos clínicos e imagenológicos es vital (3).

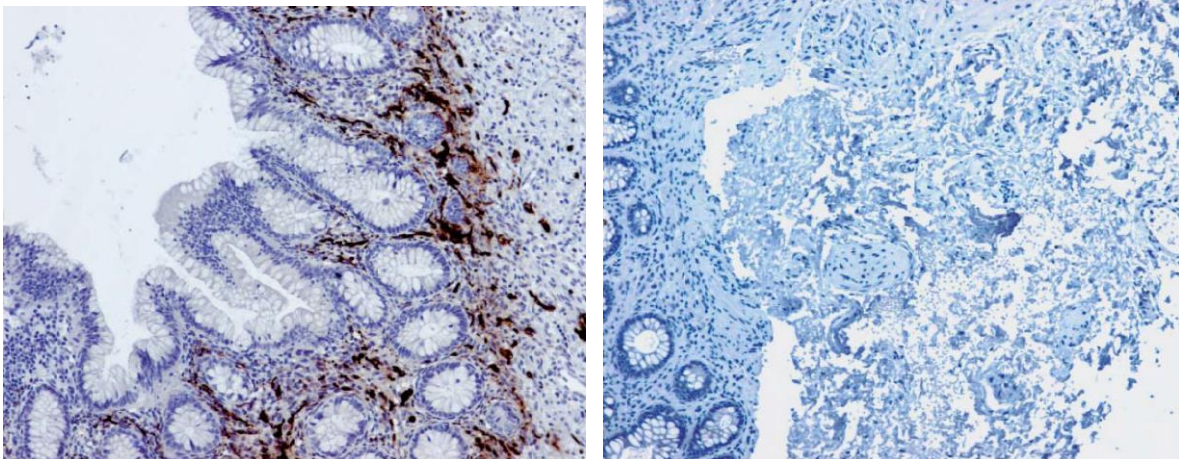
Hallazgos como filetes nerviosos pequeños, escasos o laxos pueden poner en duda el diagnóstico de esta enfermedad, y es en estos casos que es válido considerar diagnósticos diferenciales, dentro de estos se encuentra la Displasia Neuronal

Intestinal (diagnóstico controversial) que nunca debe hacerse en menores de un año (3).

El uso de histoquímica e inmunohistoquímica está orientado a identificar cuerpos neuronales (o sus proyecciones), en aquellos casos cuyo diagnóstico certero no se pudo obtener en la hematoxilina eosina (6). Es importante tener en cuenta que debe ser usado cuando exista duda si la célula observada corresponde a una célula ganglionar inmadura (3). Dentro de los marcadores disponibles se encuentra la acetilcolinesterasa, la calretinina, colina, NSE, BCL 2, entre otros (3) (6).

En un rectosigmoides normalmente innervado, no se observa o se observa una escasa marcación por histoquímica para acetilcolinesterasa en la muscular de la mucosa (4). En nuestro país no se cuenta con esta histoquímica, prueba que es considerada de gran importancia en el diagnóstico intraoperatorio (3).

La calretinina es una proteína ligadora de calcio involucrada en vías de señalización (3). El uso de inmunohistoquímica para esta proteína tiñe los núcleos y las proyecciones de las células ganglionares (3)(7). En los pacientes con enfermedad de Hirschsprung se obtendrá un patrón negativo o débilmente positivo (ver imagen 7) (3).



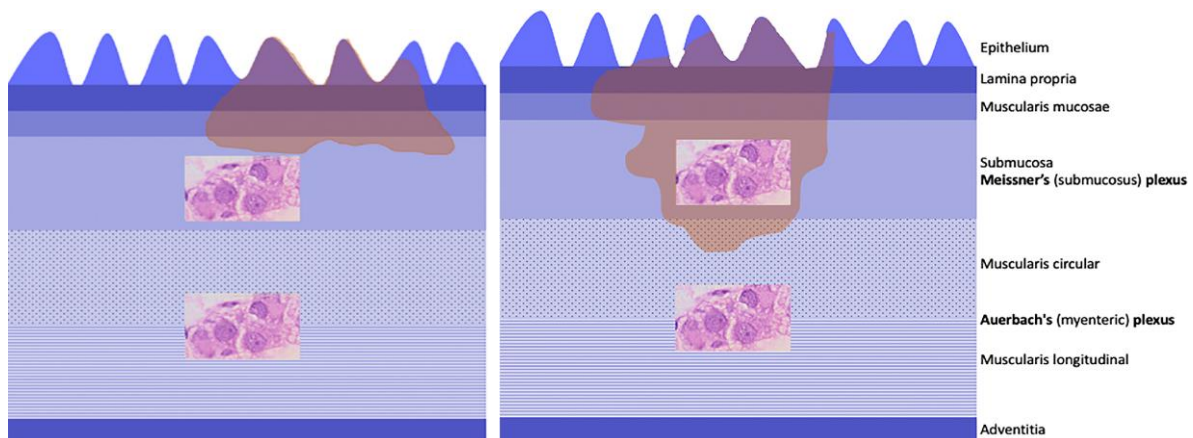
**Imagen 7.** A la izquierda se observa patrón de marcación con calretinina obtenida en un paciente con innervación normal. Existe positividad en lámina propia, muscular de la mucosa y plexo de Meissner. A la derecha, patrón de marcación en paciente con enfermedad de Hirschsprung. No existe marcación positiva en lámina propia, muscular de la mucosa o plexo de Meissner. (Calretinina 100X). Imagen tomada de: Jaramillo Barberi Lina Eugenia. Diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en biopsias de mucosa-submucosa del recto: una propuesta de trabajo. Rev Col Gastroenterol [Internet]. 2011 Dec ; 26(4): 277-284. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en).

El proceso diagnóstico está sujeto a errores que redundan en intervenciones innecesarias con morbilidad asociada, o desarrollo de las complicaciones asociadas con la enfermedad (6). Los errores pueden ser cometidos en la toma de la biopsia, el procesamiento macroscópico o en la interpretación del material histológico (6).

- Errores cometidos en la toma de biopsia

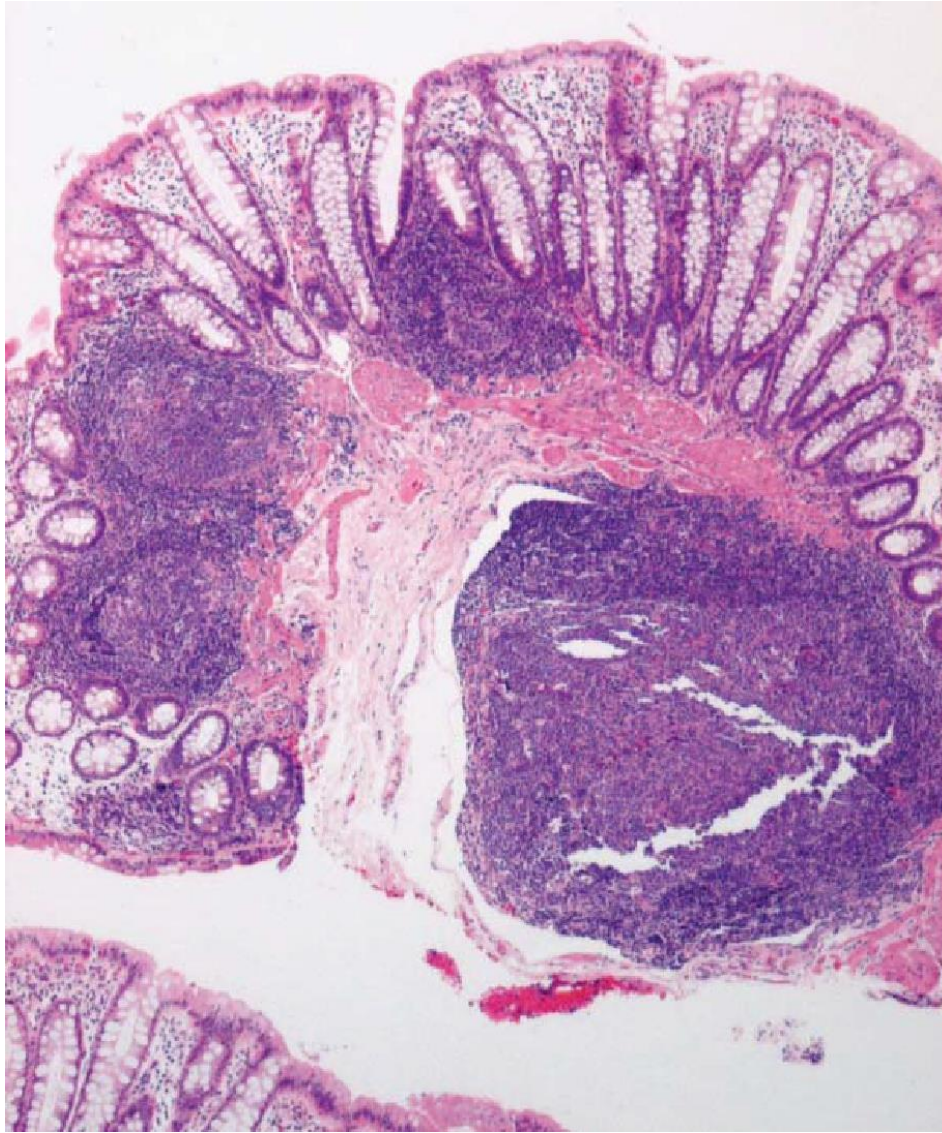


1. Toma de muestra de la piel, el anodermo o el área pectínea, que son zonas por lo general aganglionares (3) (6). También puede ocurrir que se tome una muestra del ano y no del recto producto de no tener en cuenta la longitud del ano, o el estiramiento de la mucosa al momento de introducir el instrumento (6). Si no se observan células ganglionares y se observa epitelio escamoso o fibras musculares del esfínter, se trata de una biopsia obtenida debajo de la línea pectínea y debe informarse como inadecuada para el diagnóstico (3).
2. Toma de una biopsia superficial, sin submucosa o con submucosa insuficiente, que pueden derivar en diagnóstico de aganglionirosis (ver imagen 8) (6).



**Imagen 8.** Comparación entre una biopsia inadecuada (izquierda) y biopsia adecuada (derecha). La biopsia inadecuada incluye mucosa y una pequeña porción de submucosa. La biopsia adecuada posee una cantidad suficiente de submucosa (tamaño ideal de 2-3 mm). En esta será evaluado el plexo de Meissner. Dependiendo de la profundidad podría llegar a valorarse también el plexo de Henle (3). Imágenes tomadas de: De La Torre L, Wehrli L. Error traps and culture of safety in Hirschsprung disease. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2019;28(3):151-159.

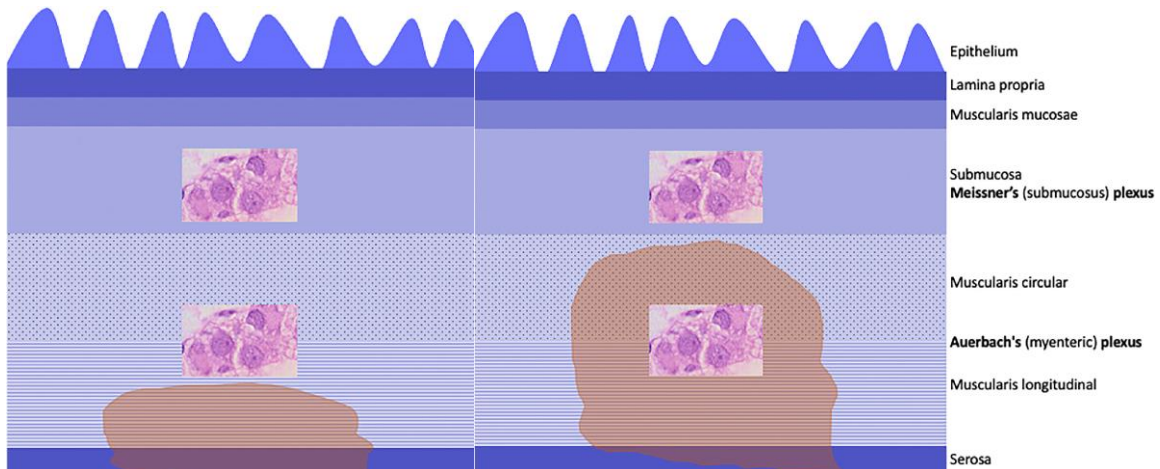
3. Toma de biopsia en zonas donde existen agregados linfoides. Zonas de la mucosa que muestran una apariencia micronodular, reflejan por lo general la existencia de agregados linfoides que ocupan la submucosa, desplazando el plexo submucoso en profundidad y a menudo dejándolo fuera de la biopsia (ver imagen 9) (3).



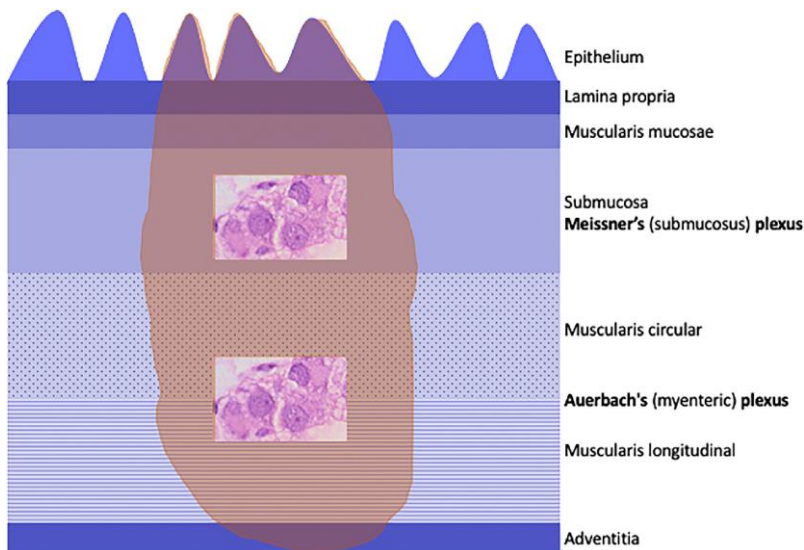
**Imagen 9.** La submucosa se halla ampliamente ocupada por un folículo linfoide. No se observan plexos para evaluar. Imagen tomada de: Jaramillo Barberi Lina Eugenia. Diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en biopsias de mucosa-submucosa del recto: una propuesta de trabajo. Rev Col Gastroenterol [Internet]. 2011 Dec ;26(4): 277-284. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en).

4. Toma de biopsia de porción no afectada en Hirschsprung de segmento corto. En un neonato con obstrucción intestinal distal, debe sospecharse siempre enfermedad de Hirschsprung y tener presente la afectación rectal en todos los casos (6). Cuando existe obstrucción intestinal más allá del sigmoide distal, se puede ver una dilatación colónica marcada, sin que sea fácil identificar una zona de transición (6). Puede suceder que, en procedimientos de emergencia realizados a estos pacientes, se tome una biopsia del colon, pero no del recto, dando como resultado un diagnóstico errado de inervación adecuada (6).

5. La toma de biopsia por vía laparoscópica o mediante laparotomía está también sujeta a errores que podrían llevar a un diagnóstico errado de aganglionosis (ver imágenes 10 y 11) (6).



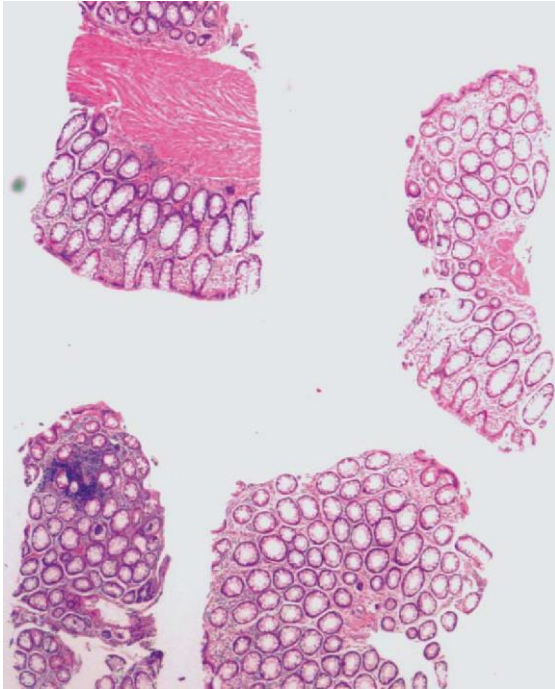
**Imagen 10.** Comparación entre biopsia inadecuada (izquierda) y biopsia adecuada (derecha) obtenidas por vía laparoscópica o abierta. La muestra inadecuada incluye únicamente serosa y la capa longitudinal de la muscularis propia. La muestra adecuada contiene las capas longitudinales y circular de la muscularis propia garantizando así la inclusión del plexo de Auerbach (el cual se encuentra entre las dos). Imágenes tomadas de: De La Torre L, Wehrli L. Error traps and culture of safety in Hirschsprung disease. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2019;28(3):151-159.



**Imagen 11.** Biopsia de espesor completo. Estas biopsias incluyen tanto el plexo de Meissner como el de Auerbach y son las recomendadas para estudio intraoperatorio. Las células ganglionares del plexo de Auerbach son identificadas con mayor facilidad que las del plexo de Meissner. Imágenes tomadas de: De La Torre L, Wehrli L. Error traps and culture of safety in Hirschsprung disease. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2019;28(3):151-159.

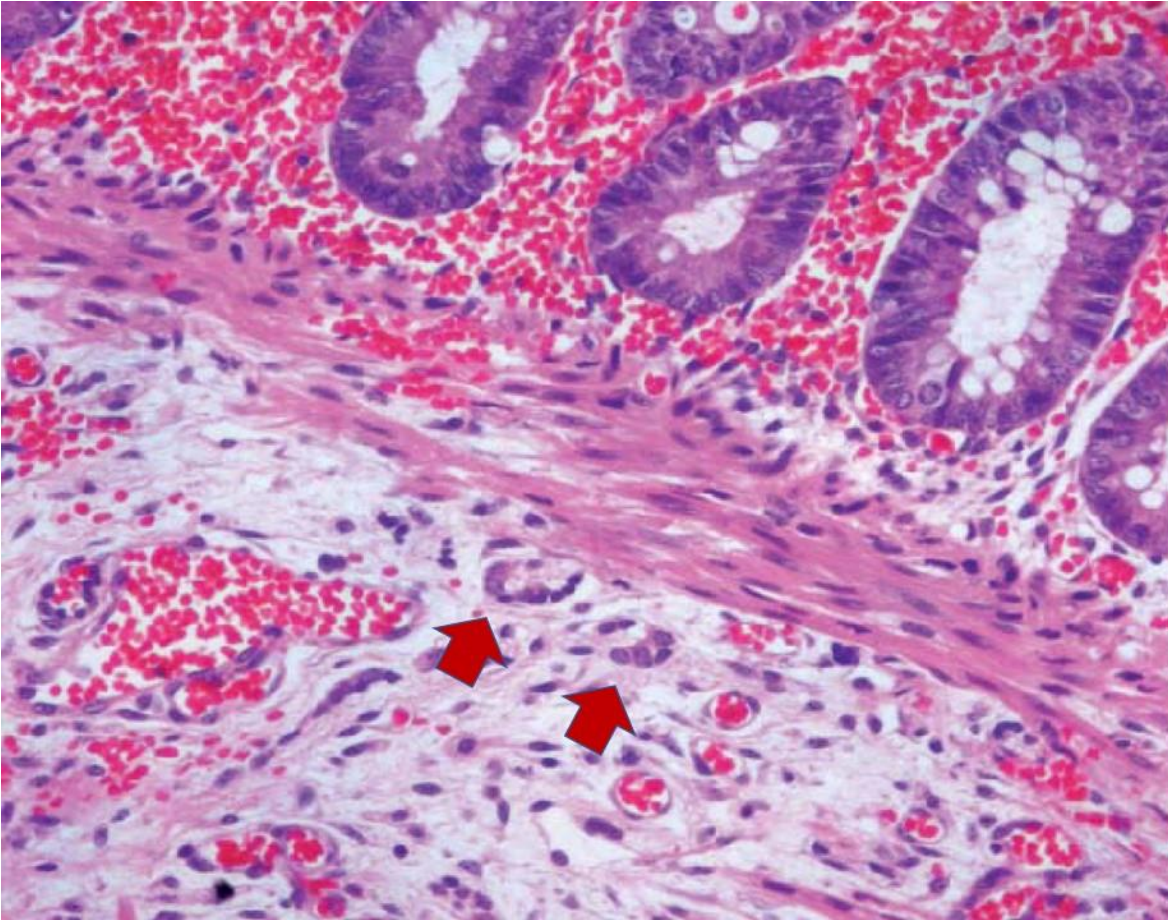
- Errores cometidos durante el procesamiento macroscópico

Si la orientación y corte del espécimen no se realizan de manera adecuada, se obtendrán inclusiones oblicuas, donde existe una pobre representación de la submucosa (ver imagen 12) (3).



**Imagen 12.** Material inadecuado para estudio de inervación. No existe adecuada representación de la submucosa; se observan únicamente mucosa y muscular de la mucosa. Imagen tomada de: Jaramillo Barberi Lina Eugenia. Diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en biopsias de mucosa-submucosa del recto: una propuesta de trabajo. Rev Col Gastroenterol [Internet]. 2011 Dec [cited 2020 Aug 28]; 26(4): 277-284. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en).

- Errores cometidos durante el examen histológico  
Incapacidad para reconocer células ganglionares inmaduras (3). Se debe tener presente la morfología de las células ganglionares inmaduras, predominantemente en neonatos; su morfología es diferente a la de las células ganglionares maduras, y la incapacidad para reconocerlas puede llevar a un diagnóstico errado de aganglionosis (3) (Ver imagen 13).



**Imagen 13.** Las células ganglionares inmaduras se observan agregadas en estructuras rosetoides, con escaso neuropilo. Son células más pequeñas que las neuronas maduras, con un núcleo más basófilo, nucleolo no tan prominente y citoplasma elongado, más pequeño y de color gris azulado. Las flechas señalan 2 grupos de células ganglionares inmaduras. Imagen tomada de: Jaramillo Barberi Lina Eugenia. Diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en biopsias de mucosa-submucosa del recto: una propuesta de trabajo. Rev Col Gastroenterol [Internet]. 2011 Dec [cited 2020 Aug 28]; 26(4): 277-284. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en).

Las biopsias intraoperatorias se realizan con el fin de confirmar la presencia de células ganglionares en el intestino con el que será realizado la anastomosis (6). Por lo general, estas biopsias son seromusculares, y la evaluación se hace por congelación (2).

Se ha propuesto la presencia de una zona de “transición histológica”, de longitud menor a 5 cm, en la que converge un número escaso o inadecuado de células ganglionares, con troncos nerviosos hipertróficos y con fibrosis densa a su alrededor (gangliosclerosis) (4) (6) (7). Sin embargo, no existen actualmente criterios de definición suficientemente respaldados por la evidencia y de aceptación generalizada (6) (7). Esta zona de transición sería la responsable de la presentación de obstrucción postoperatoria; de manera que, ante el hallazgo de una zona de transición, la recomendación es realizar la anastomosis a 5 cm del sitio donde fue realizada la muestra (4) (6) (7).

#### 4.1.4 Tratamiento

El tratamiento definitivo es quirúrgico, y se establece con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes, evitando a su vez las complicaciones (1) (2) (5). La intervención se realiza por vía abierta o laparoscópica, y puede acompañarse de colostomía o ileostomía previas (5). La intervención consiste, en resumidas cuentas, en reseca el fragmento agangliónico y, posteriormente, unir un segmento con adecuada inervación al extremo distal (2).

En el caso de pacientes con abdomen agudo, la laparotomía se considera la opción más adecuada para resolver la urgencia abdominal, en este caso se requiere claridad sobre la ubicación de la zona de transición por lo que es necesaria la disponibilidad de un patólogo durante el procedimiento (5). Se busca la zona en que haya una inervación normal, la cual constituye el sitio adecuado para realizar la derivación intestinal (5). Se debe tener presente que, en el caso de realizar enterostomías, siempre se debe tener seguridad de la presencia de células ganglionares en el extremo proximal antes de cerrarla (6).

Las irrigaciones colorrectales cumplen el papel de mantener el colon desobstruido hasta que la cirugía correctiva sea realizada, además de permitir la realización de la biopsia rectal (6). La frecuencia con que se realizan, y el volumen de solución salina usada varían caso a caso (6). Si las irrigaciones no se hacen de manera adecuada, los pacientes pueden desarrollar colitis subclínica, cuyo progreso llega a amenazar la vida (6). Se debe verificar, a través de vigilancia clínica (apetito, ganancia de peso, palpación abdominal), y radiológica, que las irrigaciones colorrectales sean realizadas adecuadamente (6).

Para el manejo de la enfermedad de Hirschsprung total se combina la motilidad normal del segmento de intestino normogangliónico (generalmente íleon), con la capacidad de un segmento intestinal distal de absorber agua (funcionando este último como reservorio de heces sólidas) (5). Se realiza la resección del colon y descenso del íleon, con anastomosis íleo-rectal 2 cm arriba de la línea pectínea, con el propósito de conservar el mecanismo de continencia fecal (5). El entrenamiento fecal debe iniciarse pocos días después de la operación (5).

Es importante que el procedimiento realizado conserve el canal anal y 1-2 cm de recto con el fin de garantizar la continencia (6). El riesgo de daño se da principalmente en el abordaje transanal, pues a diferencia de las técnicas realizadas por laparotomía, este abordaje no requiere prolapso del recto y dificulta por tanto la identificación del canal anal (6).

Dentro de las complicaciones asociadas con la cirugía encontramos: prolapso o estenosis de los estomas, dermatitis perianal, infección de sitio operatorio,

atresias/estenosis de la anastomosis, destrucción del canal anal, incontinencia fecal permanente y enterocolitis post operatoria (mayor ocurrencia en aquellos con aganglioneosis colónica total) (5). De igual manera, puede suceder que no se retire por completo el segmento agangliónico (aganglioneosis residual), con persistencia de los síntomas; y, dependiendo de la presencia y severidad de las adherencias, puede ser imposible realizar una nueva intervención, haciendo necesario en algunos casos colostomía permanente (2) (7).

Hacer un diagnóstico errado de enfermedad de Hirschsprung, además de no solucionar la patología del paciente deriva en complicaciones quirúrgicas con importante morbimortalidad asociada (3).

## **4.2 Patología digital**

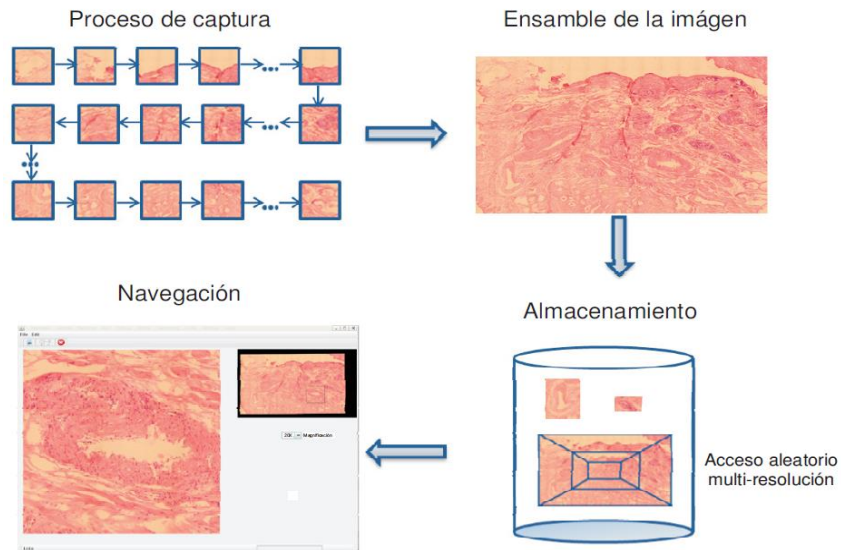
La patología digital abarca el proceso de digitalización, almacenamiento, visualización y análisis de láminas de histopatología usando herramientas computacionales (8). Se trata de una disciplina relativamente reciente, cuyo desarrollo ha sido liderado por ingenieros y científicos expertos en el manejo de datos (8). Su uso, asociado con la inteligencia artificial, se ha orientado a aumentar la exactitud diagnóstica, y a hallar nuevos biomarcadores que sean útiles para la oncología de precisión; siendo tanto los patólogos como los oncólogos los usuarios finales de estos avances (8).

### **4.2.1 Microscopía virtual**

Un microscopio es un sistema óptico capaz de convertir un objeto en una imagen, simultáneamente amplificando sus características (9). Un microscopio virtual es un sistema cuyo objetivo es la simulación del uso de un microscopio de luz, permitiendo la visualización de una placa virtual almacenada en un computador o un dispositivo de visualización (9)(10)(11). Surge como una alternativa para permitir enseñanza, asesoría/consulta en tiempo real, investigación, transporte, y uso de herramientas informáticas a partir de las imágenes digitalizadas (9) (10) (11) (15).

El desarrollo de los escáneres para generar WSI (Whole slide images por sus siglas en inglés, representan la totalidad de la lámina histológica), ha permitido el desarrollo de la histomorfometría cuantitativa, un abordaje que permite hacer valoraciones de características espaciales (textura, forma, arquitectura), de las neoplasias, a partir de láminas teñidas con hematoxilina eosina, histoquímica o inmunohistoquímica, esto es directamente dependiente del desarrollo de algoritmos que permitan la segmentación de las características de interés (15).

La microscopía virtual involucra procesos adicionales a los necesarios para la microscopía convencional, dentro de ellos se encuentran: Construcción de placas virtuales, almacenamiento y diseño de herramientas de visualización (ver imagen 14) (9).



**Imagen 14.** Resumen de los pasos necesarios para la construcción de una placa virtual. Imagen tomada de: Marín, D., & Romero, E. (2011). Sistemas de microscopía virtual: análisis y perspectivas. *Biomédica*, 31(1), 144-55.

El primer paso para la construcción de la placa virtual es la adquisición (9). Esta se realiza mediante un barrido en gran aumento (20x-40x), con tomas secuenciales, cuyo número dependerá del aumento utilizado y el tamaño del área de interés (10) (9). Este proceso es realizado por un microscopio robotizado que incluye: cámara acoplada (cuyas características variarán de acuerdo con las necesidades en cada caso), y un sistema que permite la movilización de la platina del microscopio, ambos conectados a un computador que orienta los movimientos y almacena las imágenes obtenidas (9)(10). La velocidad del proceso de captura depende de una serie de factores como el tamaño del área de interés, el aumento utilizado, la resolución de la cámara, el modelo de placa motorizada, el número de enfoques y la velocidad de transmisión de los datos desde la cámara al computador (9) (10). Parámetros como la resolución y la visualización variarán de acuerdo con las características de cada caso, y estarán determinados por las características del sistema, como la apertura del objetivo o el condensador, las características del sistema de captura, entre otros (9).

El siguiente paso es el de ensamble de las placas virtuales. El resultado es una imagen a color (por lo general 24 bits por píxel), correspondiente a toda la preparación, y cuya dimensión llega a ser de muchos miles de pixeles tanto de alto



como de ancho, con pesos de archivo que oscilan desde 50 Mb hasta 10 Gb (9) (10). El almacenamiento debe tener en cuenta las características del flujo de trabajo en el contexto en que serán usadas las imágenes (9) (10). Los casos (compuestos por varias láminas), pueden llegar a tener pesos bastante elevados; esto, aunado a que se debe garantizar que la información almacenada se conserve intacta hace, necesarios sistemas de almacenamiento adecuadamente diseñados con buenas tasas de compresión y permitir un acceso eficiente a los datos de la imagen; garantizando al mismo tiempo la calidad (9) (10). Para que el almacenamiento sea eficiente, las imágenes son almacenadas en un formato comprimido, por lo general JPEG o JPEG2000; que puede reducir de manera importante el tamaño de la imagen (10).

Las imágenes comprimidas asociadas con un caso son almacenadas en un servidor, por lo general conectado a la plataforma de escaneo, bien por vía directa o a través de redes de alta velocidad (10). Generalmente, estos sistemas funcionan en una interacción cliente/servidor, en la que el usuario, mediante una interfaz gráfica conectada a la red, accede a las imágenes que se encuentran almacenadas en un servidor, con la posibilidad de realizar anotaciones, almacenar regiones, entre otras (9) (10) (11).

La Asociación de Patología Digital propone la valoración de 3 características para validar el grado de comparabilidad entre la evaluación de una imagen de patología digital y la microscopía de luz (11):

- 1) Incluir una representación lo suficientemente extensa de todos los sistemas orgánicos, tipos de tejido y sus componentes celulares.
- 2) Asegurar que los procesos patológicos básicos puedan ser identificados en las imágenes digitalizadas.
- 3) Confirmar que los cambios histológicos claves vistos en microscopía de luz, pueden ser valorados en patología digital.

Se hace vital el desarrollo de los escáneres digitales, buscando lograr tiempos de digitalización menores (8). Una vez hecha universal la presencia de estos escáneres en los hospitales, el uso de la Inteligencia Artificial (IA) probablemente esté basado en aplicaciones, con integración de la información en la nube, permitiendo compartir las imágenes y las predicciones obtenidas (8). Otros problemas que es necesario resolver en el corto plazo son la velocidad de visualización e interpretación, costos elevados, aspectos regulatorios y aspectos técnicos relacionados con la variación en la calidad de las láminas histológicas (ejemplo, grosor de extendidos de citología) (11).

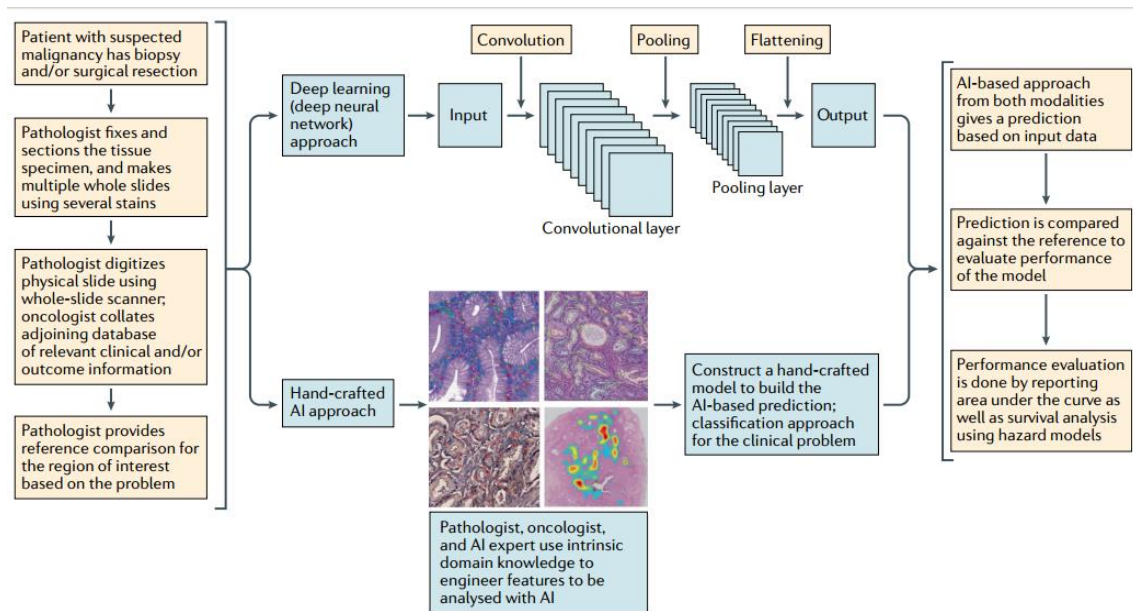
### **4.3 Inteligencia artificial, Aprendizaje de máquina y aprendizaje profundo (Deep learning) en patología digital**

El proceso diagnóstico realizado por los patólogos se ve limitado por la subjetividad, diferencias en percepción visual, integración de datos y la capacidad de juicio, aún a pesar de la existencia de herramientas que buscan estandarización (guías, criterios diagnósticos, etc.) (8). Estas diferencias pueden derivar en inconsistencias diagnósticas y un cuidado subóptimo del paciente (8). No ha sido posible solucionar este problema con herramientas de análisis molecular, pues, aun cuando son más objetivas, tienen limitaciones asociadas, como diferencias en los kits y los biomarcadores utilizados; además de la variada interpretación (8). Por otro lado, los procedimientos mínimamente invasivos no han facilitado el trabajo de los patólogos, pues las muestras han disminuido tanto su tamaño como su calidad; sin embargo, se les exige diagnósticos cada vez más refinados, reportando una cantidad cada vez mayor de factores con valor predictivo o pronóstico (8).

El término “Inteligencia artificial” (IA), fue introducido por McCarthy en los 50’s, refiriéndose a la rama de la computación en la cual se realizan aproximaciones a problemas usando máquinas, con el objetivo de realizar predicciones (8).

La IA ha sido aplicada de variadas maneras en patología digital, por ejemplo, simplificar tareas repetitivas (liberando a los patólogos para enfocarse en decisiones más complejas); organizar de acuerdo con su prioridad o dificultad los casos del patólogo; detección y segmentación de objetos; valoración de características morfológicas con implicaciones diagnósticas, pronósticas y de respuesta al tratamiento; y se ha propuesto incluso usarla para convertir láminas de H&E en láminas de inmunohistoquímica virtuales, lo cual permitiría ahorrar tejido (8) (10).

Las aproximaciones basadas en aprendizaje de máquina implican un “aprendizaje”, producto de la introducción de datos (8). Existen 2 abordajes para utilizar los procesos de aprendizaje de máquina, el primero basado en Deep learning, y el segundo, en el diseño de algoritmos de evaluación de características de manera manual (“Hand-crafted feature-based approaches”) (ver imagen 15) (8).



**Imagen 15.** Tomando como base el procesamiento macroscópico, la inclusión, tinción, digitalización de las láminas, la información clínica del paciente y una imagen de referencia de la región de interés se pueden tomar dos aproximaciones. La primera de ellas basada en Deep learning, la segunda basada en el reconocimiento de características específicas utilizando algoritmos de machine learning. Imagen tomada de: Bera K, Schalper K, Rimm D, Velcheti V, Madabhushi A. Artificial intelligence in digital pathology — new tools for diagnosis and precision oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(11):703-715.

El Deep Learning es un tipo particular de aprendizaje de máquina, basado en redes neurales artificiales que buscan emular la arquitectura neural humana (8) (12) (15). Una red de Deep learning suele incluir múltiples capas de redes neuronales artificiales, incluyendo por lo general una capa de entrada, una de salida y múltiples capas ocultas (8). Las capas ocultas pueden ser usadas para generar nuevas representaciones de la imagen y, con un entrenamiento adecuado, pueden ser utilizadas para identificar las representaciones que distinguen de mejor manera las categorías de interés (8). Usan por lo general una serie de imágenes con etiquetas de clase asociadas (ejemplo, benigno o maligno), y, posteriormente, interrogación de nuevas entradas sin suposiciones previas (8) (15). Los desarrollos recientes han llevado a que las herramientas basadas en este método alcancen desempeños muy sobresalientes en diferentes tareas de reconocimiento en procesamiento de imágenes (14). Ha sido usada en patología, con un desempeño superior en clasificación, segmentación y detección (14) (12).

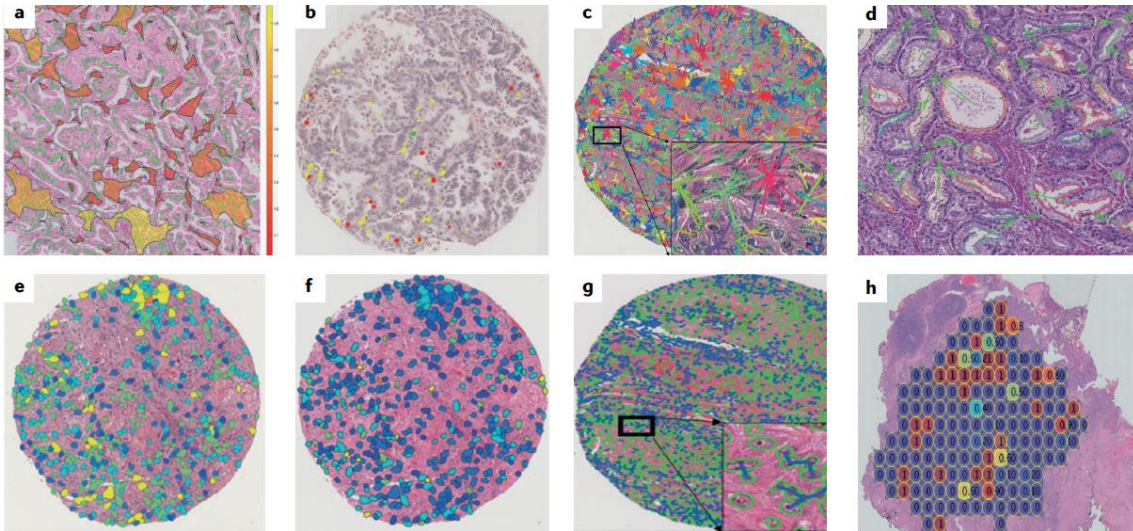
Los abordajes basados en Deep learning han sido usados de manera creciente en los últimos años, dado que no dependen de la elaboración de algoritmos, pueden aprender representaciones directamente desde los datos primarios, su aplicación es más fácil y tienen una alta exactitud (8) (15). Sin embargo, requieren experiencia para la valoración y el etiquetado de los datos con los que es entrenado el modelo (14) (15).

Su implementación en la práctica clínica depende de un mayor entendimiento de su mecanismo de funcionamiento, esto teniendo en cuenta que las herramientas de “Deep learning” han sido vistas como cajas negras, cuyas decisiones tienen una interpretabilidad limitada (8) (15). Con el fin de proveer interpretabilidad biológica se han hecho algunos estudios basados en pruebas post Hoc o modelos supervisados de aprendizaje de máquina, buscando explicar la salida una vez el modelo de Deep Learning ha hecho su predicción; sin embargo, han sido criticados con el argumento de que no debería requerirse modelos adicionales para explicar el funcionamiento de este método (8) (15).

En cuanto a aplicaciones diagnósticas, se ha usado herramientas de Deep learning para realizar conteo de mitosis en neoplasias varias; clasificar imágenes provenientes de especímenes sospechosos, determinar subtipos histológicos y moleculares, objetivar actividad proliferativa y presencia de invasión en cáncer de seno; diferenciación de lesiones benignas y malignas de piel y cabeza y cuello; valoración de retinopatía diabética; análisis de neuroimágenes relacionadas con tumores cerebrales y lesiones asociadas al Alzheimer; asignación automática de Gleason en especímenes de prostatectomía radical; clasificación de lesiones pigmentadas cutáneas; identificar la presencia de PD-L1 en biopsias de carcinoma pulmonar de célula no pequeña; clasificación de núcleos en casos de carcinoma colorrectal; y determinación de la presencia de glomerulos en biopsias renales de ratones (8) (14) (15).

Este abordaje ha demostrado capacidad predictiva en pronóstico: En cáncer de seno para definir riesgo de recurrencia; en cáncer de próstata para seguimiento de biopsias; y en cáncer colorrectal, para identificación de componente estromal para predecir supervivencia libre de enfermedad (8).

La ingeniería basada en características (“Hand crafted AI approach”), es el proceso de diseñar los componentes de algoritmos de aprendizaje de máquina por una de 2 vías: La primera de ellas haciendo uso del conocimiento de patólogos y oncólogos para, manualmente, crear un abordaje basado en la evaluación de una característica (características inspiradas en dominios) (8) (15). Esta vía puede ser usada para crear algoritmos que evalúan características para tumores, órganos o procesos específicos (8) (15). La segunda vía, se basa en la evaluación de características sin conocimiento previo (“domain-agnostic features”) (8) (15). Esta puede evaluar patrones subvisuales como texturas del tejido, distribución espacial, arquitectura o características cuantitativas como el tamaño y la forma nuclear; que pueden ser usados en múltiples enfermedades y tejidos (8) (15). (ver imagen 16)



**Imagen 16.** Representaciones visuales de características evaluadas de manera manual en varios tumores. A) Organización espacial de clústeres de linfocitos infiltrantes de tumor en un caso de carcinoma pulmonar de célula no pequeña (WSI) B) Características desarrolladas usando inmunofluorescencia cuantitativa de subpoblaciones de linfocitos infiltrantes de tumor (incluyendo detección de linfocitos T CD4 y CD8 y linfocitos B CD20) en muestras de Carcinoma de pulmón de célula no pequeña. C) Características reflejando la distribución y entropía de clústeres celulares globales construidos usando especímenes de carcinoma pulmonar de célula no pequeña. D) Características computando la orientación relativa de glándulas presentes en tejido de cáncer de próstata E) Diversidad de textura de núcleos de células tumorales en un carcinoma escamocelular de cavidad oral F) Forma nuclear computada en células cancerosas en un carcinoma orofaríngeo positivo para papilomavirus G) Gráfico de características mostrando las relaciones espaciales de los núcleos de diferentes células neoplásicas en un carcinoma de cavidad oral H) Evaluación de características diseñada de manera manual que evalúa la heterogeneidad celular en un cáncer de seno positivo para receptores de estrógeno. Imagen tomada de: Bera K, Schalper K, Rimm D, Velcheti V, Madabhushi A. Artificial intelligence in digital pathology — new tools for diagnosis and precision oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(11):703-715.

En diagnóstico, se ha usado estas vías para valorar las características histológicas de casos de carcinoma prostático, estableciendo una clasificación entre Gleason de alto y bajo grado; determinación del grado de cáncer de seno usando una combinación de arquitectura nuclear, y la forma y la textura celular (15).

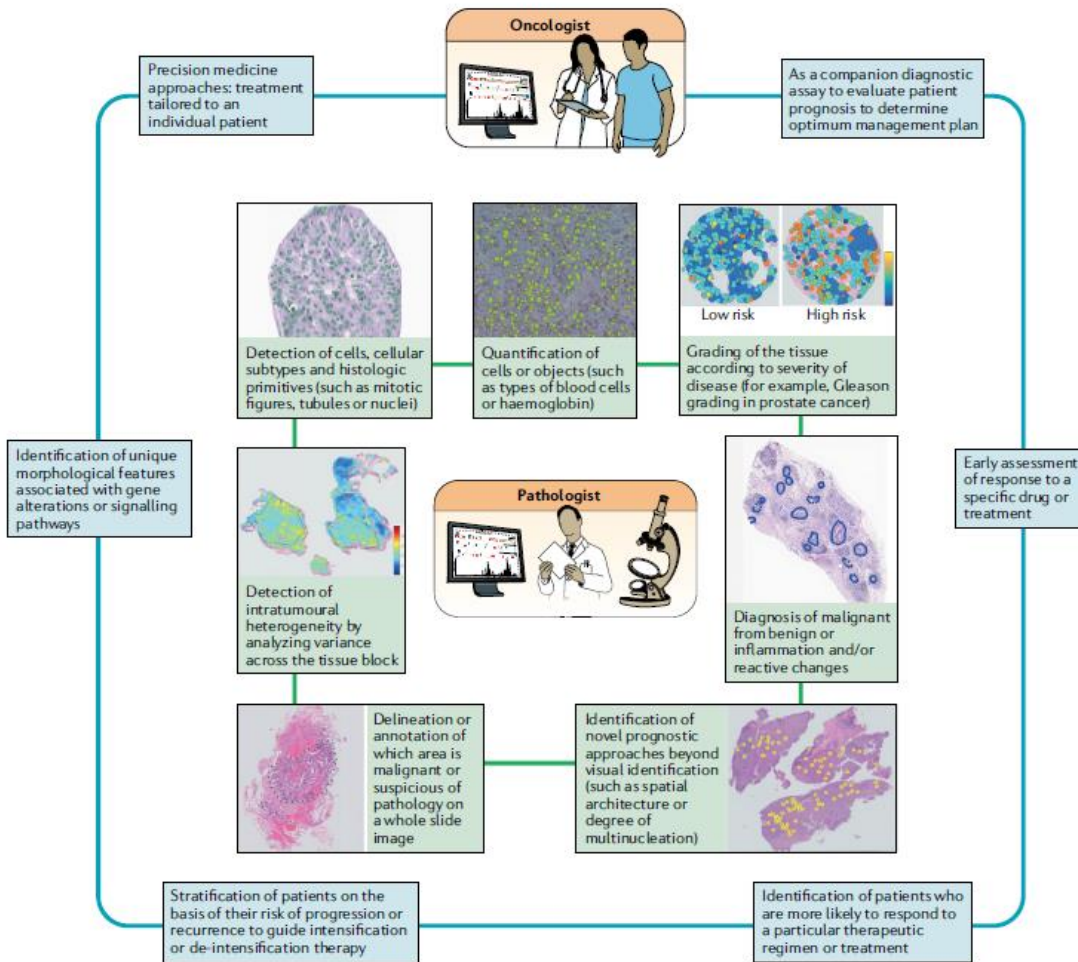
Su potencial como herramienta pronóstica ha sido usado en predicción de supervivencia y riesgo de recurrencia en cáncer de seno valorando por ejemplo las características del estroma tumoral, o formas y texturas de las células; en cáncer de próstata para diferenciar un curso indolente de uno agresivo y predecir la recurrencia bioquímica; en carcinoma escamocelular de cavidad oral para predecir los periodos de supervivencia libre de enfermedad; en carcinoma pulmonar de células no pequeñas se ha usado la organización espacial y la relación con las células neoplásicas de los linfocitos infiltrantes de tumor para predecir desenlaces; y valoración de características nucleares de las células estromales y células epiteliales combinadas para realizar predicciones de progresión y recurrencia en cáncer orofaríngeo y cáncer de próstata (8) (15).

La ingeniería basada en características ha sido utilizada también para descubrir y desarrollar medicamentos, buscando identificar aquellos pacientes que obtendrán

un mayor beneficio de estos (8). Dentro de las características que se han evaluado para este fin se incluyen características nucleares y perinucleares, organización espacial de los núcleos, y distribución espacial de los linfocitos infiltrantes de tumor en carcinoma pulmonar de célula no pequeña (8).

Los modelos de evaluación de características diseñados de manera manual pueden proveer una mayor interpretabilidad dado que son desarrollados en conjunto con expertos del área biológica (8). Sin embargo, estos modelos suelen estar limitados por la nada despreciable inversión de tiempo y esfuerzo por patólogos y oncólogos en su desarrollo (8). En los últimos años han surgido esfuerzos orientados a fusionar estos 2 abordajes, utilizando Deep learning para la detección inicial de células o elementos de interés y, seguidamente, los modelos manuales para predicción, garantizando de esta manera la interpretabilidad biológica (8).

Los abordajes basados en IA deben usarse para integrar el trabajo del patólogo y del oncólogo, cada uno de los cuales tiene papeles tanto en su construcción como en su aprovechamiento (8). El patólogo resulta importante en el etiquetado y la creación de categorías; la segmentación de las células; la identificación del tipo de tejido, estructuras biológicas o regiones de interés; para el entrenamiento de modelos basados en Deep learning; en brindar el conocimiento para estructurar los algoritmos usados en la ingeniería basada en características; y finalmente, en ejercer como estándar de oro diagnóstico (8). Para el oncólogo, la IA puede ser una herramienta útil en la orientación individual del tratamiento, evaluación de características asociadas a pronóstico, estandarización de tratamientos, y permitir la clasificación basada en características morfológicas y genéticas (8). (ver imagen 17)



**Imagen 17.** La inteligencia artificial y las técnicas basadas en Machine Learning complementan la experticia y tienen el potencial de apoyar la labor del patólogo y del oncólogo. Se muestran algunas de las herramientas existentes basadas en IA usadas para analizar imágenes de tumores. Para el oncólogo, los abordajes basados en IA pueden ser usados para ayudar en la toma de decisiones para diferentes aspectos del manejo de los pacientes con cáncer. Imagen tomada de: Bera K, Schalper K, Rimm D, Velcheti V, Madabhushi A. Artificial intelligence in digital pathology — new tools for diagnosis and precision oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(11):703-715.

La IA, por su característica de ser reproducible y robusta, puede constituir una importante herramienta para solucionar los problemas que enfrentan tanto los oncólogos como los patólogos (8). Ya se han realizado comparaciones de la capacidad diagnóstica entre la patología digital y la técnica convencional, demostrando, cuando menos, la no inferioridad de las herramientas de patología digital con respecto a la microscopía tradicional; más aún, se ha demostrado que usados en conjunto pueden mejorar el desempeño diagnóstico (8). El uso de estas tecnologías tiene adicionalmente el potencial de disminuir costos, principalmente comparada con las técnicas moleculares, y preservar una mayor cantidad de tejido (8).

El desempeño de estas herramientas es altamente dependiente de la calidad de los datos y de las imágenes con que sea alimentada; la menor calidad de las imágenes disminuye la capacidad predictiva. (8) Se hace necesario entonces estandarizar la identificación y el etiquetado de áreas de interés en los diferentes tumores incluyendo figuras mitóticas, estructuras glandulares, metástasis ganglionares, etc.; y, de igual manera, las herramientas que serán usadas para hacer esta identificación (8). En este sentido, se han propuesto abordajes utilizando IA para identificar áreas de interés, reduciendo de esta manera la cantidad total de datos escaneados; se han desarrollado también algoritmos de IA para evaluar la calidad de las imágenes, seleccionar las áreas de mayor calidad, y eliminar regiones con artefactos o fuera de foco (8). Otra solución sería establecer un sitio al que serían enviados los bloques de tejido, y allí se harían las láminas y su digitalización, logrando de esta manera disminuir la variación preanalítica (8).

Previo al uso clínico, estas herramientas deben ser sometidas a un proceso de validación usando datos de múltiples instituciones con el fin de garantizar la probabilidad de generalizar estos abordajes (8). Por lo general el proceso de validación de las herramientas se hace con un set de imágenes de evaluación, las cuales pueden provenir del set de entrenamiento o de otra institución (8). Una de las razones por las que se prefiere realizar la validación usando imágenes independientes es garantizar que estos modelos sean capaces de adaptarse a fuentes preanalíticas de variación (cambios en las características de las láminas, en los protocolos o el escáner) (8). Es importante que estos sistemas superen unos umbrales de desempeño para que los patólogos y oncólogos se sientan cómodos usándolos (8). En contextos en que estas herramientas compiten directamente con exámenes existentes, lo mínimo esperable sería demostrar no inferioridad, sin embargo, para lograr la adopción, idealmente, deberían demostrar superioridad en una comparación directa en estudios prospectivos (8).



## 5 PLAN DE INVESTIGACIÓN

### 5.1 Esquema general del estudio

Este es un estudio orientado a la construcción y evaluación de una herramienta de software capaz de apoyar el proceso diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung mediante la identificación automática de células ganglionares en láminas histológicas de biopsias rectales teñidas con hematoxilina eosina.

Fueron seleccionadas biopsias endoscópicas de recto de 25 pacientes, realizadas para valoración de inervación, valoradas en la Fundación Hospital de la Misericordia, todas correspondientes a pacientes con inervación normal. Posteriormente, haciendo uso de una cámara digital acoplada a un microscopio óptico, se tomaron fotos de las láminas de histología (con un aumento de 40x), buscando representar células ganglionares en diferentes niveles y estados de maduración. Los núcleos fueron segmentados utilizando una herramienta libre (Stardist®) y a continuación fueron anotados manualmente por dos patólogos, estableciendo dos categorías: Células ganglionares y células no ganglionares.

Se obtuvieron 39.918 núcleos, de los que se seleccionó 2076 (346 de células ganglionares y 1730 de células no ganglionares). De estos núcleos seleccionados se extrajo un set de 100 características relacionadas con forma, color y textura. Para evaluar la utilidad de estas características en la discriminación de los núcleos se utilizó una metodología de validación cruzada, dividiendo de manera aleatoria los núcleos en un set de entrenamiento y un set de validación (70 y 30% respectivamente). Utilizando la prueba de Wilcoxon se seleccionaron las 4 características con mejor desempeño, y fueron estas las características utilizadas para entrenar un clasificador basado en inteligencia artificial (análisis de discriminación lineal). La herramienta de clasificación fue aplicada entonces al set de validación. Este proceso fue repetido 500 veces y el desempeño de la herramienta fue valorado utilizando el área bajo la curva ROC.

El producto fue una herramienta diagnóstica para enfermedad de Hirschsprung de bajo costo y fácil implementación, con un muy buen desempeño en la discriminación entre células ganglionares y células no ganglionares ( $AUC = 0.98$ ), y que podría ser utilizada por patólogos enfrentados a biopsias rectales tomadas en áreas distantes con disponibilidad limitada de expertos o pruebas complementarias. Ver imágenes 18 y 19.

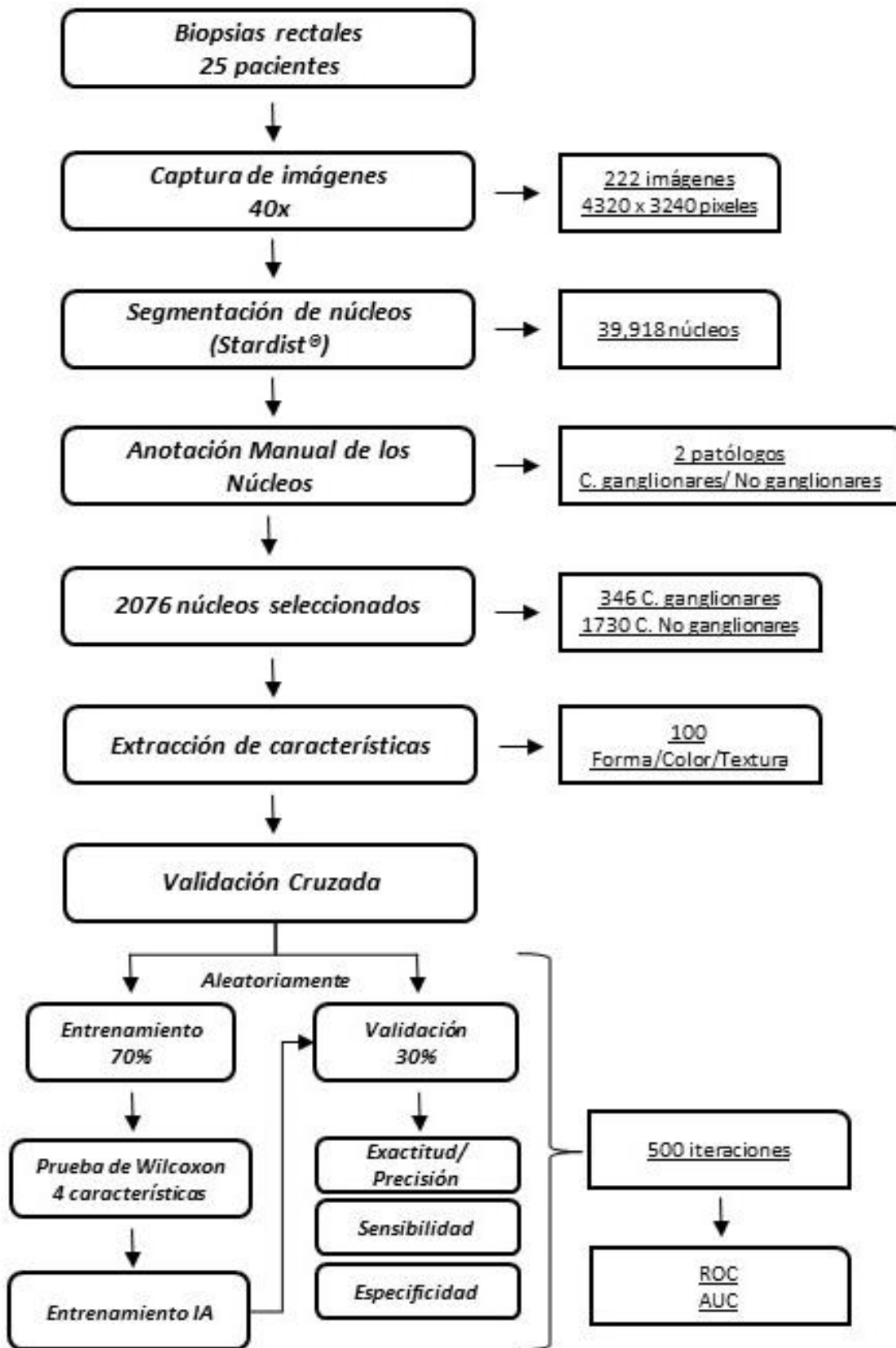
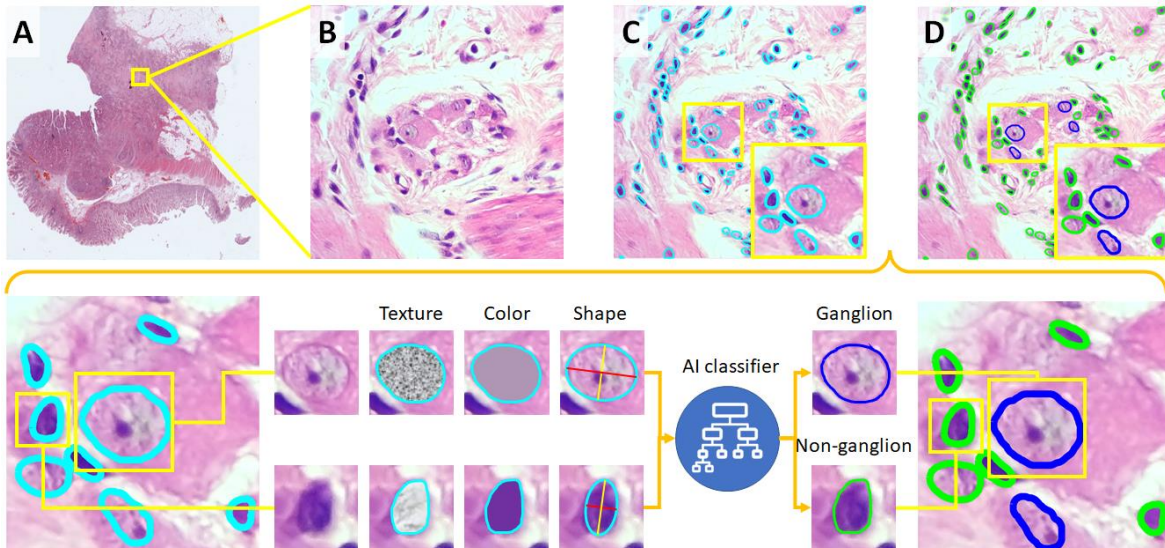


Imagen 18. Esquema general del estudio.



**Imagen 19.** A y B) El punto de partida fueron las biopsias rectales de 25 pacientes con invasión intestinal normal. Usando una cámara digital acoplada a un microscopio óptico se tomó fotos a las láminas de histología teñidas con hematoxilina eosina. El objetivo fue tomar fotos de células ganglionares en diferentes niveles y estadios de maduración. C) Haciendo uso de una herramienta de software libre (Stardist®) se hizo la segmentación de los núcleos. Los núcleos fueron anotados manualmente por dos patólogos, dividiéndolos en células ganglionares y no ganglionares. Se extrajo un set de características relacionadas con forma, textura y color. Las 4 características con mejor desempeño para discriminar las categorías fueron utilizadas para entrenar un clasificador basado en Inteligencia Artificial.

## 5.2 Procedimientos del estudio

### 5.2.1 Obtención de la Aprobación del Comité de Ética del HOMI

Se presentó el proyecto al comité de ética del HOMI, obteniendo inicialmente una aprobación bajo la condición de incluir dentro de los asesores del trabajo a un cirujano pediatra. Una vez cumplido este requisito, involucrando en el grupo de trabajo al Dr. Fierro, se obtuvo el acta de aprobación, la cual se incluye como parte de los anexos de este documento.

### 5.2.2 Selección de láminas histológicas para digitalización:

#### Criterios de inclusión

- Biopsias colorrectales realizadas con el fin de determinar la presencia de células ganglionares, y que se encuentren disponibles en los archivos del laboratorio de patología de la Fundación HOMI.
- Las láminas histológicas deben ser producto del proceso habitual de inclusión en parafina y tinción tisular con hematoxilina eosina.

#### Criterios de exclusión:

- Biopsias colorrectales sometidas a proceso de congelación o con tinción tisular distinta a hematoxilina eosina.
- Biopsias colorrectales o láminas histológicas con tejido colorrectal obtenidas con fines diagnósticos distintos a la determinación de la presencia de células ganglionares.
- Biopsias que hayan sido reportadas como inadecuadas por el patólogo en el informe de patología (muy cercanas a la línea pectínea, con inadecuada representación de la submucosa, etc.).
- Biopsias colorrectales cuyos bloques o láminas histológicas no se encuentren dentro de los archivos del HOMI.

### **5.2.3 Fuente de datos:**

Se realizó la búsqueda de las biopsias colorrectales realizadas con la sospecha diagnóstica de enfermedad de Hirschsprung en la base de datos de biopsias colorrectales del servicio de patología de HOMI - Fundación Hospital Pediátrico La Misericordia. Esta base de datos incluye biopsias colorrectales tomadas por diversos diagnósticos clínicos, incluyendo enfermedad de Hirschsprung, malformación anorrectal, enterocolitis necrosante, anastomosis ileoanal, estreñimiento, sangrado rectal, entre otros. Tiene consignados datos generales de cada caso incluyendo tipo de espécimen quirúrgico, la edad, el documento del paciente, y el diagnóstico patológico.

### **5.2.4 Construcción de Base de Datos correspondiente al Proyecto**

Con los datos obtenidos se construyó una base de datos correspondiente a las biopsias colorrectales realizadas con el fin de hacer diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung entre los años de 2007 y 2020. Se obtuvo un total de 158 potenciales casos y 393 potenciales controles. Dentro de los diagnósticos clínicos se encontró: Sospecha de Enfermedad de Hirschsprung, constipación, obstrucción intestinal, megacolon, atresia del intestino, estreñimiento, enterocolitis necrosante, descenso endoanal, perforación del recto, vómito y distensión abdominal, antecedente de ascenso endorrectal, diarrea y gastroenteritis entre otros.

Del examen de esta base de datos se obtuvo los siguientes datos:

- La incidencia de enfermedad de Hirschsprung en las biopsias colorrectales realizadas con el fin de determinar la inervación intestinal fue de: 22%. Esta incidencia es mayor a la reportada previamente en el mismo hospital (20.58%) (16). Esto podría estar relacionado con:

- Un aumento en la sensibilidad y especificidad de los criterios clínicos establecidos para la realización de los estudios de inervación bajo la sospecha de enfermedad de Hirschsprung.
  - Mayor selección de los casos que son enviados al centro de referencia, dando como resultado que los casos que son evaluados en el HOMI sea aquellos con mayor posibilidad pretest de enfermedad de Hirschsprung
- En este periodo se hizo un total de 587 estudios de inervación, de los cuales 392 arrojaron una inervación normal y en 158 se observó ausencia de células ganglionares. 36 de los estudios (6.13%), fueron no diagnósticos debido a que el material enviado no tenía las características óptimas para hacer diagnóstico.
  - El 59% de los estudios de inervación fue realizado en niños, el 34% en niñas y en 7% de los casos no hay datos sobre el sexo del paciente.
  - Se hicieron 99 nuevos diagnósticos de enfermedad de Hirschsprung. 64 en niños (64%), 19 en niñas (19%) y en 16 casos (16%) se desconoce el sexo.
  - 21 de los nuevos diagnósticos de enfermedad de Hirschsprung se hizo en el periodo neonatal (21%). Esto es menos de 2/3 de los casos, cifra reportada de diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung en el periodo neonatal en los países industrializados; además, está acorde con lo previamente reportado en Colombia (3).
  - 46 (46%) de los nuevos diagnósticos se hicieron en menores de 1 año; dato que contrasta con el diagnóstico del 95% de los casos en el primer año en los países industrializados (3). Este porcentaje de diagnóstico antes del primer año es similar al 44% previamente reportado en Colombia (3).

### **5.2.5 Sustracción de los bloques del archivo de Patología HOMI**

De manera progresiva, y a la par con el proceso de digitalización, se hizo la sustracción de los bloques de parafina correspondientes a los controles (previa autorización de la dirección del laboratorio de patología del HOMI). Para el desarrollo de la herramienta fueron usados los bloques de parafina de 25 pacientes pertenecientes al grupo de controles. El proceso de histotecnología de estos bloques fue financiado con fondos propios. El objetivo era obtener láminas de histología que fueran integradas al archivo del proyecto. Se obtuvieron 44 láminas.

La forma de obtención de la muestra en estos pacientes ha sido la biopsia colorrectal, excepto en un paciente en que la fuente fue biopsia colorrectal y examen de las bocas de colostomía. Los diagnósticos clínicos incluyeron:

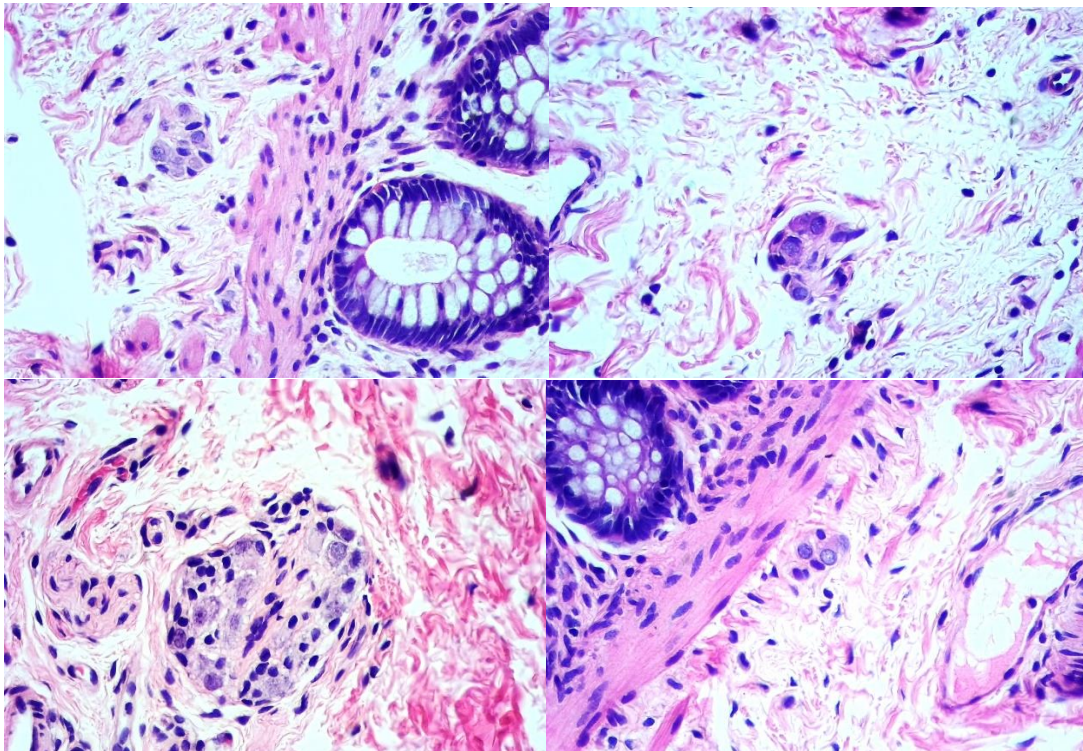
Sospecha de enfermedad de Hirschsprung, constipación, enterocolitis necrosante, atresia del recto, infección de las vías urinarias, estreñimiento y malformación anorrectal; la sospecha de enfermedad de Hirschsprung es de lejos la más frecuente. El diagnóstico histopatológico ha sido inervación morfológicamente usual, presencia de células ganglionares, inervación normal, positivas para células ganglionares, entre otros.

### 5.2.6 Revisión y digitalización de las láminas histológicas

Posteriormente se procedió a tomar las fotos de las láminas de histología (teñidas con hematoxilina eosina), con una cámara USB Panasonic de 14MP, acoplada a un microscopio óptico Nikon Elipse E200 disponible en la sección de microbiología del Hospital Universitario Nacional. Se seleccionaron las áreas con plexos nerviosos, buscando obtener representación de las células ganglionares en diferentes niveles y estadios de maduración. Este proceso fue realizado por el investigador principal y no fueron usadas tinciones especiales.

Se obtuvo un total de 222 imágenes con aumento de 40x y una resolución de 4320 x 3240 pixeles.

En la imagen 20 se observan algunos ejemplos de las fotos tomadas.



**Imagen 20. Biopsias rectales, Hematoxilina eosina, 40x.** Ejemplos de imágenes tomadas con la cámara digital acoplada al microscopio disponible en la sección de microbiología del Hospital Universitario Nacional.

### 5.2.7 Segmentación y anotación de los núcleos

Posteriormente, utilizando la herramienta QuPath (17), (software libre para análisis de imágenes) y la extensión Stardist® (18), se hizo la segmentación de los núcleos celulares presentes en las imágenes. Este código permite hacer la segmentación de núcleos en imágenes de hematoxilina eosina y, adicionalmente, crear anotaciones por cada uno de los núcleos.

Stardist es una herramienta basada en una red neural de tipo U – net que utiliza polígonos convexos en forma de estrella para predecir la forma a la que pertenecen cada uno de los pixeles de la imagen. El proceso puede verse resumido (y simplificado) en los siguientes pasos:

- 1- Discriminación entre fondo y objetos presentes en la imagen (núcleos)
- 2- Predicción de la localización de los pixeles (objeto o fondo), y selección de aquellos pixeles que mayor probabilidad pertenecen a un objeto.
- 3- Para cada uno de estos pixeles el algoritmo regresa unas distancias a los bordes de la forma que contiene este píxel.
- 4- Construcción de una serie de radios (número previamente definido), con ángulos equidistantes, que se extienden hasta alcanzar un píxel que corresponde al fondo u a otro objeto, delimitando así el perímetro de la forma
- 5- Determinación de las formas que con mayor probabilidad se ajustan a objetos. Los polígonos seleccionados para este proceso son aquellos que están asociados con pixeles que se encuentran por encima de un corte predeterminado de estar asociados con un objeto. Posteriormente la probabilidad de que las formas se ajusten a un objeto se determina de acuerdo con la distancia más cercana a un píxel perteneciente al fondo. La supresión favorecerá formas con pixeles cercanos al centro de las formas sobrepuestas, dando como resultado representaciones más fidedignas. Ver imágenes 21 y 22.

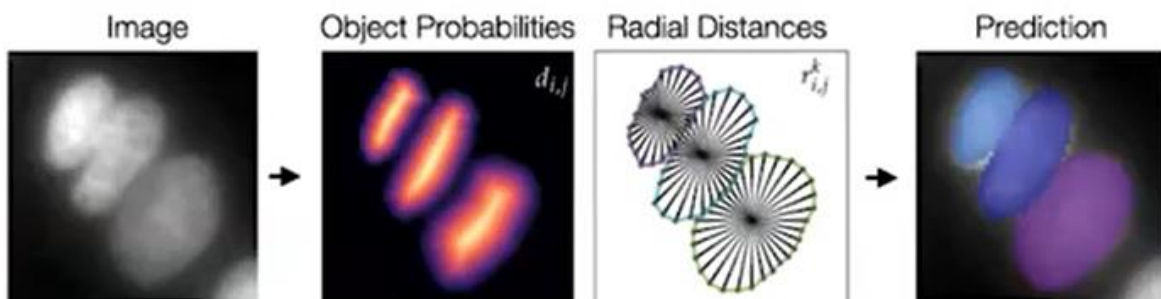


Imagen 21. Resumen gráfico del proceso general que realiza la herramienta Stardist®.

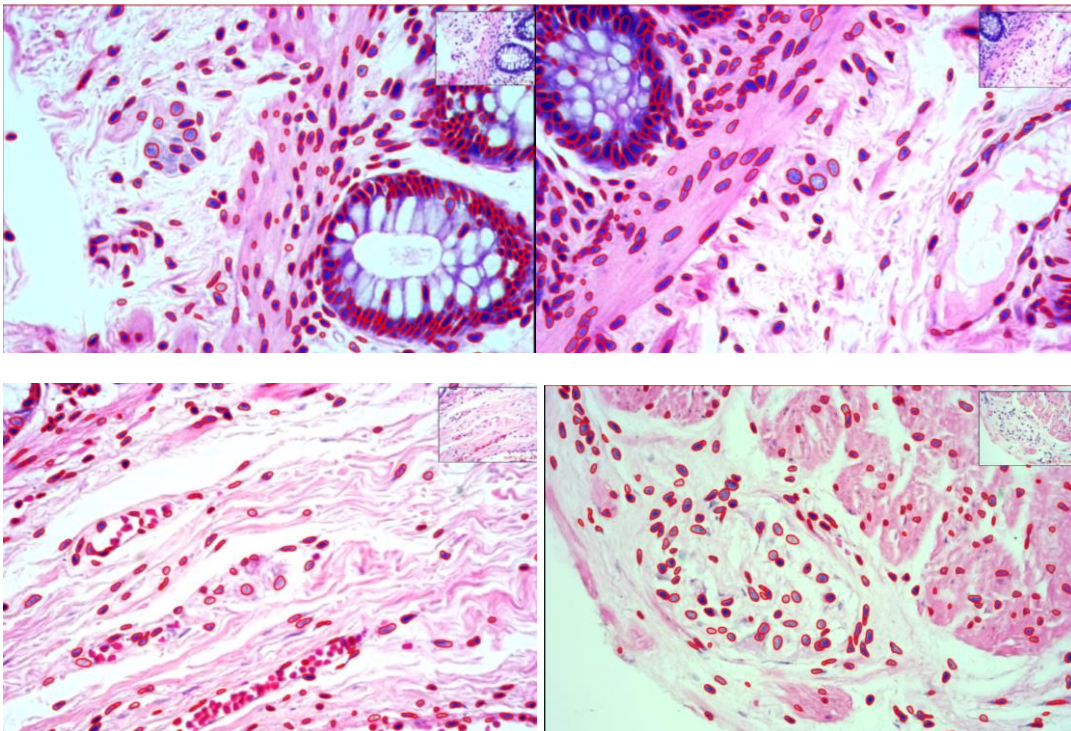
```

1 import qupath.ext.stardist.StarDist2D
2
3 // Specify the model file (you will need to change this!)
4 var pathModel = 'C:/Users/afsc2/Documents/Proyecto de grado/Proyectos Qpath/Modelos Stardist/he_heavy_augment.pb'
5
6 var stardist = StarDist2D.builder(pathModel)
7   .threshold(0.5) // Prediction threshold
8   .normalizePercentiles(1, 99) // Percentile normalization
9   .pixelSize(3)
10  .createAnnotations() // Resolution for detection
11  .build()
12
13 // Run detection for the selected objects
14 var imageData = getCurrentImageData()
15 var pathObjects = getSelectedObjects()
16 if (pathObjects.isEmpty()) {
17   Dialogs.showErrorMessage("StarDist", "Please select a parent object!")
18   return
19 }
20 stardist.detectObjects(imageData, pathObjects)
21 println 'Done!'

```

**Imagen 22.** Línea de comando utilizada para realizar las segmentaciones y las anotaciones de los núcleos

Las 222 fotos tomadas fueron sometidas al proceso de segmentación. En las imágenes 23 y 24 se observan algunos ejemplos.



**Imagen 23.** Núcleos segmentados (en rojo)



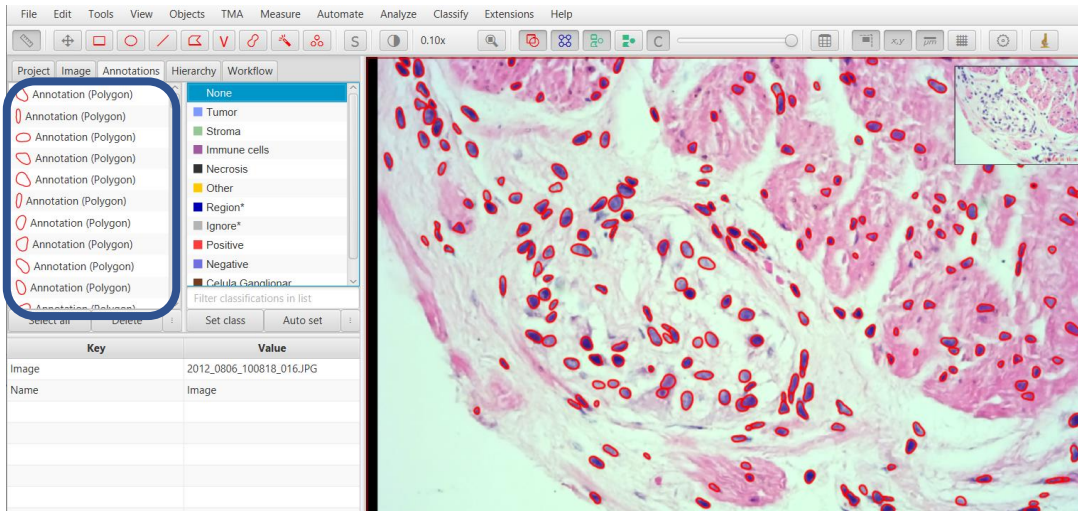


Imagen 24. Al realizar la segmentación, se crea además una serie de anotaciones, 1 por cada núcleo (recuadro azul)

## 5.2.8 Exportación de los núcleos a máscaras binarias

Una vez hecha la segmentación y anotación de los núcleos se hizo la exportación de estas imágenes para convertirlas en máscaras binarias. El código utilizado se muestra en la imagen 25.

```

1 import java.awt.image.BufferedImage
2 import java.awt.Color
3 import javax.imageio.ImageIO
4 import java.awt.BasicStroke
5
6 //----- User parameters -----//
7
8 double downsample = 1.0
9 def pathOutput = 'C:\\Users\\lafac2\\Documents\\Proyecto de grado\\Proyectos qpath\\Proyecto de grado\\Mascaras binarias' // Use \\ instead of \ in Windows filepaths
10 String customSuffix = '_mask.png'
11
12 //-----//
13
14 // Get java.awt.Shape objects for each annotation
15 def shapes = getAnnotationObjects().collect({it.getROI().getShape()})
16
17
18 def server = getCurrentImageData().getServer()
19 int w = (server.getWidth() / downsample) as int
20 int h = (server.getHeight() / downsample) as int
21
22 String path2 = server.getPath()
23 int ind1 = path2.lastIndexOf("/") + 1;
24 int ind2 = path2.lastIndexOf(".") - 1;
25 String name = path2[ind1..ind2]
26
27
28 String maskFilename = name + customSuffix
29
30 print(maskFilename)
31 def img = new BufferedImage(w, h, BufferedImage.TYPE_BYTE_GRAY)
32
33 // Paint the shapes (this is just 'standard' Java - you might want to modify)
34 def g2d = img.createGraphics()
35 g2d.scale(1.0/downsample, 1.0/downsample)
36 g2d.setColor(Color.WHITE)
37 for (shape in shapes)
38     g2d.fill(shape)
39
40 // Drawing borders to deal with attached nuclei
41 g2d.setColor(Color.BLACK)
42 g2d.setStroke(new BasicStroke(2));
43 for (shape in shapes)
44     g2d.draw(shape);
45
46 g2d.dispose()
47
48 // Save the result
49 def fileMask = new File(pathOutput, maskFilename)
50 ImageIO.write(img, 'PNG', fileMask)

```

Imagen 25. Código utilizado para exportar las máscaras binarias.

El resultado es una imagen en 2 colores, negro y blanco, donde los núcleos se observan en blanco y el fondo en negro. Ver imagen 26

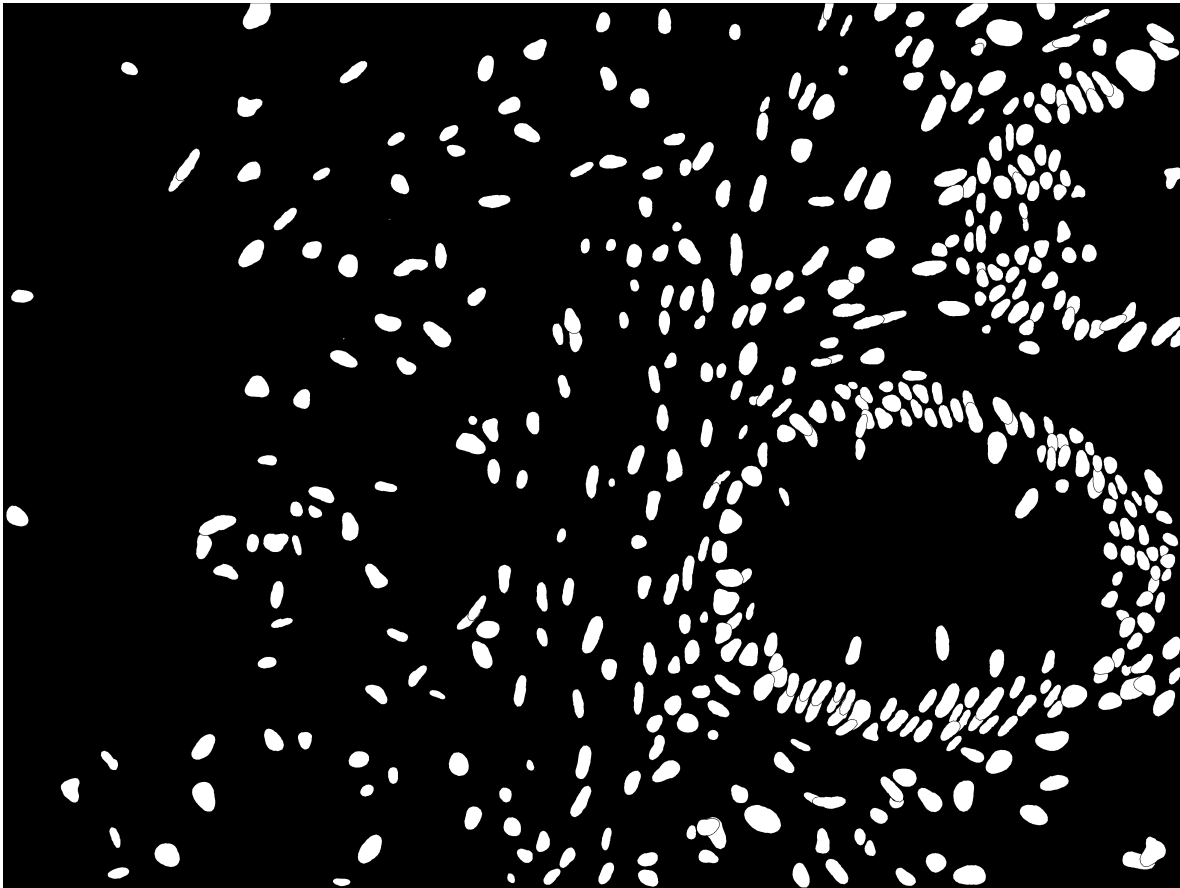


Imagen 26. Máscara binaria.

### 5.2.9 Anotación de los núcleos

Utilizando la herramienta de software libre, HistoView, 2 patólogos seleccionaron y anotaron, de manera independiente, las células ganglionares. Ver imágenes 27 y 28.

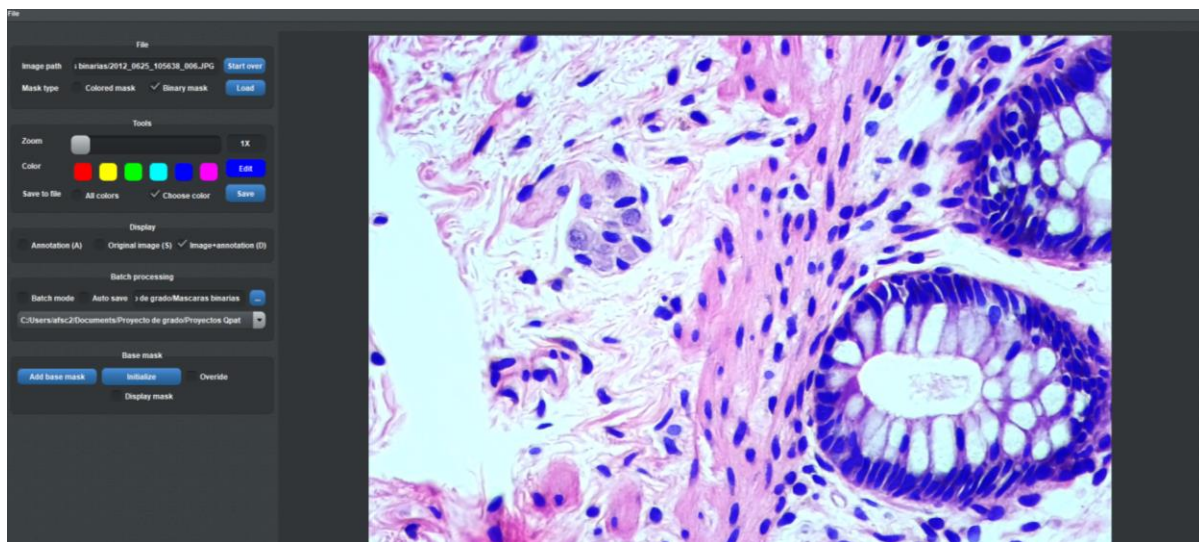
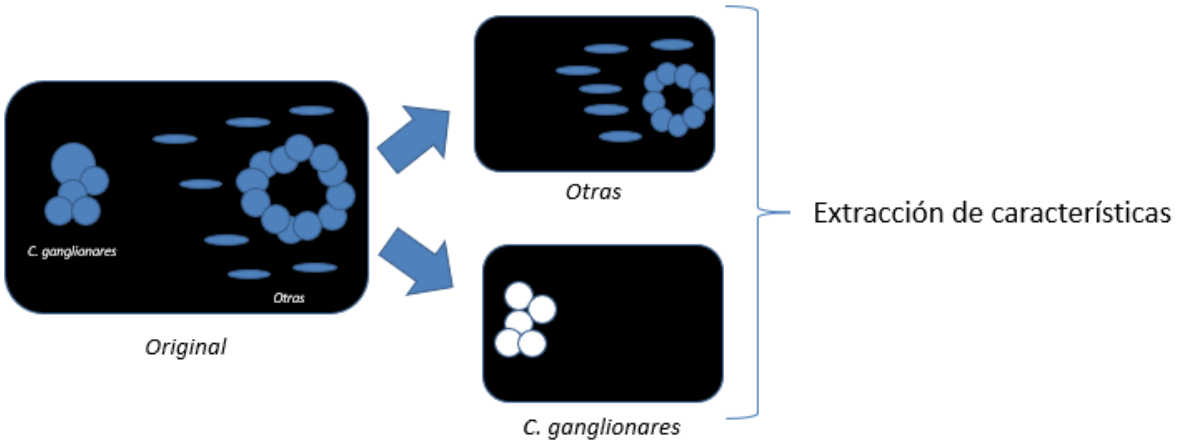


Imagen 27. Interfaz gráfica de HistoView que, a partir de las máscaras binarias previamente construidas, permite anotar manualmente los núcleos de las células ganglionares.



**Imagen 28.** Las anotaciones realizadas crean dos nuevas representaciones, una en la que se incluye únicamente las demás células (células no ganglionares) y otra que incluye únicamente las células ganglionares, que efectivamente es el producto de la sustracción de la imagen de las demás células de la imagen original. A partir de esta diferenciación es posible realizar el siguiente paso, la extracción de características.

### 5.2.10 Extracción de características

Previa normalización del color de las imágenes, y utilizando una librería disponible en Matlab se extrajo un set de 100 características de la totalidad de los núcleos anotados (39.918). Las características estaban relacionadas con forma, color y textura de los núcleos. Los valores extraídos se exportaron a un archivo de Excel, que se encuentra dentro de los documentos que se anexan al presente trabajo.

### 5.2.11 Selección de características

Utilizando un esquema de validación cruzada se valoró la utilidad de las características extraídas para diferenciar entre células ganglionares y no ganglionares. Para este proceso se seleccionaron, de manera aleatoria 2076 núcleos (346 de células ganglionares y 1730 de células no ganglionares).

En cada una de las iteraciones se dividió estos núcleos de manera aleatoria en 2 grupos, uno para entrenamiento (70%) y otro para validación (30%).

Utilizando la prueba de Wilcoxon se seleccionó las 4 características con mejor desempeño en la diferenciación.

### 5.2.12 Entrenamiento de la Inteligencia Artificial

En cada una de las iteraciones se utilizaron las características seleccionadas para entrenar a la inteligencia artificial utilizando un análisis de discriminación lineal para diferenciar entre células ganglionares y no ganglionares.

### 5.2.13 Aplicación al set de validación

Posterior al entrenamiento, se utilizó el clasificador desarrollado en el set de validación y se valoró su desempeño en términos de exactitud, precisión, sensibilidad y especificidad en cada una de las iteraciones tomando como estándar de oro las anotaciones iniciales realizadas por los dos patólogos.

Para hacer estos cálculos se usó una librería de Matlab, que utilizó las siguientes formulas:

		Clasificación de los investigadores	
		Células Ganglionares	Células no ganglionares
Clasificación del modelo	Célula Ganglionar	VP	FP
	Célula no ganglionar	FN	VN
Total			

Exactitud:  $(VP/VN) / (VP + VN + FP + FN)$

Precisión:  $VP / VP + FP$

Sensibilidad:  $VP / VP+FN$

Especificidad:  $VN / VN+FP$

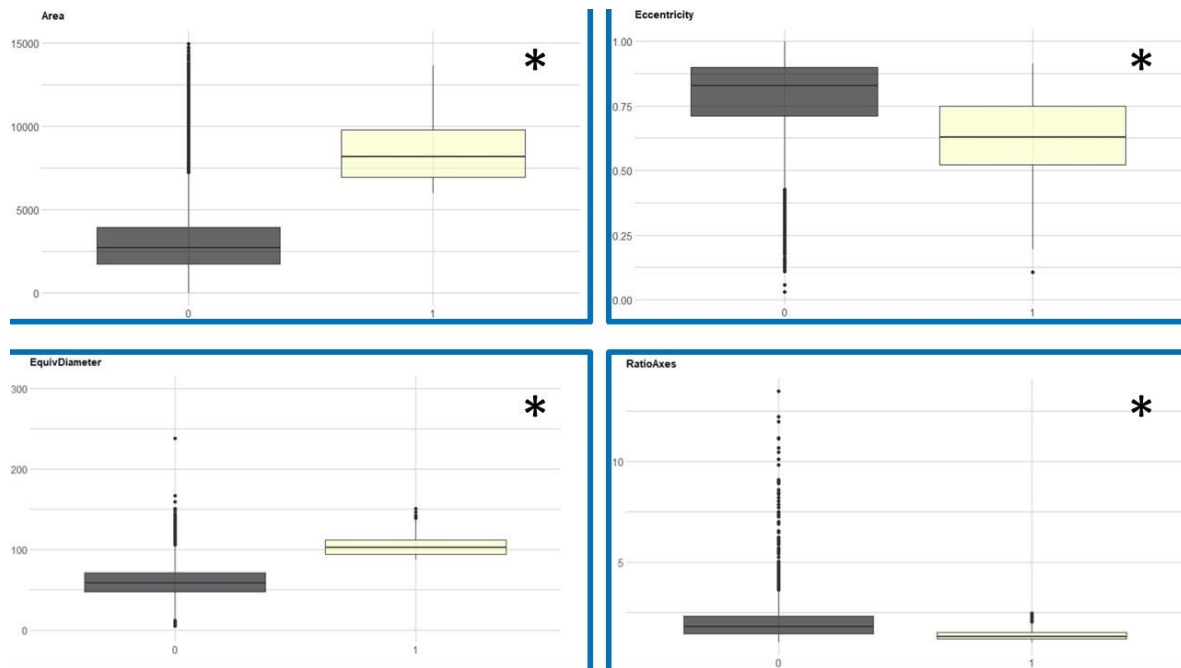
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Características seleccionadas

Las 4 características que mostraron mejor desempeño de manera reiterada fueron las siguientes:

- Área: Número de píxeles que componen el núcleo.
- Excentricidad: Relación establecida entre la distancia de los focos de la elipse y la longitud de su eje mayor.
- Ratio Axes: Relación entre la medida en los ejes x e y del núcleo
- EquivDiameter: Diámetro de círculo que abarca el núcleo

Todas están relacionadas con la forma de los núcleos. Ver imagen 29.



**Imagen 29 Box plots.** Estos 4 gráficos muestran los box plots de las 4 características principales utilizadas para discriminar entre células ganglionares y no ganglionares: Área, Eccentricity, EquivDiameter and RatioAxes. En las gráficas, 0 (en negro) representa las células no ganglionares, el 1 (en amarillo) representa las células ganglionares. La heterogeneidad significativa en la distribución de los puntos de las células no ganglionares puede ser atribuido a la diversidad de los tipos celulares incluidos en esta categoría (linfocitos, células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales, etc.) \*  $p < 0.05$

### 6.2 Desempeño global

Finalizadas las 500 iteraciones se valoró el desempeño de la herramienta construida utilizando el área bajo la curva ROC (AUC). Ver imagen 30. La sensibilidad y especificidad global calculadas fueron del 96%.

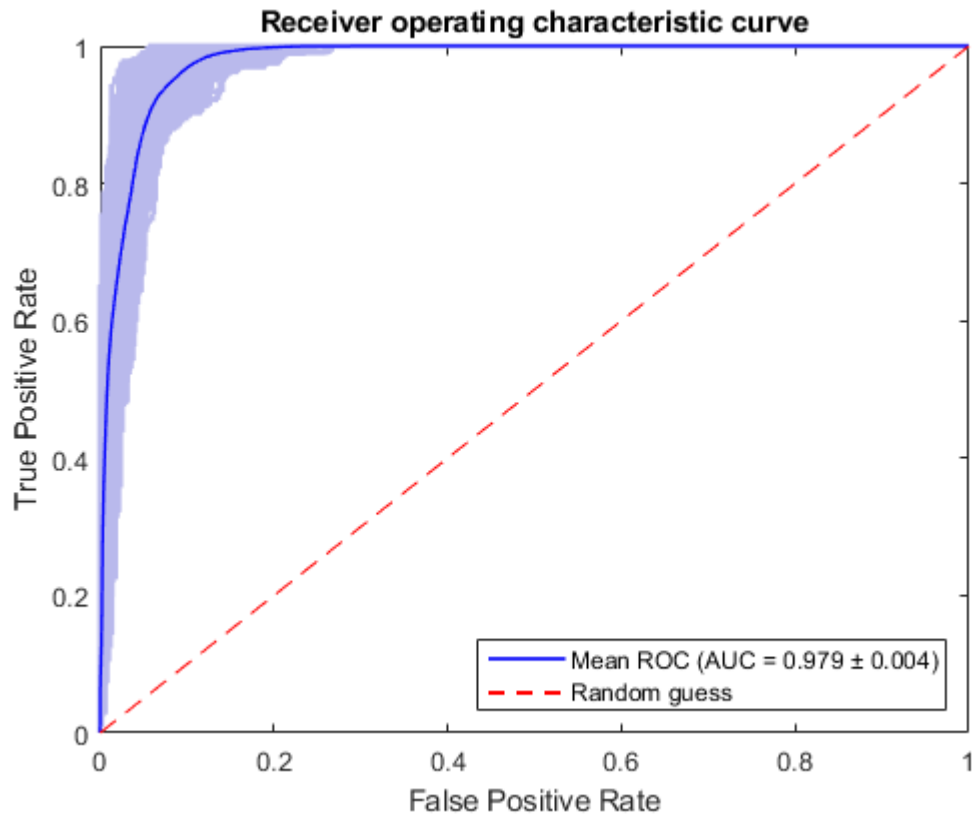


Imagen 29. Curva ROC y área bajo la curva de la herramienta desarrollada.

## 7 DISCUSIÓN

Existe un número no despreciable de pacientes que requieren reintervención y cuya indicación son criterios patológicos (2). Esto levanta la sospecha de que la evaluación subjetiva de las biopsias puede resultar en diagnósticos errados; fenómeno que se ha visto predominantemente en las células ganglionares en la muscular propia (2). La patología digital y las tecnologías basadas en aprendizaje de máquina pueden brindar herramientas para realizar un análisis objetivo de las láminas de parafina, disminuyendo los fracasos quirúrgicos (2).

Dentro de los modelos experimentales usados con este objetivo se encuentra el trabajo de Law y col., en que, utilizando una herramienta de procesamiento de imágenes en color de múltiples etapas; segmentaron la muscular propia para identificar regiones de interés, plexos y células ganglionares en estos plexos (2). Las imágenes fueron obtenidas a partir de láminas histológicas producto del procesamiento convencional basado en inclusión en parafina y tinción con hematoxilina eosina; y correspondían a segmentos intestinales con adecuada inervación que pertenecían a pacientes con enfermedad de Hirschsprung (2). Previo a la digitalización, se hizo inmunohistoquímica para calretinina (2). Todos los pasos fueron susceptibles de correcciones manuales para garantizar una adecuada selección de la región de interés y eliminar falsos positivos; tras la detección automática, el usuario tenía la posibilidad de corregir tanto los falsos positivos como los falsos negativos (2). El desempeño fue evaluado por un patólogo, quien, tras hacer la segmentación de la imagen, valoró el etiquetado de las células ganglionares e identificó los falsos negativos (2). Las regiones de interés (señaladas sin intervención manual), incluyeron todos los plexos identificables (2). Los plexos fueron identificados con una precisión del 88.5% y una sensibilidad del 90.2%; y, tras corrección de la separación de los plexos, la precisión y sensibilidad en la identificación de las células ganglionares fue de 85.7% y 72% respectivamente (2). Sin embargo, la verificación se hizo en una sola muestra, siendo posible que estos valores cambien en caso de evaluar una mayor cantidad de especímenes (2). Al compararlo con nuestro esquema de investigación, nosotros utilizamos como punto de partida láminas teñidas con Hematoxilina eosina, reduciendo así costos, y, adicionalmente, obtuvimos un desempeño mejor en la identificación de las células ganglionares.

Schilling y col. (19) también utilizaron láminas teñidas con inmunohistoquímica como punto de entrada. Digitalizaron 31 especímenes teñidos para MAP2, calretinina, S100B y GLUT1 (12 láminas cada una) (19). Posteriormente, configuraron manualmente regiones de interés (ROIs) y definieron umbrales y ajustes para identificar neuronas (MAP2, calretinina) y fibras nerviosas (S100B, GLUT1), aislandolos del resto de la imagen y midiendo sus características (19). Luego,

dividieron sus datos en un set de entrenamiento (56%), un set de desarrollo (19%) y un set de prueba (25%) (19). Todos los ajustes de parámetros se realizaron en el conjunto de desarrollo, y el modelo de clasificación se construyó utilizando los clasificadores desarrollados, con anotaciones relacionando el estado de enfermo o no enfermo, seguido de una validación cruzada de 10 iteraciones (19). Los parámetros que demostraron ser significativos para distinguir entre casos de HSCR y no HSCR fueron aquellos aplicados a calretinina y MAP2 (19). Lograron un valor predictivo positivo del 83%, una sensibilidad del 87.5%, una especificidad del 80% y un puntaje F1 del 88.9% en el set de prueba (19). En comparación con nuestro estudio, el nuestro tiene la ventaja de utilizar tinción H&E como punto de entrada, reduciendo así los costos. Además, el rendimiento general de nuestro modelo fue superior, utilizando un modelo experimental más simple.

Greenberg y col. (20) desarrollaron un método llamado Análisis Contextual Jerárquico (ACJ), que supera la limitada disponibilidad de datos (20). Para desarrollar su algoritmo, utilizaron 95 láminas teñidas con H&E, digitalizadas a una magnificación de x40, y realizaron anotaciones manuales de células ganglionares y células ganglionares sospechosas, teniendo en cuenta su área circundante (20). Los registros hospitalarios sirvieron como la verdad absoluta y todos los casos fueron revisados por patólogos experimentados (20). Posteriormente, hicieron ajustes al algoritmo basados en la revisión de los patólogos de la clasificación hasta este punto, con falsos positivos y falsos negativos (20). Para la validación, emplearon cincuenta casos con sospecha clínica de enfermedad de Hirschsprung y organizaron conjuntos de imágenes para que fueran revisados por patólogos, basándose en puntuaciones de 0 a 1 asignadas por el algoritmo (20). Cada conjunto de imágenes fue calificado por el patólogo en función de la presencia de células ganglionares, y según esto, se determinó la necesidad de remitir a un patólogo experto (20).

El algoritmo que desarrollaron identificó células ganglionares en el colon normal con una sensibilidad del 96% y una especificidad del 99% (20). En la cohorte de validación de casos sospechosos de enfermedad de Hirschsprung, el algoritmo identificó células ganglionares con una sensibilidad del 100% y en menos del 5% del tiempo requerido por un patólogo (20). El algoritmo se utilizó como una herramienta de diagnóstico por un patólogo experimentado, lo que resultó en diagnósticos precisos y ahorro de tiempo (20). Para patólogos no expertos, se logró una precisión del 100% utilizando solo las imágenes seleccionadas por el algoritmo, requiriendo consulta con un experto en el 20% al 58% de los casos y ahorró el 95% del tiempo (20). Este estudio incluyó más casos de entrenamiento, empleó un método de validación más sólido y utilizó láminas teñidas con H&E, similar a nuestro



enfoque. Sin embargo, nuestro diseño de estudio fue menos complejo y produjo un rendimiento comparable.

Greenberg y col. (21) entrenaron a cinco patólogos sin experiencia previa en el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung utilizando el algoritmo de diagnóstico descrito en (20), del cual también carecían de experiencia (21). El algoritmo seleccionó 1704 imágenes (568 conjuntos de 3) y los patólogos asignaron una puntuación de 1 a 5 a cada imagen en función de la certeza de la presencia de células ganglionares (21). Se realizaron dos iteraciones para todas las imágenes sin ningún tipo de entrenamiento entre ellas (21). Antes de la tercera iteración, se proporcionó capacitación en la identificación de células ganglionares, y se evaluó su desempeño, revelando un aumento significativo en la proporción de diagnósticos correctos, su confianza y una reducción en las remisiones (21). También hubo más falsos positivos, relacionados con la identificación de elementos no específicos como células ganglionares; sin embargo, los falsos negativos no se vieron afectados (21). Este estudio proporciona evidencia del potencial de los algoritmos basados en inteligencia artificial para facilitar el proceso de aprendizaje y diagnóstico en enfermedad de Hirschsprung.

## 8 CONCLUSIONES

Producto de este proceso se obtuvo una herramienta barata y fácilmente implementable basada en inteligencia artificial capaz de identificar células ganglionares y que muestra un desempeño sobresaliente al compararla con el patrón de oro (AUC = 0.98).

Previa validación, esta herramienta podría llegar a ser utilizada como una prueba diagnóstica complementaria para patólogos localizados en laboratorios con acceso limitado a expertos en patología gastrointestinal y pruebas complementarias como la inmunohistoquímica.

Adicionalmente, previa adaptación de su uso, podría tener una potencial aplicación como herramienta de entrenamiento a patólogos con poca experiencia en el diagnóstico de enfermedad Hirschsprung, permitiendo establecer labores de educación baratas y rápidas.

## **9 ADMINISTRACIÓN DEL ESTUDIO**

### **9.1 Confidencialidad:**

Los datos de los pacientes fueron usados únicamente en la labor de verificar la historia clínica (en caso de estar disponible), y para la verificación de que el objetivo de la biopsia es el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung. Una vez realizada esta verificación, los datos personales de los pacientes no volverán a ser utilizados. La manera de identificar las biopsias será la numeración interna de las láminas histológicas de la Fundación Hospital de la Misericordia. En la publicación de los resultados de este trabajo tampoco será revelada la identidad de los pacientes.

### **9.2 Anonimización:**

Una vez dada la verificación, la forma de identificar los casos será la numeración interna de las láminas histológicas, de manera que la identidad de los pacientes a quienes pertenecen estas biopsias permanecerá en secreto.

## 10 CONSIDERACIONES ÉTICAS

En conformidad con la Resolución N.º 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia, este estudio:

- Se encuentra comprendido dentro del término de investigación para la salud dado que:
  - a) Contribuye a la prevención y control de los problemas de salud.
  - b) Contribuye al estudio de técnicas y métodos que se recomienden o empleen para la prestación de servicios de salud.
  
- De acuerdo con la responsabilidad del investigador de identificar el tipo de riesgos a los que serán expuestos los sujetos de investigación establecido en el artículo 10:

Se trata de una “Investigación sin riesgo”, de acuerdo con la clasificación establecida en el artículo 11. Esto teniendo en cuenta que el estudio emplea técnicas y métodos de investigación retrospectivos, consistentes en consulta de historia clínica, y estudio de material histopatológico, que no involucran identificación y no tratan aspectos sensitivos de su conducta. De igual manera, no se realizará ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos participantes del estudio.

- La investigación será llevada a cabo una vez se haya dado el aval y aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética de la Fundación HOMI.
  
- La investigación será llevada a cabo teniendo en cuenta los protocolos establecidos por la Fundación Hospital de la Misericordia.

- La confidencialidad de las personas involucradas será conservada teniendo en cuenta que: Las historias clínicas serán revisadas únicamente en el hospital en que será realizado el estudio; y posterior a esta consulta, las láminas serán denominadas únicamente de acuerdo con la numeración interna de la institución, de manera que los nombres y otros datos de los participantes permanecerán ocultos. Además, en caso de que sean realizadas publicaciones asociadas a esta investigación, en ninguno de los casos serán expuestos los nombres o algún otro dato personal de los individuos participantes del estudio.
- Este trabajo no presenta conflicto de intereses por los autores.

## **11 PRODUCTOS**

Se presentó un Abstract resumiendo el presente trabajo como candidato para ser presentado en la reunión anual del USCAP que fue realizada en marzo del 2023 en Nueva Orleans, Luisiana, Estados Unidos. El trabajo fue aceptado para presentación oral en la jornada de Patología Pediátrica y Perinatal.

Fue presentado también, en la modalidad de presentación oral en Cuarto Congreso Nacional de Residentes de Patología realizado en Bogotá, Colombia, los días 28 y 29 de abril de 2023.

Será presentado en el XXI Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Patología Pediátrica que será realizado en noviembre en Buenos Aires, Argentina.

El objetivo final del proyecto es publicar en una revista científica, el proceso desarrollado y los resultados de la valoración de las características operativas de la herramienta obtenida. Esto con el objetivo de demostrar la utilidad de procesos de aprendizaje de máquina en el diagnóstico patológico de la enfermedad de Hirschsprung.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Langer J. Hirschsprung disease. *Current Opinion in Pediatrics*. 2013;25(3):368-374.
2. Law M, Chan A, El Demellawy D. Color image processing in Hirschsprung's disease diagnosis. 2016 IEEE EMBS International Student Conference (ISC). 2016
3. Jaramillo Barberi Lina Eugenia. Diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en biopsias de mucosa-submucosa del recto: una propuesta de trabajo. *Rev Col Gastroenterol* [Internet]. 2011 Dec; 26(4): 277-284. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572011000400007&lng=en).
4. Meier-Ruge W, Bruder E. *Histopathology of Chronic Constipation in Pediatric and Adult Coloproctology*. Basel: Karger; 2005
5. Santos-Jasso KA. Enfermedad de Hirschsprung. *Acta Pediatr Mex*. 2017;38(1):72-78.
6. De La Torre L, Wehrli L. Error traps and culture of safety in Hirschsprung disease. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2019;28(3):151-159
7. Najjar, S., Ahn, S., Kasago, I., Zuo, C., Umrau, K., Ainechi, S., Whyte, C., Sheehan, C., Homan, S. and Lee, H., 2018. Image Processing and Analysis of Mucosal Calretinin Staining to Define the Transition Zone in Hirschsprung Disease: A Pilot Study. *European Journal of Pediatric Surgery*, 29(02), pp.179-187.
8. Bera K, Schalper K, Rimm D, Velcheti V, Madabhushi A. Artificial intelligence in digital pathology — new tools for diagnosis and precision oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(11):703-715.
9. Marín, D., & Romero, E. (2011). Sistemas de microscopía virtual: análisis y perspectivas. *Biomédica*, 31(1), 144-55.
10. Romero Lauro G, Cable W, Lesniak A, Tseytlin E, McHugh J, Parwani A et al. Digital Pathology Consultations—a New Era in Digital Imaging, Challenges and Practical Applications. *Journal of Digital Imaging*. 2013;26(4):668-677.
11. Onega T, Reisch L, Frederick P, Geller B, Nelson H, Lott J et al. Use of Digital Whole Slide Imaging in Dermatopathology. *Journal of Digital Imaging*. 2015;29(2):243-253.
12. Erickson B, Korfiatis P, Akkus Z, Kline T, Philbrick K. Toolkits and Libraries for Deep Learning. *Journal of Digital Imaging*. 2017;30(4):400-405.
13. Alom M, Yakopcic C, Nasrin M, Taha T, Asari V. Breast Cancer Classification from Histopathological Images with Inception Recurrent Residual Convolutional Neural Network. *Journal of Digital Imaging*. 2019;32(4):605-617.

14. T. A. Lawal, K. Chatoorgoon, M. H. Collins, A. Coe, A. Pena, and M. A. Levitt, "Redo pull-through in Hirschsprung's disease for obstructive symptoms due to residual aganglionosis and transition zone bowel," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 46, no. 2, pp. 342–347, feb 2011. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022346810010018>
15. Madabhushi A, Lee G. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Medical Image Analysis*. 2016;33:170-175.
16. López T., Juan Carlos-Hiromi; JARAMILLO B., Lina E.. Utilidad de la biopsia rectal en el diagnóstico del paciente pediátrico con estreñimiento. Experiencia de cinco años en un centro colombiano de referencia. *Revista de la Facultad de Medicina*, [S.l.], v. 59, n. 3, p. 237-243, jul. 2011. ISSN 2357-3848. Disponible en: <<https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/26458/38962>>.
17. Bankhead, P. et al. QuPath: Open-source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports* (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
18. Uwe Schmidt, Martin Weigert, Coleman Broaddus, and Gene Myers. Cell Detection with Star-convex Polygons. *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI)*, Granada, Spain, September 2018.
19. Schilling F, Geppert CE, Strehl J, Hartmann A, Kuerten S, Brehmer A, Jabari S. Digital pathology imaging and computer-aided diagnostics as a novel tool for standardization of evaluation of aganglionic megacolon (Hirschsprung disease) histopathology. *Cell Tissue Res*. 2019 Feb;375(2):371-381. doi: 10.1007/s00441-018-2911-1. Epub 2018 Sep 3. PMID: 30175382.
20. Greenberg A, Aizic A, Zubkov A, Borsekofsky S, Hagege RR, Hershkovitz D. Automatic ganglion cell detection for improving the efficiency and accuracy of hirschprung disease diagnosis. *Sci Rep*. 2021 Feb 8;11(1):3306. doi: 10.1038/s41598-021-82869-y. PMID: 33558593; PMCID: PMC7870950.
21. Greenberg A, Samueli B, Fahoum I, Farkash S, Greenberg O, Zemser-Werner V, Sabo E, Hagege RR, Hershkovitz D. Short Training Significantly Improves Ganglion Cell Detection Using an Algorithm-Assisted Approach. *Arch Pathol Lab Med*. 2023 Feb 1;147(2):215-221. doi: 10.5858/arpa.2021-0481-OA. PMID: 35738006.



