



**Universidad
de Cartagena**
Fundada en 1827

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIZACIÓN EN PATOLOGÍA**

**EXPRESIÓN DE LA DOBLE BIOMARCACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA p16/Ki-
67 EN CITOLOGÍAS CONVENCIONALES DE CÉRVIX CON LIE DE ALTO
GRADO O CARCINOMA**

ALEJANDRA PINEDA CASTILLA

**CARTAGENA DE INDIAS D. T. H. Y C.
2021**



**Universidad
de Cartagena**
Fundada en 1827

EXPRESIÓN DE LA DOBLE BIOMARCACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA p16/Ki-67 EN CITOLOGÍAS CONVENCIONALES DE CÉRVIX CON LIE DE ALTO GRADO O CARCINOMA

ALEJANDRA PINEDA CASTILLA
Trabajo de grado para optar al título de Especialista en Patología

INÉS BENEDETTI PADRÓN, MD, Ph.D.

Directora

LÍA BARRIOS-GARCÍA, MD

Co-directora

**ESPECIALIZACIÓN EN PATOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**

2021

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a todas las personas que hicieron posible este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Lista de tablas	6
Lista de figuras	7
Lista de anexos	8
Abreviaturas	9
Resumen	10
Introducción	13
Metodología	16
Resultados	21
Discusión	22
Conclusiones	31
Conflictos de intereses	32
Financiación	32
Referencias bibliográficas	33
Tablas	38
Figuras	40
Anexos	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución del diagnóstico por citología y biopsia.

Tabla 2. Distribución de tinción dual p16/Ki67 según diagnóstico.

Tabla 3. Distribución de tinción dual p16/Ki67 según aspectos técnicos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de implementación de piloto para estandarización de tinción con p16/Ki67 en láminas de citología convencional.

Figura 2. Citología cervical con carcinoma escamocelular, positiva para inmunotinción dual p16/Ki-67.

Figura 3. Citologías cervicales con tinción de papanicolau (Pap), positivas para la inmunotinción dual para p16/Ki-67, con la correspondiente biopsia con tinción de hematoxilina y eosina.

Figura 4. Citología cervical con tinción de p16/Ki-67 con marcación nuclear positiva individual para p16.

Figura 5. Citología cervical con tinción de p16/Ki-67 con marcación positiva únicamente para Ki-67.

Figura 6. Citologías cervicales con tinción de papanicolau (Pap) reportada como LIE AG, negativa para la inmunotinción dual para p16/Ki-67, con la correspondiente biopsia con diagnóstico de LIE AG NIC 2.

Figura 7. Casos de carcinoma escamocelular con inmunocitoquímica negativa para p16/Ki-67.

Figura 8. Aplicación de la tinción dual de p16/Ki-67.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Reactivos del estuche comercial CINtec® *PLUS* CYTOLOGY.

Anexo 2. Manual de instrucciones de uso del estuche comercial CINtec® *PLUS* CYTOLOGY.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ASC-H: atipia de células escamosas que no descarta lesión de alto grado

ASCUS: atipia de células escamosas de significado incierto

CDK4/6: quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6

LIE AG: lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

LIE BG: lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado

NIC: neoplasia intraepitelial cervical

pRB: proteína retinoblastoma

VPH AR: virus del papiloma humano de alto riesgo

VPH: virus del papiloma humano

EXPRESIÓN DE LA DOBLE BIOMARCACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA p16/Ki-67 EN CITOLOGÍAS CONVENCIONALES DE CÉRVIX CON LIE DE ALTO GRADO O CARCINOMA

EXPRESSION OF DUAL STAINING IMMUNOCYTOCHEMISTRY p16/Ki-67 IN CERVICAL CONVENTIONAL CYTOLOGY WITH HIGH-GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESION OR CARCINOMA

Pineda Castilla Alejandra (1)

Benedetti Padrón Inés (2)

Barrios García Lía (3)

(1) Estudiante de Postgrado de Tercer Año. Especialización en Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena.

(2) Médico Patólogo, Doctorado en Ciencias Biomédicas, Especialista en Docencia Universitaria, Profesor titular Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena.

(3) Médico Patólogo, Tecnóloga Nivel superior en Citotecnología, Especialista en Docencia Universitaria.

RESUMEN

Introducción: El cáncer de cuello uterino es la octava neoplasia maligna por incidencia en el mundo y la cuarta entre las mujeres tanto en Colombia como a nivel mundial. La citología cervical es una herramienta útil para detectar de forma temprana el cáncer de cuello uterino, aunque su sensibilidad y especificidad se ven limitadas en lesiones de menor grado y en resultados de significado indeterminado, con un importante porcentaje de falsos negativos. Los marcadores moleculares p16 y Ki-67 se han utilizado en citología cervical, pues su expresión dual está aumentada durante la transformación neoplásica de las células epiteliales escamosas del cuello uterino, de ahí su utilidad para facilitar la detección de lesiones malignas o premalignas subyacentes en citologías de significado indeterminado o para constatar una verdadera lesión de alto grado en las reportadas como lesiones de bajo grado.

Objetivos: Describir la expresión simultánea de los biomarcadores p16/Ki-67 en citologías cervicales convencionales con resultado de LIE de alto grado o carcinoma.

Métodos: Se realizó un estudio piloto para la evaluación de la expresión de la doble tinción p16/Ki-67 en 40 extendidos de citología cervical convencional con resultado de LIE de alto grado o carcinoma. Los extendidos fueron incluidos en el estudio y se realizó la tinción inmunocitoquímica una vez tuvieron su respectivo diagnóstico histológico confirmatorio, lo que ocurrió en un período entre tres y ocho meses.

Resultados: En el 75% de los extendidos se encontró doble inmunoreactividad para p16/Ki-67, correspondientes al 75% (27/36) de las LIE de alto grado, 66.6% (2/3) de los carcinomas escamocelulares y 100% (1/1) de adenocarcinoma. Según los diagnósticos por biopsia, los casos con LIE de alto grado NIC 2 tuvieron tinción dual positiva en el 61.5% de las citologías correspondientes, 81.2% para las NIC3 y 81.8% para los carcinomas.

Conclusiones: En el presente estudio verificamos que la tinción dual p16/Ki-67 tiene buenos resultados en citologías cervicales convencionales, lo que facilita el diagnóstico citológico. Se recomienda realizar estudios con una muestra de mayor tamaño para que los resultados sean generalizables.

PALABRAS CLAVE: Citología, inmunocitoquímica, *Papanicolau*, Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Cuello Uterino, p16/Ki-67, tamización.

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is the eighth malignant neoplasm by incidence in the world and the fourth among women both in Colombia and worldwide. Cervical cytology is a useful tool for early detection of cervical cancer, although its sensitivity and specificity are limited in lower grade lesions and results of undetermined significance, with a significant percentage of false negatives. The molecular markers

p16 and Ki-67 have been used in cervical cytology, since their dual expression is increased during neoplastic transformation of squamous epithelial cells of the cervix, hence their usefulness to facilitate the detection of underlying malignant or premalignant lesions in cytologies of undetermined significance or to confirm a real high-grade lesion in those reported as low-grade lesions.

Objectives: Describe the simultaneous expression of p16 / Ki-67 in conventional cervical cytologies resulting in high-grade SIL or carcinoma.

Methods: A pilot study was carried out to evaluate the expression of the p16 / Ki-67 dual staining in 40 smears of conventional cervical cytology with the result of high-grade SIL or carcinoma. The smears were included in the study and immunocytochemical staining was performed once they had their respective confirmatory histological diagnosis, which occurred in a period between three and eight months.

Results: Dual immunoreactivity for p16/Ki-67 was found in 75% of the smears, corresponding to 75% (27/36) of the high-grade SIL, 66.6% (2/3) of the squamous cell carcinomas and 100% (1/1) of the adenocarcinoma. According to the diagnoses by biopsy, the cases with high grade SIL CIN 2 had positive dual staining in 61.5% of the corresponding cytologies, 81.2% for CIN 3 and 81.8% for the carcinomas.

Conclusions: In the present study, we verified that dual p16 / Ki-67 staining has good results in conventional cervical cytologies, which facilitates cytological diagnosis. It is recommended to carry out studies with a larger sample size so that the results are generalizable.

KEYWORDS: Cytology, immunocytochemistry, Papanicolau, Squamous Intraepithelial Neck Lesions, p16/Ki-67, screening.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es la octava neoplasia maligna por incidencia en el mundo; ya que se reportaron 569.847 casos en el año 2018, y es la cuarta causa de cáncer entre las mujeres tanto en Colombia como a nivel mundial. En Suramérica se registraron 39.581 nuevos casos y en nuestro país 3.853. En Colombia las tasas de incidencia y mortalidad son de 12.7 y 5.7 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (1).

Los países en vía de desarrollo son los que presentan mayor riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer, ya que está asociado a bajos niveles socioeconómicos y a infección. Actualmente se cuenta con la vacuna contra los principales virus del papiloma humano (VPH) en cáncer de cuello uterino, sin embargo faltan décadas para observar el impacto de estas, por lo que resulta necesaria la implementación de pruebas de tamización más específicas (2).

La citología cervical o prueba de Papanicolau convencional, se basa en el análisis morfológico de las células cervicales exfoliadas; y ha sido una herramienta útil para detectar de forma temprana el cáncer de cuello uterino, tanto a nivel mundial como en Colombia, viéndose reflejado esto en la disminución de la incidencia y mortalidad en el país en los últimos diez años (3), sin embargo, su sensibilidad y especificidad se ven limitadas en lesiones precancerosas, con un importante porcentaje de falsos negativos. Adelantos técnicos de la citología cervical como la citología en base líquida (CBL), no han mostrado mejoras en la sensibilidad o especificidad para la detección de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE-AG), comparada con la citología convencional (4).

La mayoría de los carcinomas cervicales se encuentran asociados a infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH), específicamente a sus genotipos de alto riesgo, siendo dicha asociación del 90-95% en los carcinomas escamocelulares y del 95% en adenocarcinomas (5). Gracias al amplio conocimiento de su rol en la carcinogénesis, se han implementado nuevas tecnologías como, la prueba para la detección de ADN de VPH de alto riesgo (VPH-AR), que mejora la sensibilidad para

identificar LIE-AG, y reduce los problemas de control de calidad, al usar un método automatizado (6). Sin embargo, debido a la alta prevalencia de infecciones transitorias por VPH, dicha prueba tiene baja especificidad (7).

Dichas infecciones transitorias generan mínimas anormalidades morfológicas intraepiteliales que pueden remitir espontáneamente, aunque un pequeño grupo de pacientes cursan con infección persistente, la cual es condición necesaria para el desarrollo de lesiones precancerosas y cáncer cervical (8).

En la infección persistente por VPH-AR, se producen altos niveles de las oncoproteínas virales E6 y E7 que alteran los mecanismos reguladores del ciclo celular. Normalmente, la proteína supresora tumoral p16, también conocida como p16INK4a por sus siglas en inglés (**INH**ibitors of **CDK**), es una proteína antiproliferativa, perteneciente a la familia inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4/6). Estas últimas regulan la actividad de la proteína retinoblastoma (pRB) por medio de su fosforilación. Al unirse E7 a la pRB, impedirá la acción del factor de transcripción E2F, por lo que no habrá bloqueo del paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, y por ende este no se detendrá (9). En las células afectadas ocurre una sobreexpresión de p16 para contrarrestar la desregulación del ciclo, pero esta acción es inútil ya que la inactivación de pRB está mediada por E7 y no por CDK4/6, lo que lleva a su acumulación. Por su parte, la oncoproteína E6 inactiva la proteína p53, la cual es la guardiana del genoma, y desregula el ciclo celular en sinergia con la inactivación de pRB por E7 (10). La acumulación de p16 en el núcleo y el citoplasma ocurre en los carcinomas y en las LIE-AG (NIC 2/ NIC 3) del cuello uterino, pudiendo ser evidenciada por técnicas de inmunotinción (11).

Por lo anterior, la proteína p16 está directamente relacionada con la acción oncogénica de los VPH-AR, por lo tanto ha sido identificada como un biomarcador de infecciones transformadoras de VPH. Sin embargo, se ha reportado que también se puede encontrar aumentada en metaplasia escamosa, algunas lesiones glandulares benignas y en células atróficas (12).

El Ki-67 es un gen que se activa en toda las fases del ciclo celular, excepto la fase G0, y produce una proteína la cual es medible por técnicas de inmunotinción. La identificación de este antígeno indica que las células están en proliferación (13). Su expresión se observa también en células normales de la capa basal del epitelio, lesiones proliferativas benignas, LIE-AG y carcinomas del cuello uterino; pero no se expresa en células endocervicales benignas, metaplasias tuboendometrioides ni en metaplasia escamosa (14).

En el año 2011 se introdujo un ensayo inmunocitoquímico que detecta cualitativamente los biomarcadores p16 y Ki-67 en citología cervical, pues su expresión dual simultánea aparece durante la transformación neoplásica de las células epiteliales escamosas del cuello uterino, ya que en células normales no ocurre la doble expresión de estas proteínas porque las funciones de estas son mutuamente excluyentes; de ahí su utilidad para aumentar el rendimiento de la citología cervical para facilitar la detección objetiva de lesiones malignas o premalignas de alto grado subyacentes en citologías de significado indeterminado (ASCUS), en las reportadas como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIE-BG) o en pacientes con resultados positivos a una prueba de detección de ADN de VPH-AR (15).

La tinción dual inmunocitoquímica de p16/Ki-67 permite una optimización de las tecnologías existentes para mejorar la precisión en la identificación de lesiones de alto grado (16). En Colombia aún no hay acceso masivo a la CBL, sino a la citología convencional, de manera que si los resultados de la tinción dual p16/Ki-67 en este tipo de extendidos previamente coloreados, son similares a los encontrados en la CBL, podría ser utilizada en nuestro medio como un método de confirmación de la presencia de una lesión intraepitelial con real riesgo de progresión.

El estuche comercial de inmunocitoquímica p16/Ki-67 se puede usar en preparaciones citológicas cervicales en base líquida (ThinPrep® y BD SurePath®) y convencional (16). Dicha biomarcación ha sido aplicada en CBL con una alta

concordancia de los resultados positivos con verdaderas lesiones de alto grado (17, 18). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre su utilización publicados en la literatura son realizados en CBL y no en citologías convencionales. En nuestro país y en nuestra región Caribe son pocos los antecedentes documentados (19, 20). Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue, siguiendo la misma línea de investigación de un estudio previo realizado por el grupo de investigación Histopatología de la Universidad de Cartagena publicado en 2014 (19), investigar cómo se comporta la doble marcación p16/Ki-67 en citologías cervicales de extendido convencional reportadas como lesión de alto grado o carcinoma, en la determinación de la real presencia de un LIE-AG o lesión de mayor grado. Dicho conocimiento es necesario y útil en Colombia, país donde las citologías cervicales rutinarias se hacen justamente con la técnica convencional.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio piloto para la evaluación de la expresión inmunocitoquímica de la doble tinción con p16/Ki-67 en extendidos de citología cervical procesados por técnica convencional, con resultado citológico de LIE-AG (NIC2/NIC3) o carcinoma según el Sistema Bethesda 2014 (21, 22), para determinar su utilidad en la identificación de LIE-AG o lesión de mayor grado. Los casos fueron incluidos y se realizó la tinción inmunocitoquímica a los extendidos, una vez tuvieron el respectivo diagnóstico histológico confirmatorio, lo que ocurrió en un período entre tres y ocho meses. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de histopatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena, los casos fueron obtenidos del Centro de Diagnóstico Citopatológico del Caribe (CENDIPAT), un laboratorio de referencia para patología ginecológica de la ciudad de Cartagena.

Obtención de los casos

Se registraron los estudios de citología de cérvix con resultado de LIE de alto grado y carcinoma realizados en el periodo comprendido de enero a julio de 2020 en el laboratorio CENDIPAT. Para la elección de los casos se utilizó un muestreo no probabilístico sucesivo, utilizando la fecha de procesamiento inicial. Se fueron

registrando los casos encontrados con el número de cada extendido y se realizó seguimiento a cada uno de ellos para confirmar la realización del estudio histopatológico correspondiente, como requisito para ser incluidos. Una vez confirmado esto, se incluyeron los casos en el estudio y se hizo una segunda lectura, tanto del extendido de citología como del estudio histopatológico, con el fin de confirmar el diagnóstico reportado y verificar que los extendidos tuvieran células bien visualizadas y conservadas.

A los casos seleccionados se les tomó una fotografía de un área donde se encontraban células representativas del diagnóstico, tanto de la citología como de la biopsia, y en las láminas de citología dicha área se delimitó con marcador permanente bajo visión microscópica, haciendo un círculo de 1.5 cm de diámetro por debajo de los portaobjetos, con el fin de aplicar los reactivos específicos en esa área.

Los casos seleccionados fueron divididos en cuatro grupos en orden cronológico (primero los más antiguos, luego los más recientes) para su procesamiento en días diferentes.

Proceso de tinción de las láminas

El piloto se realizó siguiendo los siguientes pasos (Figura 1): primero, se realizó el pretratamiento de las láminas en xilol para el desmonte del cubreobjetos, por tiempos de dos a tres días dependiendo del tiempo necesario para el desprendimiento espontáneo del cubreobjetos, ya que el desprendimiento forzado puede llevar a pérdida del material celular. Segundo, se realizó la decoloración y rehidratación de las muestras en cuatro baños de alcohol con concentraciones decrecientes de 100%, 96%, 70% y 50%, con una duración de 5 minutos en cada solución. Luego se incubaron en agua destilada por 5 minutos, que equivale al primer paso del protocolo de CINtec[®] PLUS; tercero, la solución de recuperación del epítipo se colocó en cubetas tipo Coplin en cámara de presión (DakoCytomation Pascal modelo S2800) y al alcanzar la temperatura de 99°C se sumergieron las láminas por 10 minutos; posteriormente, se retiraron de la cámara de presión y se dejaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Luego se delimitó el área de interés

(previamente marcada en la evaluación microscópica) con lápiz aislante de líquidos para procesos de tinción (Liquid Blocker Super PAP Pen, Cancer Diagnostics Inc., Birmingham, Michigan, Estados Unidos).

Se colocaron las láminas en cámara húmeda a temperatura ambiente y se incubó el tampón de lavado (Wash Buffer 10x, Roche mtm laboratorios AG, referencia 8550, Germany) por 5 minutos, seguido de la adición del reactivo de bloqueo de la peroxidasa por 5 minutos. Finalmente fueron lavados con el tampón de lavado.

Para el protocolo de tinción se realizó sobre el área delimitada, la aplicación de los reactivos para tinción doble de inmunocitoquímica de p16INK4a/Ki-67 con el estuche comercial CINtec® PLUS Cytology (Roche, mtm laboratories AG, Mannheim, Germany). El estuche contiene un cóctel de anticuerpos primarios que incluyen un anticuerpo monoclonal de ratón (clon E6H4™) contra la proteína humana p16^{INK4a} y un anticuerpo monoclonal de conejo (clon 274-11 AC3) contra la proteína humana Ki-67; también contiene reactivos de visualización listos para su uso conformados por un reactivo de polímeros conjugado con peroxidasa de rábano picante y fragmentos Fab de anticuerpos de cabra anti-ratón y un reactivo de polímeros conjugado con fosfatasa alcalina de rábano picante y fragmentos Fab de anticuerpos de cabra anti-conejo; y además tiene un cromógeno Diaminobencidina (DAB) y un cromógeno Fast Red, cuya transformación mediada por la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina, respectivamente, formarán los productos de reacción en el lugar del antígeno (Anexo 1).

Se siguieron las indicaciones del fabricante (Anexo 2) con algunas modificaciones. Se emplearon 100 micro litros de los reactivos por portaobjetos, los cuales se aplicaron manualmente con una pipeta automática.

Los extendidos citológicos fueron incubados con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-p16^{INK4a} humana (clon E6H4™), y el anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ki67 humano (clon 274-11AC3V1), durante 60 minutos el primer grupo y los restantes grupos por 75 minutos, a temperatura ambiente. Luego de lavar los extendidos, se incubó por 15 minutos el anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa

de rábano picante seguido de tres lavados. Después se adicionó el anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina por 15 minutos y se lavó tres veces. A continuación se aplicó el cromógeno de diaminobencidina por 10 minutos, seguido de un lavado con agua destilada y con tampón de lavado. Se añadió el cromógeno Fast Red por 15 minutos, luego se hizo un lavado con el tampón de lavado y finalmente con agua destilada.

Para la contratinción, las láminas se sumergieron en un baño de hematoxilina sin alcohol por 8 minutos. Para el viraje azul, se colocaron en un baño de agua corriente, hasta que no se observaron residuos de la tinción y se incubó en un baño de agua destilada por 1 minuto. Al retirar las láminas del agua destilada, se secó el exceso por detrás de ellas con una toalla de papel y se aplicaron 8 gotas del medio de montaje acuoso que trae el estuche (CINtec® PLUS Mount) a cada lámina, inclinándola y moviéndola para crear una capa fina; posteriormente se dejaron secando a temperatura ambiente durante toda la noche. Después del secado completo se sumergieron las láminas en xilol por 1 minuto y se cubrieron con un medio de montaje a base de xileno.

Interpretación de la doble tinción inmunocitoquímica p16/Ki-67

Para la evaluación de la inmunotinción se consideraron células cervicales positivas para p16 cuando presentaron una coloración café del núcleo, del citoplasma o de ambos y para Ki-67 una coloración roja del núcleo (Figura 2). Se consideró doble positividad para los dos marcadores cuando una o más células epiteliales, independiente de su morfología, mostraran una coloración café en el citoplasma y roja en el núcleo, o cuando el núcleo revelara doble coloración café y rojo. La interpretación de la inmunotinción fue realizada en forma independiente por una Patóloga y una residente de Patología de último año.

Para el control positivo se procesó una citología en base líquida (SurePath®) con diagnóstico de carcinoma escamocelular, confirmado por biopsia, con citocentrífuga de Bunsen a 1500 revoluciones por minuto durante 5 minutos, y se prosiguió a la marcación con el estuche CINtec® PLUS Cytology, según las indicaciones del

fabricante. El control negativo fueron las células cervicales normales que generalmente están en los extendidos.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados del piloto para la evaluación de la expresión de la tinción dual se elaboró una base de datos en Microsoft Excel, donde se registraron las variables relacionadas con el diagnóstico de la citología, el diagnóstico por biopsia, el tiempo de almacenamiento, el número de días en xilol, el tiempo de incubación del anticuerpo y la doble marcación de p16/Ki-67.

Para el análisis de las variables, se calcularon medidas de tendencia central para las variables cuantitativas, dependiendo de la distribución de la variable usando la prueba de Shapiro Wilk, y para las variables cualitativas se utilizaron medidas de frecuencia relativa y absolutas. Para determinar el mejor método de procesamiento y las relaciones con la reactividad en el proceso de tinción, se realizó un análisis bivariado, teniendo como variable dependiente la doble marcación del p16/Ki-67, utilizando la prueba de chi cuadrado ajustada mediante la prueba exacta de Fisher en el caso de las variables cualitativas y la prueba de T de Student o Kruskal Wallis para las variables cuantitativas, teniendo en cuenta la distribución de las mismas. Se consideró como significativa una p con un valor <0.05 . El análisis de los datos se realizó con el software Stata versión 16 (Stata Corp, Texas, EE.UU).

Aspectos éticos

El presente trabajo se clasificó como investigación sin riesgo, según la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, pues se trata de un estudio piloto que emplea láminas citológicas para la realización de la prueba y láminas histológicas para su lectura, sin requerimiento de intervenciones adicionales al cuidado estándar a las pacientes a las que se le tomó la muestra. La identidad de los sujetos de estudio se mantuvo anónima durante todo el estudio y fue utilizada solo para la verificación de duplicados. De igual forma, el estudio contó con la aprobación del comité de ética de la Universidad de Cartagena.

RESULTADOS

Se encontraron 127 citologías cervicales con diagnóstico de LIE-AG o lesión mayor realizadas en el periodo entre enero y julio de 2020 en el laboratorio CENDIPAT, de las cuales 42 contaron con biopsia confirmatoria, dos de ellas fueron excluidas porque no mostraban células bien preservadas en el extendido citológico, por lo que se incluyeron finalmente 40 casos.

Los casos incluidos tenían los siguientes resultados citológicos: 36 con LIE-AG, 3 con carcinoma escamocelular y 1 con adenocarcinoma; mientras que los diagnósticos histopatológicos se distribuyeron así: LIE-AG, NIC 2 con 13 casos; LIE-AG, NIC 3 con 16, carcinoma escamocelular con 9, adenocarcinoma con 1 y carcinoma indiferenciado con 1 (Tabla1). 7 casos con diagnóstico definitivo por biopsia de carcinoma, fueron reportados inicialmente como LIE-AG en citología.

En cuanto al tiempo de almacenamiento de los extendidos citológicos, comprendido entre su revisión inicial y la realización del respectivo ensayo de inmunocitoquímica, la mediana fue de 233 días (RIC= 219.5 – 248.5).

Procesamiento

El procesamiento de las láminas se realizó en cuatro grupos, correspondientes a cada uno de los ensayos realizados en el laboratorio, el primer grupo estuvo conformado por 17 láminas, el segundo por 7, el tercero por 8 y el cuarto grupo por 8. El 80% (n=32) de las láminas estuvieron en xilol por dos días, mientras que un 15% (n=6) requirieron un tiempo de tres días; dos láminas solo requirieron 2 minutos en xilol debido a que no tenían cubreobjetos.

En el primer ensayo el tiempo de incubación del anticuerpo primario fue de 60 minutos y al no obtener tinción en algunas láminas, se aumentó a 75 minutos en el resto de grupos.

Doble marcación

En total, se obtuvo doble biomarcación para p16/Ki-67 en el 75% (n=30) de las láminas (Figura 3), mientras que tres láminas (7.5%) presentaron marcación sólo

para el p16 (Figura 4) y una lámina sólo para el Ki-67 (Figura 5). En el 15% (n=6) no se observó marcación. En algunos extendidos las células inflamatorias tuvieron inmunoreactividad para p16. Se consideró marcación positiva en el 75% de las láminas procesadas (biomarcación doble) (Anexo 2).

Hubo tinción dual en 27/36 (75%) de las citologías reportadas como LIE-AG, y 2/3 (66.6%) de carcinoma escamocelular y 1/1 (100%) de adenocarcinoma. En los casos con diagnóstico por biopsia de LIE AG NIC 2, tuvieron tinción dual de la citología correspondiente 8/13 (61.5%), de LIE AG NIC 3, 13/16 (81.2%) y de carcinoma (incluye escamocelular, adenocarcinoma e indiferenciado), 9/11 (81.8%) (Tabla 2). La tinción dual se consideró negativa en el 38.5% de los casos de LIE AG NIC 2 (Figura 6), en el 18.8% de los casos de LIE AG NIC 3, y en el 18.2% de los casos de carcinoma (Figura 7).

En el análisis bivariado se encontró que no existían diferencias estadísticamente significativas en las distintas configuraciones en el procesamiento para el tiempo de almacenamiento de la lámina, el tiempo en xilol y el tiempo de incubación del anticuerpo principal (Tabla 3). Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en el resultado de la tinción dual según el diagnóstico por citología o por biopsia (Tabla 2).

DISCUSIÓN

La citología cervical tiene una sensibilidad que va del 30% al 87% ya que depende de las técnicas de su procesamiento y de la experiencia de quien realiza su interpretación (23). Por lo que se ha implementado como prueba primaria en programas de tamización para cáncer de cuello uterino la prueba de detección de ADN de VPH-AR, que tiene una alta sensibilidad (95%) (24). Sin embargo, esta prueba no puede distinguir entre infecciones transitorias que inducen una LIE-BG (NIC1) o incluso una LIE-AG NIC2, que pueden regresar espontáneamente, de la infección persistente que produce una LIE-AG (NIC2/ NIC3) que puede progresar a cáncer invasor. Además, la prevalencia de VPH-AR es de 80 a 85% en mujeres con LIE-BG, por lo que una gran cantidad de mujeres son remitidas a colposcopia (25).

La progresión a lesiones premalignas de alto grado y consecuentemente a cáncer, está caracterizada por eventos moleculares que conllevan a una desregulación del ciclo celular y que pueden ser monitorizados con biomarcadores más efectivos como p16/Ki-67 que permiten identificar mujeres con LIE-AG con alto riesgo de progresión a cáncer en los programas de tamización (15). Dicha prueba es útil en el diagnóstico diferencial entre lesiones premalignas de alto grado y lesiones no neoplásicas como cambios por atrofia, procesos inflamatorios o metaplasia escamosa inmadura, y entre lesiones premalignas de alto grado y bajo grado (12, 20).

Antes de la aparición de la inmunotinción dual para p16/Ki-67, solo se contaba con tinción individual de p16 para tejido y para citología, esta última, había demostrado buena utilidad en detectar LIE-AG, con una especificidad mejor que la prueba de detección de ADN de VPH-AR. Sin embargo esta tinción podía verse positiva en lesiones benignas como metaplasia escamosa, lo que obligaba a usar una puntuación de 1 a 4 que incluía criterios morfológicos para la evaluación de la positividad, generando una gran variabilidad en su interpretación. Con la tinción dual se simplificó su uso, ya que se considera positiva con una o más células que muestren la doble marcación, independiente de la morfología (26, 27).

La evidencia existente sobre la utilidad de la inmunotinción dual para p16/Ki-67 en citología cervical, sugiere que es una herramienta alternativa que ha mostrado alta sensibilidad y especificidad en la detección de LIE-AG, por lo que se recomienda su aplicación principalmente en pacientes con anomalías citológicas leves como atipia de células escamosas de significado incierto (ASC-US), LIE-BG; en pacientes con ADN de VPH-AR positivo y citología negativa (15, 27) (figura 9).

La citología cervical detecta un gran número de ASC-US y LIE-BG que requieren un seguimiento costoso mediante repetidas pruebas o colposcopia y biopsia directas; por lo que una mejor clasificación de estas muestras podría reducir sustancialmente los costos en los programas, ya que se identificarían las lesiones transitorias,

reduciendo el sobret ratamiento de estas, y se reconocería a las pacientes que realmente necesitan un manejo oportuno (25). Además en el 13% de ASC-US y 18% de LIE-BG se oculta una LIE-AG que requiere tratamiento inmediato, lo cual hace necesario usar herramientas más específicas (28).

En el metaanálisis de Peeters *et al.* (27), incluyeron 38 estudios, que evaluaron la sensibilidad y especificidad de la tinción de p16 en citología, la tinción dual de p16/Ki-67 y las compararon con la prueba de detección de ADN de VPH-AR para detectar NIC 2 y NIC 3 en pacientes con resultados de citología de ASC-US y LIE-BG. En pacientes con ASC-US, la sensibilidad de la tinción de p16 para detectar NIC 2 y NIC 3 fue de 82% y 85%; la especificidad fue de 71 y 62%, respectivamente. La tinción dual con p16/Ki-67 presentó una sensibilidad de 84% para detectar NIC 2 y 88% para NIC 3. La especificidad fue de 77% y 72% para NIC 2 y NIC 3, respectivamente. La sensibilidad de la prueba de detección de ADN de VPH-AR para NIC 2 fue de 93% y para NIC 3 de 98%. La especificidad fue de 45% y 47%. En pacientes con citologías reportadas como LIE-BG, la sensibilidad para detectar NIC 3 en tinción de p16, tinción dual de p16/Ki-67 y prueba de detección de ADN de VPH-AR fue de 86%, 96% y 100%; y la especificidad fue de 62%, 66% y 27%, respectivamente. Finalmente concluyó que la tinción aislada de p16 y la tinción dual de p16/Ki-67 tiene mayor especificidad que la prueba de detección de ADN de VPH-AR, y la tinción dual tiene una comparable sensibilidad con esta.

En un estudio que incluyó 70 pacientes con citologías con categoría de células escamosas atípicas, no se puede descartar LIE-AG (ASC-H), la sensibilidad para detectar NIC 2 o lesión de mayor grado con tinción dual para p16/Ki-67 y prueba de detección de ADN de VPH-AR fue de 94.6% y 67.6%, respectivamente. La especificidad para la tinción dual de p16/Ki-67 fue de 75.8% y para la prueba de detección de ADN de VPH-AR fue de 66.7%. Por lo tanto demostró una mayor precisión de la tinción dual de p16/Ki-67 comparada con la prueba de detección de ADN de VPH-AR para detectar NIC 2 o lesión de mayor grado en pacientes con citología ASC-H (29).

Actualmente las guías de la FDA recomiendan como prueba de tamización la prueba de detección de ADN de VPH-AR y las mujeres que tengan dicha prueba positiva para los genotipos 16 y 18 son enviadas directamente a colposcopia, pero si tienen positividad para otros genotipos de alto riesgo, el seguimiento se hace con citología. La tinción dual de p16/Ki-67 ha demostrado ser útil para la clasificación de estas mujeres, con una sensibilidad de 74.9%, mayor a la de la citología (51.9%), mientras que su especificidad fue comparable (30). En los casos donde las pacientes presenten una prueba de detección de ADN de VPH-AR positiva y citología negativa tienen un 3-7% de probabilidad de albergar una LIE-AG, para lo cual la tinción dual de p16/Ki-67 tiene una sensibilidad de 96.4% para detectar NIC 3 y de 91.9% para detectar NIC 2; su especificidad para NIC 2 y NIC 3 fue de 82.1% y 76.9%, respectivamente (31).

Las pacientes que han sido tratadas por una LIE-AG (NIC 2/NIC 3) deben ser monitorizadas para identificar recurrencias, para ello actualmente se recomienda la prueba de detección de ADN de VPH-AR combinada con la citología (32), sin embargo un estudio que incluyó 364 pacientes, determinó una sensibilidad similar para la combinación de p16/Ki-67 y prueba de detección de ADN de VPH-AR en comparación con la combinación de citología y prueba de detección de ADN de VPH-AR (87.2% vs. 89.7%). La especificidad fue significativamente mejor con p16/Ki-67 y prueba de detección de ADN de VPH-AR que con la combinación de citología y prueba de ADN de VPH-AR (74.2% vs. 58.1%) (33).

El estudio PALMS (18) evaluó el uso de la tinción dual p16/Ki-67 como prueba de cribado primario de cáncer cervical en un grupo de 27.349 mujeres de varios países europeos, reportó una sensibilidad de 90.1% para la tinción dual p16/Ki-67, 66.4% para la citología, y de 96.4 % para la prueba de ADN de VPH-AR. La especificidad para la tinción dual p16/Ki-67, la citología, y la prueba de ADN de VPH-AR fue de 95.3%, 95.4% y 90.2%, respectivamente.

La mayoría de los estudios que han demostrado la utilidad de la tinción dual p16/Ki-67 se han aplicado en citologías en base líquida (17), ya que esta técnica permite la realización de otras pruebas complementarias con el material residual del vial, además de reducir las muestras inadecuadas para valoración, y disminuir el tiempo empleado en la interpretación. Son pocos los estudios que aplican la tinción dual para p16/Ki-67 en citología procesadas por técnica convencional, los cuales han obtenido resultados favorables como el estudio prospectivo PALMS (18), previamente mencionado, que incluyó tanto citologías en base líquida como convencionales y además concluyó que la tinción dual p16/Ki-67 tiene superior sensibilidad que la citología (86.7% vs 68.5%) y mayor especificidad que la prueba de ADN de VPH-AR en todas las edades (96.2%vs. 93.0%). En dicho estudio, las citologías para la doble tinción fueron obtenidas simultáneamente y en láminas independientes de las citologías para coloración de Papanicolaou (17).

Algunos estudios evaluaron la inmunotinción aislada de p16 en citologías cervicales convencionales frescas, sin colorear; como en el de Ekalaksananan *et al.* (34), que concluyó que la combinación de la detección de p16 y VPH puede ser útil en la tamización del cáncer de cuello uterino para identificar pacientes de alto riesgo que requieren un manejo temprano y adecuado. El estudio de Pientong *et al.*, (35) confirmó la asociación de la sobreexpresión de p16^{INK4a} con infección por VPH-AR y sugirió que la tinción inmunocitoquímica de p16^{INK4a} en portaobjetos de citología convencional es conveniente y rentable para la detección del cáncer de cuello uterino mediante la detección de células displásicas infectadas con VPH-AR.

Los resultados de un estudio de los países bajos (37) que incluyó 256 láminas de citología convencional de archivo con anormalidades leves, mostraron que la tinción dual de p16/Ki-67 tuvo una especificidad significativamente más alta para NIC 3, que las pruebas de ADN de VPH-AR (64.4% vs. 57.6%). Para ambas pruebas, la sensibilidad para NIC 3 fue similar (100.0% vs. 96.3%). Durante el seguimiento a largo plazo, las pacientes con pruebas de ADN de VPH-AR positiva y tinción dual de p16/Ki-67 negativa no desarrollaron lesión de alto grado (NIC3+). Para la

aplicación de la tinción, el desmontaje de las láminas lo hicieron en xilol, y mencionan que en un grupo tuvieron un tiempo prolongado en la decoloración por lo que presentaron mucha tinción de fondo y fueron descartadas. Sin embargo, en el estudio no especifican los detalles del procesamiento de las láminas, por lo que no es posible compararlo con el presente estudio.

El estudio de Agresott *et al.* (19) que evaluó la inmunomarcación de p16/Ki-67 en 42 extendidos de citologías cervicales convencionales de archivo con diferentes categorías diagnósticas, obtuvo positividad para la tinción dual en el 7% (3/42) de los extendidos, de los cuales el 18% (2/11) de los reportados como LIE-AG presentaron la doble positividad, y ninguno de los casos de carcinoma escamocelular (0/5) y adenocarcinoma (0/1) mostraron la doble marcación. En comparación con este trabajo, a pesar de no seguir la misma metodología, ya que no se incluyeron todas las categorías diagnósticas de la citología cervical, hubo una doble positividad para p16/Ki-67 en el 75% (30/40) del total de los extendidos, y se observó una mejor tasa de positividad en los grupos de LIE-AG, carcinoma escamocelular y adenocarcinoma, ya que fueron positivos para la tinción dual 27/36 (75%), 2/3 (66.6%) y 1/1 (100%), respectivamente. En cuanto a la técnica usada en el estudio de Agresott *et al.*, fue muy similar a la de este estudio, sin embargo, se diferencia en que duplicaron el tiempo de incubación de los reactivos de visualización y aplicaron dos veces el reactivo de bloqueo de la peroxidasa. El tiempo de las láminas en xilol fue de 10 días para Agresott *et al.*, y de 2-3 días en el presente estudio, debido a que eran láminas más antiguas en su estudio. Sin embargo en este trabajo las láminas usadas eran más recientes, lo cual pudo influir en el resultado final, ya que obtuvimos un mayor porcentaje de tinción.

Varios estudios evaluaron la inmunotinción aislada de p16 en citologías cervicales convencionales de archivo (37, 38, 39). Torres *et al.* (37) incluyó en su estudio 53 citologías cervicales y 58 biopsias correspondientes a varias categorías diagnósticas, en las cuales aplicó inmunocitoquímica e inmunohistoquímica para p16, encontrando positividad en el 100% (14/14) de las citologías de LIE-AG, que

en comparación con nuestro estudio, a pesar de las diferencias metodológicas, fue mayor el número de casos positivos y concluyó que la expresión de p16 en citología convencional provee similares resultados que los de las muestras histológicas, por lo tanto es una técnica útil a la hora de manejar lesiones intraepiteliales de cérvix. Los pasos en el desmontaje y decoloración de las láminas fueron iguales a los realizados en este estudio, incluso se usó el mismo clon (E6H4) del anticuerpo, sin embargo, en el de Torres *et al*, el protocolo de tinción se realizó de forma automatizada en el inmunoteñidor Ventana Benchmarkt XT®, a diferencia de este estudio que fue manual (37).

En el estudio de Krivak *et al*. (38) se evaluó la tinción de p16 en láminas de citología convencional de varias categorías diagnósticas de mujeres pre y posmenopáusicas; algunos extendidos fueron recientemente tomados y otros de archivo. La conclusión final fue que no hubo diferencias en la reacción de tinción o en la intensidad de la reacción entre las láminas que fueron decoloradas y las frescas, además determinó que la inmunotinción de p16^{INK4a} es una herramienta muy útil para el diagnóstico citológico que permite distinguir LIE-AG de cambios normales, reactivos o inflamatorios. A diferencia de este estudio, para la decoloración de las láminas usaron HCL 0.5% y enjuagaron en agua destilada, con la posterior aplicación de la tinción inmunocitoquímica del estuche comercial CINtec™ p16^{INK4a} (clon E6H4) de forma automatizada en el módulo de tinción de DAKO (38).

En el estudio de Nieh *et al*. (39) se aplicó tinción de inmucitoquímica e inmunohistoquímica para p16 en 66 extendidos citológicos cervicales convencionales de archivo con diagnóstico de ASC-US y sus correspondientes biopsias, respectivamente, encontrando una clara asociación entre la tinción fuerte para p16 y la presencia de una lesión significativa en cérvix. La conclusión final fue que la inmunotinción de p16 puede ser aplicada con éxito en extendidos convencionales y puede servir como un biomarcador útil y objetivo en el triaje de citologías con ASC-US. Lo que respecta al procesamiento de las láminas, a diferencia de este estudio, fueron decoloradas con ácido alcohol 1% y la

recuperación antigénica se hizo con buffer citrato y Nonidet P40, que remueven el moco de los extendidos; siendo este paso crucial para la preservación de la calidad de la inmunotinción. Los autores de dicho estudio consideran que la inmunotinción de p16 presenta resultados efectivos en extendidos cervicales de rutina y puede ser un método conveniente para estudios inmunocitoquímicos retrospectivos, además de que sería más costo-efectivo que el procedimiento en citologías en base líquida (39).

En el presente estudio se incluyeron citologías cervicales convencionales con LIE-AG o carcinoma, se encontró positividad para la doble marcación inmunocitoquímica de p16/Ki-67 en la mayoría de los extendidos, lo cual se considera como un buen resultado, a pesar de que se esperaba encontrar la tinción dual en todas las láminas. Los casos de LIE-AG/NIC2 presentaron doble tinción en un alto porcentaje, exceptuando cinco casos que pudiesen corresponder a lesiones que aún no tenían integración del genoma viral y por tanto regresarían espontáneamente, o que pudiesen tratarse de lesiones simuladoras como una metaplasia escamosa inmadura (Figura 6).

En los casos de LIE-AG NIC 3, se observó doble positividad a la tinción en casi todas las citologías correspondientes, en las pocas que no tuvieron reactividad a los marcadores es posible que simplemente hubiesen perdido la antigenicidad. Del mismo modo, la mayoría de los casos de carcinomas confirmados por biopsia, tuvieron doble positividad para p16/Ki-67 y en los dos casos que no la presentaron pudo deberse a la presencia de abundante material hemático que haya interferido con la tinción o que se tratase de carcinomas no asociados a infección por VPH-AR (5), por lo que no sobreexpresan p16 (Figura 7).

Hay que tener en cuenta que los resultados en la inmunoreactividad también dependen del procesamiento previo que sufrieron las láminas, de la calidad y su conservación, y además debido a la distribución aleatoria de células anómalas en extendidos convencionales, es mejor teñir toda la lámina como lo recomienda el

fabricante (usar 300 micro litros de los reactivos por cada portaobjetos), ya que hay casos con pocas células displásicas que pudieran perderse en la evaluación por limitar el campo de aplicación del reactivo, como lo hicimos en el presente estudio.

No encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de almacenamiento y el resultado de la inmunotinción, sin embargo se sabe que es uno de los factores que afectan la inmunoreactividad de las células. (40). Son pocos los estudios que han documentado el periodo de tiempo en el que se empieza a afectar la antigenicidad e inmunoreactividad en citologías, en contraste con el conocimiento bien establecido en las muestras de tejido fijados en formalina y embebidos en parafina (41). Según Aoki *et al.* en láminas de citologías sin teñir y sin cubreobjetos, la antigenicidad disminuye después de 4 semanas (42). Maxwell *et al.* descubrió que el almacenamiento a temperatura ambiente de cytopins puede comprometer la inmunoreactividad de algunos marcadores, pero la aplicación de polietilenglicol conservó la inmunoreactividad hasta 8 semanas (43); mientras que, según un estudio esloveno, la inmunoreactividad en cytopins protegidas con PEG y almacenadas a temperatura ambiente se conserva bien durante al menos 12 meses para la mayoría de los biomarcadores (44). Extrapolando lo previamente dicho, es posible que algunas de las láminas usadas en este trabajo hayan perdido la antigenicidad y por ende no presentaron la tinción dual. (40, 42-44)

En este estudio evidenciamos que a pesar de las células inflamatorias, el detritus y el moco que normalmente se encuentran en preparaciones citológicas cervicales procesadas por técnica convencional, no intervinieron en la eficacia de la tinción.

Las limitaciones de este estudio radican en el tamaño de la muestra y la falta de uso de un control adecuado, aunque a pesar de que se utilizó una CBL procesada por técnica no estandarizada, se evidenció la tinción positiva en células con morfología de células displásicas. Se recomienda realizar estudios posteriores con una muestra de mayor tamaño, que incluya casos negativos, para hacer los resultados generalizables, donde se apliquen los reactivos en toda la lámina y usar un control

positivo adecuado, como por ejemplo una citología convencional fresca, sin colorear, bien fijada, con diagnóstico de carcinoma escamocelular o lesión de alto grado confirmada, y que incluyan tinción inmunohistoquímica para p16 en las biopsias con el fin de hacer una adecuada correlación de los hallazgos inmunocitoquímicos.

En el presente trabajo se demostró que la tinción dual inmunocitoquímica p16/Ki-67 en citologías convencionales funciona incluso en muestras almacenadas durante varios meses, lo que da paso a la realización de estudios para estandarizar y validar su aplicación en los casos que lo requieran en forma rutinaria. Luego de estandarizar apropiadamente la técnica se pudiera continuar con estudios de precisión diagnóstica.

En general, la tinción dual de p16/Ki-67 es una herramienta útil en la identificación de LIE-AG en citologías cervicales categorizadas como anormalidades leves (ASC-US, LSIL), o en reconocer pacientes con LIE-BG que tienen capacidad de progresión a una lesión de mayor grado, por lo que su implementación en los programas de tamización permitiría racionalizar los recursos y brindarles un tratamiento oportuno a estas pacientes, o evitar sobretratamientos en lesiones que regresarían espontáneamente. Las ventajas de esta prueba radican en la disminución de la variabilidad interobservador por ser una prueba objetiva; su fácil implementación, ya que el estuche comercial trae casi en su totalidad los reactivos a utilizar; además es una prueba costo-efectiva (45); de simple interpretación, que no depende de la morfología, y puede ser usada por personal no experto con buena reproducibilidad (46), teniendo en cuenta que cuando se recibe un entrenamiento adecuado se aumenta la concordancia (47).

CONCLUSIONES

Han sido numerosos los estudios que indican que la tinción dual de p16/Ki-67 puede ser usada como un biomarcador confirmatorio en los programas de tamización de detección del cáncer del cuello uterino, debido a su alta sensibilidad y especificidad

para identificar lesiones de alto grado. En nuestro estudio verificamos que la tinción dual de p16/Ki-67 tiene buenos resultados en citologías cervicales convencionales, lo que facilita el diagnóstico citológico, ya que al momento de hacer la evaluación de la inmunotinción, las células positivas a la biomarcación son identificadas rápida y fácilmente, incluso a menor aumento.

Las técnicas para el pretratamiento de estas láminas son variadas pero igual de efectivas, y la aplicación del protocolo de tinción debe seguirse según las recomendaciones del fabricante.

Debido a la masiva utilización de la citología convencional en Latinoamérica y Colombia, se recomienda realizar estudios con una muestra más representativa para lograr una adecuada estandarización de la técnica y continuar investigando la utilidad de la tinción dual p16/Ki-67 en este tipo de extendidos.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

FINANCIACIÓN

Este proyecto fue financiado por la Universidad de Cartagena como parte del megaproyecto “*Evaluación del desempeño diagnóstico de p16/Ki67 en la detección de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado del cuello uterino en pacientes con citología con atipias en células escamosas (ASC)*” del grupo de investigación Histopatología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Cancer Observatory [Internet]. France: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. World; 2019 May [cited 2019 June]; [about 2 screens].
2. Herrera Y; Piña P. Historia de la evolución de las pruebas de tamizaje en el cáncer cervicouterino. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015; 53(6):670-7.
3. Ministerio de Salud y Protección Social. Guía de Práctica Clínica para el manejo del cáncer de cuello uterino invasivo. Guía para profesionales de la salud. Colombia; 2014.
4. Kitchener HC, Almonte M, Thomson C, Wheeler P, Sargent A, Stoykova B, *et al.* HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): A randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10:672-82.
5. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Female genital tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 4).
6. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: End of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol* 2015; 136:189-97.
7. Cuzick J, Bergeron C, von Knebel Doeberitz M, Gravitt P, Jeronimo J Lorincz AT, *et al.* New technologies and procedures for cervical cancer screening. *Vaccine* 2012; 30 Suppl 5:F107-16.
8. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Eng J Med* 1998; 338:423–8.
9. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papiloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989; 243(4893):934-7.
10. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990; 248(4951):76-9.
11. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers* 2007; 23:315–30.

12. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, *et al.* p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews* 2009; Vol 35, Is (3): 210-220.
13. Hanan AlSaeid Alshenawy. Evaluation of p16, human papillomavirus capsid protein L1 and Ki-67 in cervical intraepithelial lesions: Potential utility in diagnosis and prognosis. *Pathology – Research and Practice* 210 (2014) 916–921.
14. Samarawardana P, Singh M, Shroyer KR. Dual stain immunohistochemical localization of p16INK4A and ki-67: A synergistic approach to identify clinically significant cervical mucosal lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011; 19:514-8.
15. Li Yu, Lingyan Fei, *et al.* Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers. *Journal of Cancer* 2019, Vol. 10.
16. Manual de instrucciones de uso del estuche comercial CINtec *PLUS* Cytology.
17. Schmidt D, Bergeron C, Denton K, Ridder R. p16/Ki-67 Dual-Stain Cytology in the Triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou Cytology. Results From the European Equivocal or Mildly Abnormal Papanicolaou Cytology Study. *Cancer Cytopathology* June 25, 2011.
18. Ikenberg H, *et al.* screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105: 1550-1557.
19. Barrios L, Agresott L. Expresión simultánea de los marcadores p16INK4a y Ki-67 en extendidos de citología cérvico-vaginal anormales de archivo. *Medicina & laboratorio* 2014; 20: 73-86.
20. Puerto de Amaya MB, Olaya-C. M, Corredor López EM, Pérez Moreno CH. Inmuntinción dual p16INK4a/ki-67 en citología vaginal en medio líquido: prueba piloto de complemento diagnóstico. *Univ. Med.* 2020; 61(1).
21. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, *et al.* Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287 (16): 2114 - 2119.
22. Nayar R y Wilbur D. The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol.* 2015; 123 (5): 271 – 281.
23. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, *et al.* Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2000; 132: 810-9.

24. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, *et al.* Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*. 2006; 119: 1095-101.
25. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, *et al.* 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *Obstet Gynecol*. 2013; 121: 829-46.
26. Meyer J, *et al.* Evaluation of p16INK4a Expression in ThinPrep Cervical Specimens with the CINtec p16INK4a Assay Correlation with Biopsy Follow-up Results. *CANCER (CANCER CYTOPATHOLOGY)* April 25, 2007 / Volume 111 / Number 2.
27. Peeters E, Wentzensen N, *et al.* Meta-Analysis of the Accuracy of p16 or p16/Ki-67 Immunocytochemistry Versus HPV Testing for the Detection of CIN2+/CIN3+ in Triage of Women With Minor Abnormal Cytology. *Cancer Cytopathology*. 2019.
28. Jones BA, Novis D. Cervical biopsy–cytology correlation. A College of American Pathologists Q-Probes study of 22 439 correlations in 348 laboratories. *Arch Pathol Lab Med*. 1996; 120:523–553.
29. Koo Y, Hahn H, *et al.* Dual immunostaining of cervical cytology specimens with atypical squamous cells for p16/Ki-67 does not exclude the existence of a high-grade squamous intraepithelial lesion. *Virchows Arch* (2013) 463:689–696.
30. Wright TC, Jr., Behrens CM, Ranger-Moore J, Rehm S, Sharma A, and Stoler MH, *et al.* Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol Oncol*. 2017; 144: 51-6.
31. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Luthge A, Bergeron C, *et al.* Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol*. 2011; 121: 505-9.
32. Kocken M, Helmerhorst TJ, Berkhof J, Louwers JA, Nobbenhuis MA, Bais AG, *et al.* Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term multi-cohort study. *Lancet Oncol*. 2011; 12: 441-50.
33. Polman NJ, Uijterwaal MH, Witte BI, Berkhof J, van Kemenade FJ, Spruijt JWM, *et al.* Good performance of p16/ki-67 dual-stained cytology for surveillance of women treated for high-grade CIN. *Int J Cancer*. 2017; 140: 423-30.
34. Ekalaksananan T, Pientong C, Sriamporn S, Kongyingyoes B, Pengsa P, Kleebkaow P, *et al.* Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol* 2006; 103:62–6.

35. Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kritpetcharat O, Swadpanich U, Pengsa P, *et al.* Immunocytochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human papillomavirus infection. *Diagn Cytopathol* 2004; 31:235–42.
36. Uijterwaal M, *et al.* Triaging borderline/mild dyskaryotic Pap cytology with p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: cross-sectional and longitudinal outcome study. *British Journal of Cancer* (2014) 110, 1579–1586.
37. Torres F, Fernández P, *et al.* Papel de p16 en lesiones preinvasivas e invasivas de cáncer de cuello uterino. Aplicación de la técnica a citología convencional. *Prog Obstet Ginecol.* 2011; 54(4):193—203.
38. Ines Krivak Bolanča, Srečko Ciglar. Evaluation of p16INK4a in Cervical Lesion, *Coll. Antropol.* 31 (2007) Suppl. 2: 107–111.
39. S. Nieh *et al.* Expression of p16INK4A in Papanicolau smears containing atypical Squamous cells of undetermined significance from the uterine cervix. *Gynecologic Oncology* 91 (2003) 201–208.
40. Lars-Inge Larsson. *Immunocytochemistry: Theory and Practice.* CRC Press. 1988. Page 6.
41. Grillo F, Pigozzi S, Ceriolo P, *et al.* Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Histochem Cell Biol* DOI 10.1007/s00418-015-1316-4
42. Aoki J, Sasaki N, Hino N, Nanba K. A study on the appropriate fixation for the procedures for the better preservation of cellular antigenicity and morphology of the blood smear in immunocytochemistry: an improvement of the immunostain technique using alkaline- phosphatase (ALP) as a labeling enzyme. *Rinsho Ketsueki.* 1991; 32:11- 18.
43. Maxwell, Patterson, Jamison, *et al.* Use of alcohol fixed cytopins protected by 10% polyethylene glycol in immunocytology external quality assurance. *J Clin Pathol* 1999; 52:141–144.
44. Srebotnik Kirbis *et al.* Preservation of biomarkers immunoreactivity on cytopins protected with polyethylene glycol. *Cytopathology.* 2020; 00:1–8.
45. Termrungruanglert W, *et al.* Cost effectiveness analysis of HPV primary screening and dual stain cytology triage compared with cervical cytology. *J Gynecol Oncol.* 2019 Mar; 30(2):e17. <https://doi.org/10.3802/jgo.2019.30.e17>.
46. Allia E, Ronco G, Coccia A, Luparia P, Macri L, Fiorito C, Maletta F, Deambrogio C, Tunesi S, De Marco L, Gillio-Tos A, Sapino A, Ghiringhello B. Interpretation of p16INK4a/Ki-67 dual immunostaining for the triage of human papillomavirus-positive

women by experts and nonexperts in cervical cytology. *Cancer Cytopathol.* 2015; 123:212–8.

47. Kloboves Prevodnik *et al.* Interobserver variability and accuracy of p16/Ki-67 dual immunocytochemical staining on conventional cervical smears. *Diagnostic Pathology* (2019) 14:48. <https://doi.org/10.1186/s13000-019-0821-5>.

TABLAS

Tabla 1. Distribución del diagnóstico por citología y biopsia

Diagnóstico	n	%
Citología convencional		
LIE-AG	36	90%
Carcinoma escamocelular	3	7.5%
Adenocarcinoma	1	2.5%
Biopsia		
LIE-AG, NIC 2	13	32.5%
LIE-AG, NIC 3	16	40%
Carcinoma escamocelular	9	22.5%
Adenocarcinoma	1	2.5%
Carcinoma indiferenciado	1	2.5%

Tabla 2. Distribución de tinción dual p16/Ki67 según diagnóstico

	Doble tinción p16/Ki67 presente n (%)	Ausencia de tinción dual p16/Ki67 o tinción incompleta n (%)	Valor p
Diagnóstico por citología			0.098
LIE AG	27 (75%)	9 (25%)	
Adenocarcinoma	1 (100%)	0 (0%)	
Carcinoma escamocelular	2 (66.6%)	1 (33.4%)	
Diagnóstico por biopsia			0.087
Adenocarcinoma invasor	1 (100%)	0 (0%)	
Carcinoma escamocelular	7 (77.7%)	2 (22.3%)	

Carcinoma indiferenciado	1 (100%)	0 (0%)	
LIE AG, NIC 2	8 (61.5%)	5 (38.5%)	
LIE AG, NIC 3	13 (81.2%)	3 (18.8%)	

Tabla 3. Distribución de tinción dual p16/Ki67 según aspectos técnicos

	Doble tinción p16/Ki67 presente n (%)	Ausencia de tinción dual p16/Ki67 o tinción incompleta n (%)	Valor p
Tiempo de almacenamiento	233.5 (219 – 253)	232 (220 – 245)	0.950
Tiempo de incubación anticuerpo primario			0.853
60 minutos	13 (76.4%)	4 (23.6%)	
75 minutos	17 (73.9%)	6 (26.1%)	
Tiempo en xilol			0.641
2 minutos	2 (100%)	0 (0%)	
2 días	24 (75%)	8 (25%)	
3 días	4 (66.6%)	2 (33.4%)	

FIGURAS

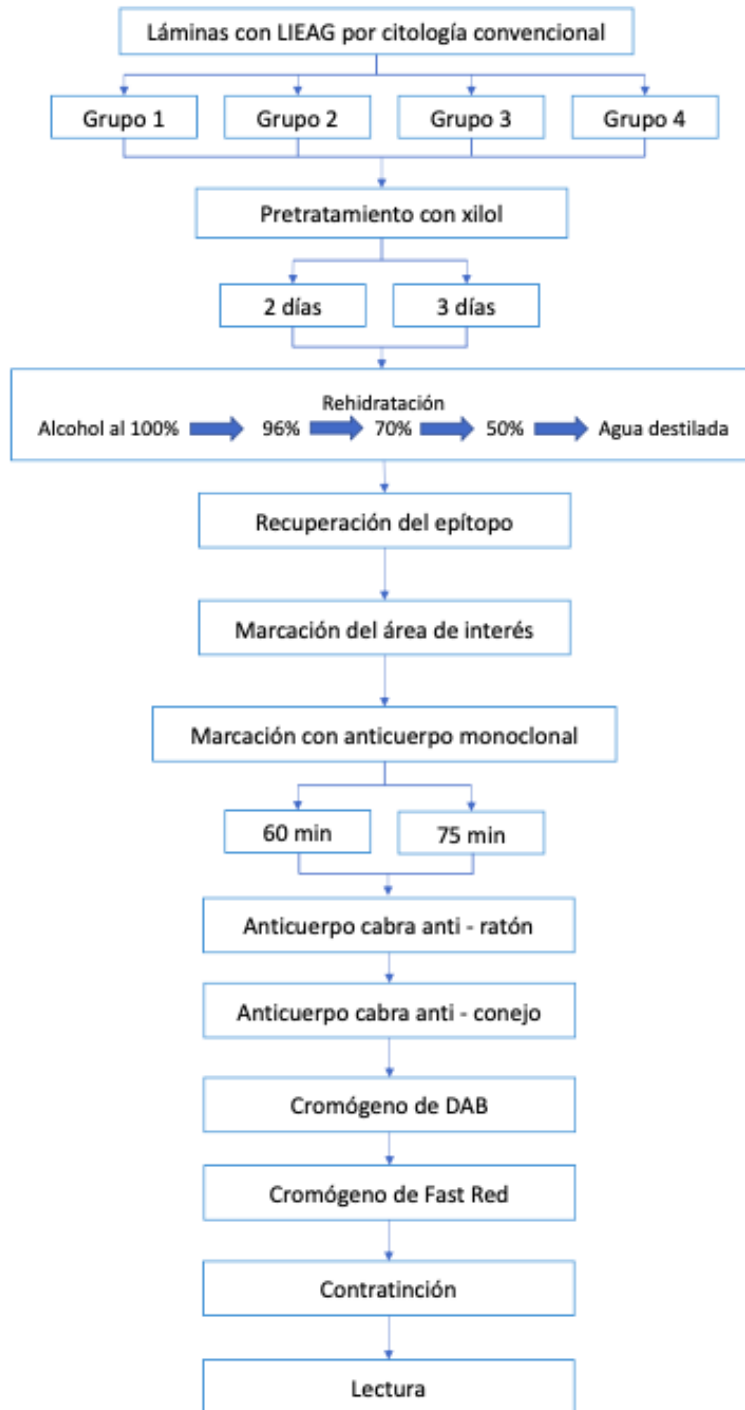


Figura 1. Proceso de implementación de piloto para estandarización de tinción con p16/Ki67 en láminas de citología convencional

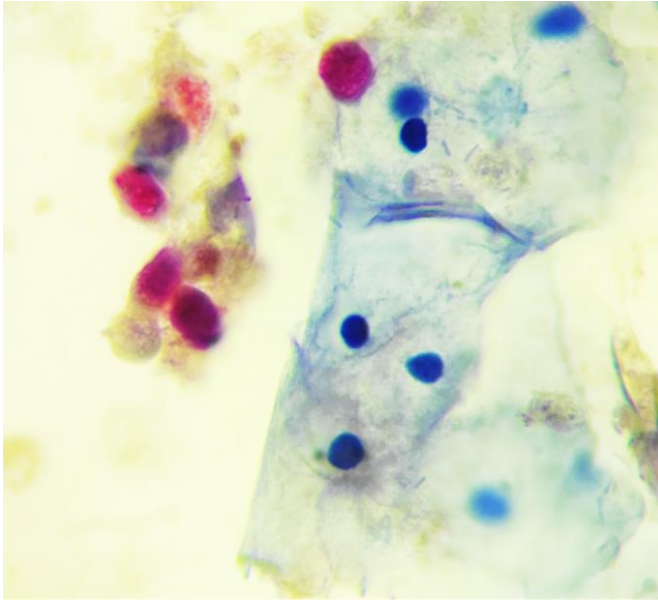
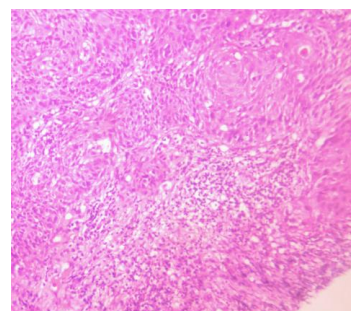
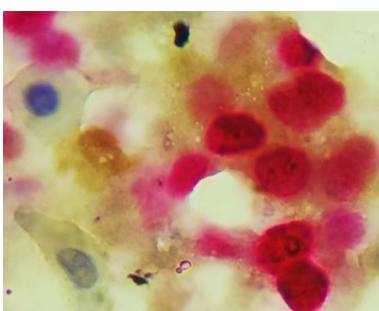
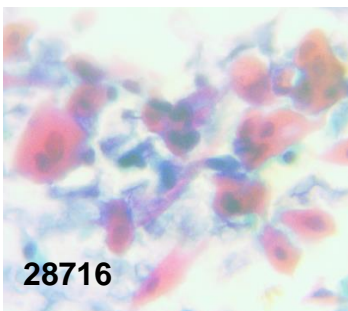
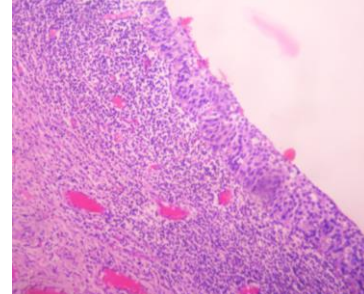
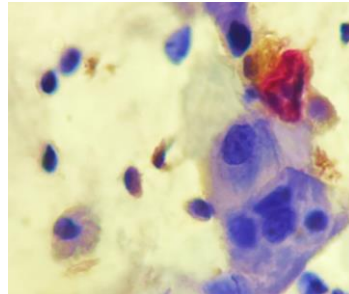
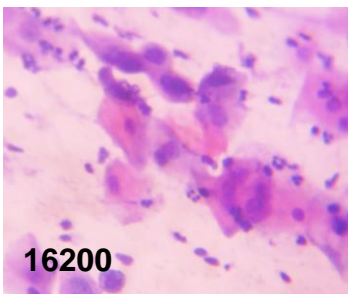


Figura 2. Citología cervical con carcinoma escamocelular positiva para inmunotinción dual p16/Ki-67 (núcleo rojo para Ki-67 y citoplasma café para p16). Se observa células normales negativas para la tinción dual, las cuales son el control negativo. Caso C2 1556.

Citología Tinción Pap

Inmunotinción p16/Ki-67

Biopsia



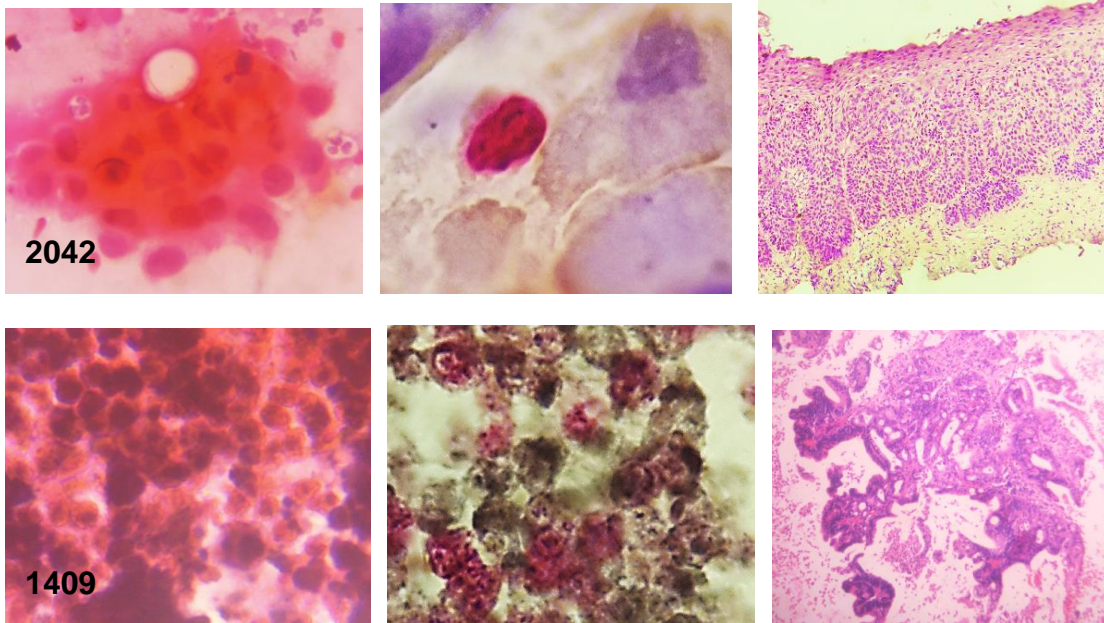


Figura 3. Citologías cervicales con tinción de papanicolau (Pap), positivas para la inmunotinción dual para p16/Ki-67, con la correspondiente biopsia con tinción de hematoxilina y eosina. (16200) LIE AG, NIC 3. (28716) carcinoma escamocelular. (2042) LIE AG, NIC 2. (1409) Adenocarcinoma.

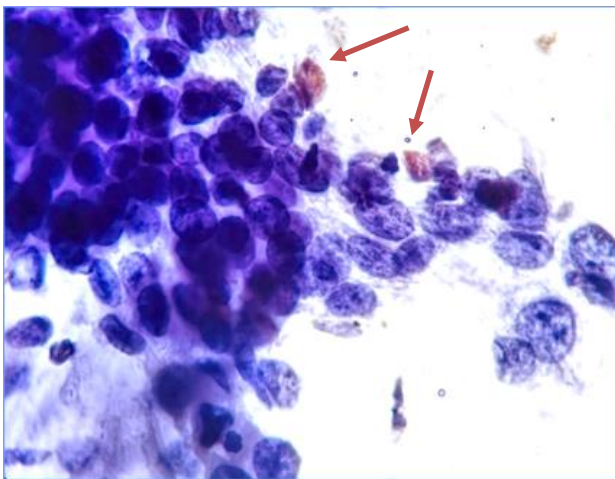


Figura 4. Citología cervical con tinción de p16/Ki-67 con marcación nuclear (flechas) positiva individual de p16.

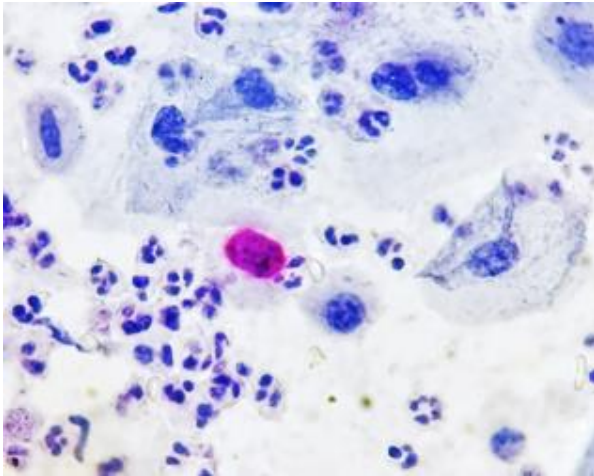
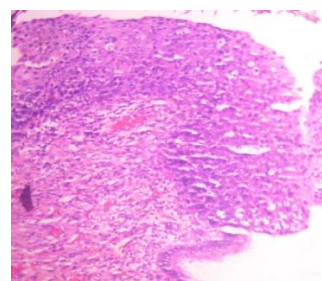
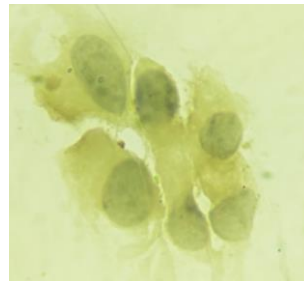
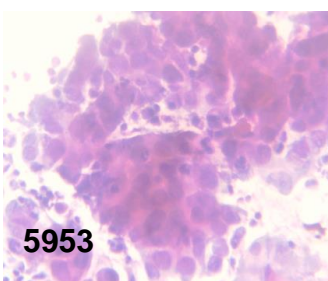
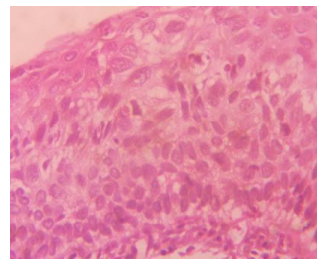
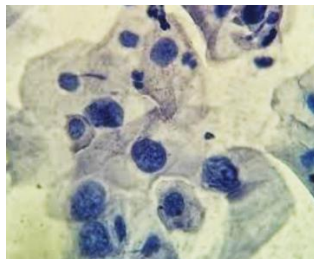
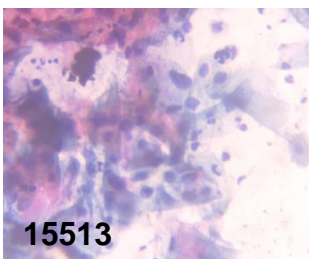
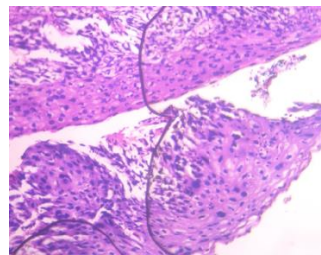
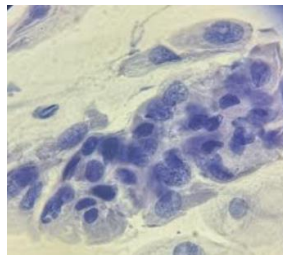
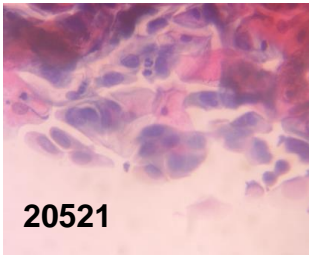


Figura 5. Citología cervical con tinción de p16/Ki-67 con marcación positiva únicamente para Ki-67.

Citología Tinción Pap

p16/Ki-67

Biopsia



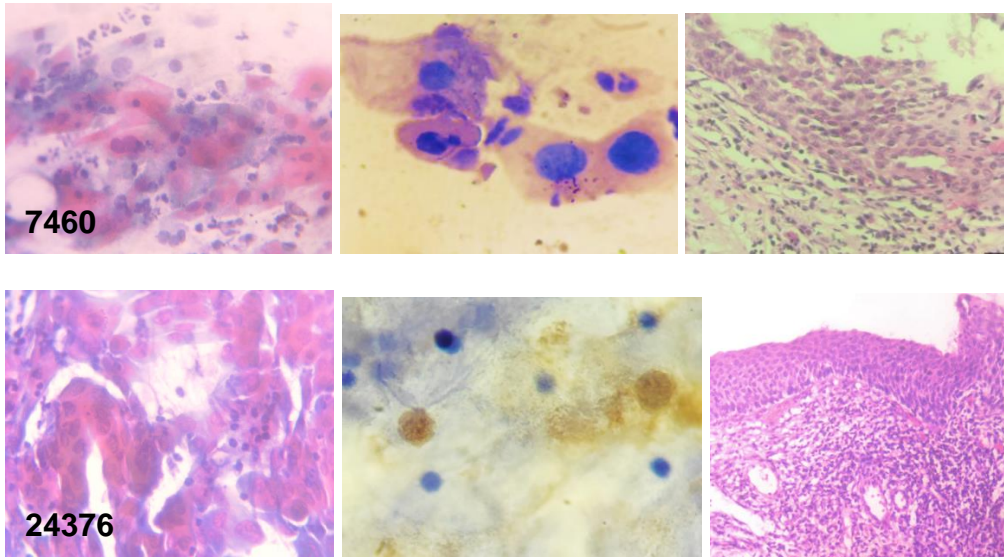


Figura 6. Citologías cervicales con tinción de papanicolau (Pap) reportada como LIE AG, negativa para la inmunotinción dual para p16/Ki-67, con la correspondiente biopsia con diagnóstico de LIE AG NIC 2. En 20521 y 15513 no hubo marcación. 5953 y 7460 presentaron tinción citoplasmática y 24376 tinción nuclear aislada para p16.

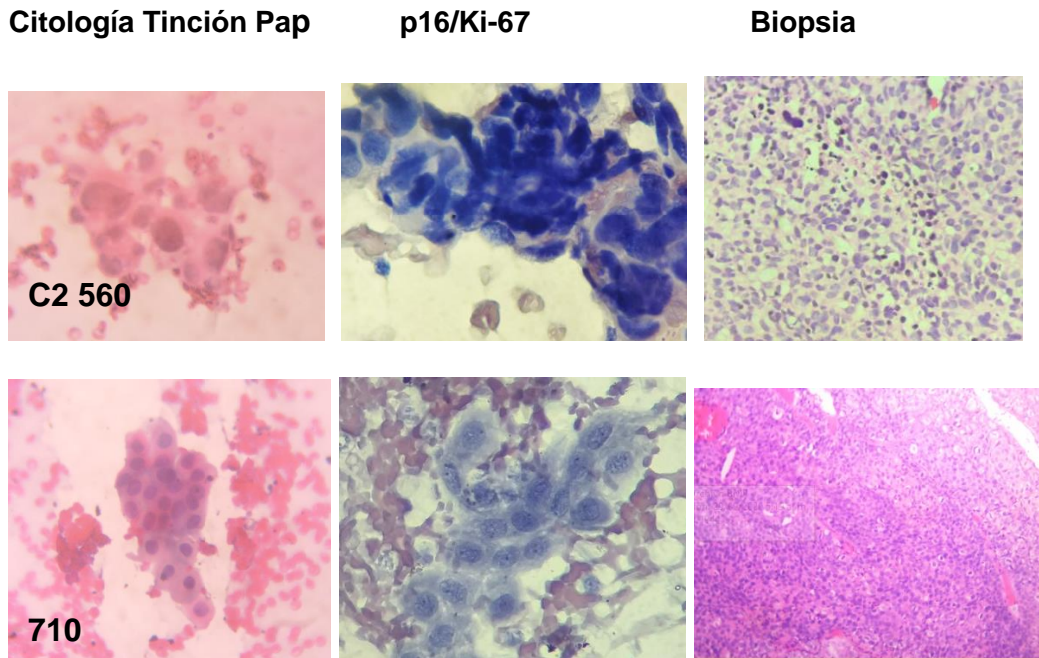


Figura 7. Casos de carcinoma escamocelular con inmunocitoquímica negativa para p16/Ki-67. En ambas citologías se observa abundante material hemático. (C2 560) Citología cervical reportada como carcinoma escamocelular y biopsia con diagnóstico de carcinoma escamocelular invasor, pobremente diferenciado. (710) Citología cervical reportada como LIE AG y biopsia con diagnóstico de carcinoma escamocelular invasor, pobremente diferenciado.

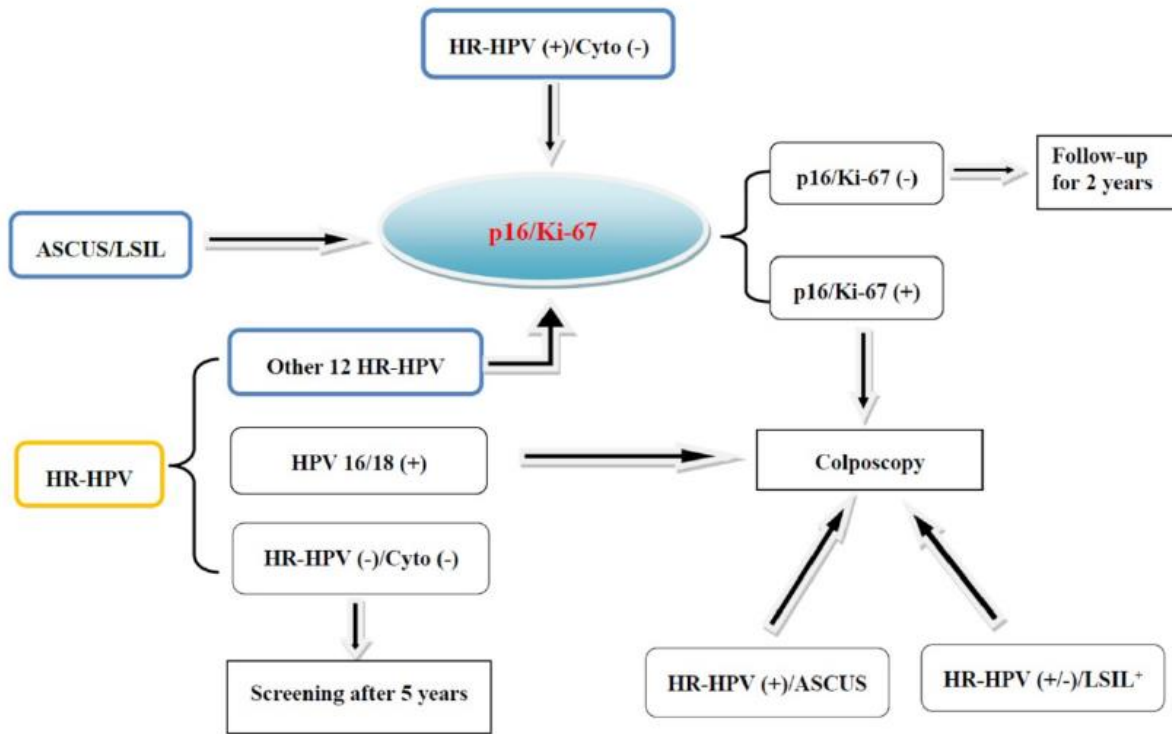


Figura 8. Aplicación de la tinción dual de p16/Ki-67. Tomado de Li Yu, Lingyan Fei, *et al.* Application of p16/Ki-67 dual-staining cytology in cervical cancers. *Journal of Cancer* 2019, Vol. 10.

ANEXO 1.

REACTIVOS DEL ESTUCHE COMERCIAL CIntec® PLUS CYTOLOGY

IV. Reactivos

Material suministrado

Cada kit incluye los siguientes materiales suficientes para realizar 50 pruebas. El número de las pruebas se basa en el uso de 200 µL de los reactivos por cada portaobjetos.

1 **Peroxidase-Blocking Reagent**

Reactivo de bloqueo de la peroxidasa

11,5 mL, listo para su uso

Peróxido de hidrógeno al 3% que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN₃).

La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

2 **Primary Antibodies Solution**

Solución de anticuerpos primarios

11,5 mL, listo para su uso

Anticuerpo monoclonal de ratón antihumano p16^{INK4a}, clon E6H4 y anticuerpo monoclonal de conejo antihumano Ki-67, clon 274-11 AC3, suministrado en 50 mM de tampón Tris, pH 7,2, que contiene 15 mmol/L azida de sodio (NaN₃) y proteína estabilizante.

3 **Visualization Reagent HRP**

Reactivo de visualización HRP

11,5 mL, listo para su uso

Reactivo de polímero conjugado con peroxidasa de rábano picante y fragmentos FAB de anticuerpos de cabra anti-ratón purificados, suministrado en una solución estabilizante con conservantes y proteína estabilizante.

Contiene 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano y puede causar reacciones alérgicas. La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

4 **Visualization Reagent AP**

Reactivo de visualización AP

11,5 mL, listo para su uso

Reactivo de polímero conjugado con fosfatasa alcalina y fragmentos FAB de anticuerpos de cabra anti-conejo purificados, suministrado en una solución estabilizante con conservantes y proteína estabilizante.

Contiene 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano y puede causar reacciones alérgicas. La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

5 **DAB Buffered Substrate**

Sustrato tamponado DAB

16,0 mL

Solución de tampón sustrato, pH 7,5, que contiene peróxido de hidrógeno < 0,1%, estabilizantes, potenciadores y un agente antimicrobiano.

6 **DAB Chromogen**

Cromógeno DAB

0,85 mL

Solución de cromógeno 3,3'-diaminobencidina.

La solución de cromógeno (DAB) es nociva. Consulte las siguientes frases de riesgo y seguridad:

R40 Posibles efectos cancerígenos.

R43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

R68 Posibilidad de efectos irreversibles.

S35 Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.

S36/37 Úsese indumentaria y guantes de protección adecuados.

NOTA: aunque la diaminobencidina está relacionada estructuralmente con la bencidina, no hay pruebas de la carcinogenicidad de la diaminobencidina. Consulte las normas nacionales, regionales o locales para la eliminación del producto.

La ficha de datos de seguridad se encuentra disponible bajo petición.

7 **Naphthol Phosphate Substrate**

Sustrato naftol fosfato

25,0 mL,

Solución de tampón sustrato, pH 9,2, que contiene naftol-AS-TR-fosfato como sustrato, estabilizantes, potenciadores y un agente antimicrobiano.

8 **Fast Red Chromogen**

Cromógeno Fast Red

1,33 mL, solución de cromógeno Fast Red.

9 **Epitope Retrieval Solution 10x**

Solución de recuperación del epítipo 10x

500 mL, 100 mM de EDTA, pH 8,0, que contiene 15 mmol/L de azida de sodio (NaN₃).

10 **CINtec® PLUS Mount**

Montaje CINtec® PLUS

18,0 mL, medio de montaje permanente con una base acuosa para la conservación permanente de los preparados en portaobjetos con tinción con peroxidasa y fosfatasa alcalina como sistemas de visualización. Contiene 7,7 mmol/L de azida sódica (NaN₃)

ANEXO 2.

MANUAL DE INSTRUCCIONES DE USO DEL ESTUCHE COMERCIAL CIntec® PLUS CYTOLOGY

VI. Procedimientos

Preparación de las muestras citológicas

Las muestras citológicas deben manipularse de manera adecuada para conservar adecuadamente dichas muestras para procedimientos de inmunocitoquímica. Sobre las muestras se deben realizar los métodos habituales de procesamiento celular.

Se pueden usar los portaobjetos ThinPrep® (Hologic™ Inc.) preparados de acuerdo con el protocolo del fabricante en un procesador de portaobjetos del sistema ThinPrep® 2000, (Hologic™ Inc.) o portaobjetos del sistema BD SurePath™ (BD Diagnostics Tripath) preparados de acuerdo con el protocolo del fabricante, así como portaobjetos preparados manualmente (frotis convencionales).

Los frotis convencionales deben fijarse con reactivo de fijación pulverizable (spray) para muestras citológicas que contenga polietilenglicol (p. ej., Merckofix®, Merck) inmediatamente después de la recogida de las muestras.

Procedimiento de tinción de portaobjetos

El kit incluye la cantidad de reactivos suficiente para realizar 50 pruebas. El número de las pruebas se basa en el uso de 200 µL de los reactivos por cada portaobjetos.

Se recomienda emplear 200 µL para procesar preparaciones citológicas de ThinPrep® o BD SurePath™ con el instrumento Dako o LabVision Autostainer (2 zonas de goteo por porta con 100 µL cada una) o si se utiliza el sistema Shandon Coverplate™ (Thermo Fisher Scientific Inc.).

También se recomienda emplear 200 µL por portaobjetos si se preparan frotis convencionales utilizando el sistema Shandon Coverplate™. Sin embargo, para asegurar la cobertura completa de frotis convencionales en Dako o los instrumentos LabVision Autostainer se recomienda utilizar 300 µL por portaobjetos (100 µL para las tres zonas de goteo accesibles).

2.1 Rehidratación de las muestras

Para todas las muestras citológicas es necesario realizar un paso de rehidratación antes de llevar a cabo el procedimiento de tinción. Este paso se debe llevar a cabo a temperatura ambiente (20 – 25°C).

A) ThinPrep® portaobjetos citológicos en base líquida y frotis convencionales:

- Coloque los portaobjetos en agua destilada o desionizada e incúbelos durante 10 (±3) minutos;
- Comience el procedimiento de tinción como se indica en la sección 2.2, Paso 1: Recuperación del epitopo.

2.2 Recuperación del epítipo

A) ThinPrep® portaobjetos citológicos en base líquida y frotis convencionales:

- Llene los contenedores de tinción resistentes al calor (plástico) con la solución de recuperación del epítipo diluida (véase Procedimiento, sección 1.1);
- Coloque los contenedores de tinción con la Solución de Recuperación del Epítipo en un Baño y caliente el baño y la solución de recuperación del epítipo a 95 – 99°C. Se debe controlar la temperatura dentro de los recipientes de tinción. Es muy importante ajustar el nivel de agua en el baño para asegurar que los recipientes se encuentre sumergidos al 80% en el agua. Tape los recipientes para estabilizar la temperatura y evitar la evaporación;
- Cuando la temperatura alcance los 95 – 99°C sumerja las muestras citológicas rehidratadas en la solución de recuperación del epítipo precalentada en los contenedores de tinción; por lo general, este paso reduce la temperatura dentro de los contenedores a menos de 90°C. Mantenga la sonda del termómetro dentro de los contenedores cerrando la tapa de los contenedores de tinción lo mejor que pueda;
- Lleve la temperatura del baño y de la solución de recuperación del epítipo nuevamente hasta 95 – 99°C.; controle la temperatura de la solución de recuperación del epítipo en los recipientes;
- Incube durante 10 (\pm 1) minutos a 95 – 99°C; no comience la cuenta atrás hasta que no haya verificado que la temperatura de la solución de recuperación del epítipo dentro de los recipientes haya vuelto a alcanzar una temperatura de 95 – 99°C;
- Retire el contenedor con los portaobjetos del baño;
- Retire la tapa de los contenedores de tinción y deje que los portaobjetos se enfrien en la solución de recuperación del epítipo durante 20 (\pm 1) minutos a temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura de 50°C o menor;
- Transfiera los portaobjetos a un recipiente de tinción lleno de tampón de lavado (véase Procedimiento, Sección 1.2) e incúbalos durante 5 (\pm 1) minutos antes de introducir los portaobjetos en el Autostainer programado. Si usa el sistema Shandon Coverplate™, reúna los portaobjetos y coverplates siguiendo el protocolo REF 2010-953-009ES (disponible en Roche mtm laboratories AG).

2.3 Protocolos de tinción

2.3.1 Protocolo de tinción para Autostainer Instruments (Dako, LabVision)

Antes de la primera utilización del CIntec® PLUS Kit en el Autostainer, debe crearse una nueva plantilla e incluir los reactivos del CIntec® PLUS Kit en la "Lista de reactivos" del Autostainer. Consulte el Manual del usuario del Equipo Autostainer correspondiente.

Se recomienda el uso de 200 µL por portaobjetos si se procesan preparaciones citológicas ThinPrep® o BD SurePath™. Si se emplean frotis convencionales con Dako o LabVision Autostainer puede ser necesario emplear 300 µL de los reactivos por portaobjetos.

A continuación se adjunta el resumen de la programación:

Paso del programa	Preparaciones citológicas ThinPrep® y frotis convencionales	Preparaciones citológicas BD Surepath™
1	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
2	Peroxidase-Blocking Reagent (Reactivo de bloqueo de la peroxidasa) 5 minutos	Peroxidase-Blocking Reagent (Reactivo de bloqueo de la peroxidasa) 5 minutos
3	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
4	Primary Antibodies Solution (Solución de Anticuerpo Primario) 30 minutos	Primary Antibodies Solution (Solución de Anticuerpo Primario) 30 minutos
5	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)

6	Visualization Reagent HRP (Reactivo de visualización HRP) 15 minutos	Visualization Reagent HRP (Reactivo de visualización HRP) 15 minutos
7	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
8	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
9	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
10	Visualization Reagent AP (Reactivo de visualización AP) 15 minutos	Visualization Reagent AP (Reactivo de visualización AP) 15 minutos
11	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
12	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
13	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
14	Switch (cambio)	Switch (cambio)
15	"Substrate" step: DAB (Paso "Sustrato": DAB) 10 minutos	"Substrate" step: DAB (Paso "Sustrato": DAB) 10 minutos

16	rinse (con agua destilada o desionizada)	Rinse (con agua destilada o desionizada)
17	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
18	"Substrate-batch" step: Fast Red (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos	"Substrate-batch" step: Fast Red (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos
19	rinse* (Lavado)	rinse* (Lavado)
20	---	Autostainer LabVision: "Substrate-batch" step: Fast Red (Paso "petición de sustrato": Fast Red) 15 minutos Autostainer Dako: "Substrate" step: Fast Red (Paso "Sustrato": Fast red) 15 minutos
21	----	rinse* (Lavado)
22	rinse (con agua destilada o desionizada)	rinse (con agua destilada o desionizada)
23	switch (Cambio)	switch (Cambio)

* utilice el tampón de lavado para los pasos de lavado (rinse)

2.4. Contratación con hemaxotilina

- Sumerja los portaobjetos en un baño de **hematoxilina sin alcohol**. Incúbelos durante 2 – 10 minutos dependiendo de la potencia de la hematoxilina sin alcohol empleada.

NOTA: Es absolutamente obligatorio emplear hematoxilina sin alcohol.

- Para el viraje a azul, coloque los portaobjetos en un baño de agua corriente o una solución alcalina como por ejemplo una solución amoniacal débil (NH₄OH, 0,08% en agua desionizada) e incubar de 30 segundos a 2 minutos;
- Para asegurar que toda la hematoxilina residual ha sido eliminada, a continuación reemplace el agua corriente del contenedor varias veces (3-5 veces) con agua corriente nueva hasta que no se puedan observar más residuos de tinción;
- Incube ligeramente los portaobjetos en un baño de agua destilada o desionizada.

NOTA: Dependiendo del tiempo de incubación y de la potencia de la hematoxilina utilizada, la contratación puede causar una coloración de color azul pálido a oscuro en los núcleos celulares. Una contratación excesiva o incompleta puede influir negativamente en la interpretación adecuada de los resultados.

2.5 Montaje

Para mantener un nivel óptimo de sensibilidad y evitar que se destiña el cromógeno Fast Red se tiene que realizar un procedimiento de montaje de dos pasos.

Después de la contratinción y el viraje a azul los portaobjetos deben ser montados utilizando un protocolo de montaje en dos pasos. Los pasos A y B deben realizarse de forma secuencial.

A) Cubreobjetos líquido

- Incubar los portaobjetos en agua destilada o desionizada durante al menos 1 minuto;
 - Retirar los portaobjetos del agua destilada o desionizada sin realizar un secado posterior;
 - Elimine el exceso de líquido sin permitir que las muestras se sequen; seque la parte inferior de los portaobjetos con cuidado con una toallita de papel para eliminar el agua;
 - Aplique 4 gotas de CINtec® PLUS Mount (1 gota equivale a 35 – 40 µL de este medio de montaje acuoso) por portaobjetos de citología líquida (LBC) y 8 gotas por frotis convencional, respectivamente. Evite la formación de burbujas de aire. Para evitar la formación de pequeñas burbujas se puede desechar la primera gota del medio de montaje sobre una toallita de papel antes de aplicar CINtec® PLUS Mount sobre las muestras;
 - Incline y mueva levemente el portaobjetos de cristal para crear una capa fina de medio de montaje y cubrir plenamente la muestra (¡NO aplique todavía un cubreobjetos de cristal o film!); Revise la distribución del medio de montaje líquido sobre el portaobjetos mediante una inspección visual.
-
- Para el secado, coloque los portaobjetos en posición horizontal:
 - a. Incube las muestras ThinPrep® o BD SurePath™ a una temperatura de 37-60°C durante 1 hora, o como alternativa puede dejarlos a temperatura ambiente durante toda la noche
 - b. Incube los frotis convencionales a una temperatura de 37°C durante 4 horas o a 60°C durante 1 hora, o como alternativa puede dejarlos a temperatura ambiente durante toda la noche

B) Cubreobjetos de cristal o film

- Después del secado completo de la solución de montaje acuosa, incubar los portaobjetos en xileno durante como mínimo 1 minuto y máximo 20 minutos. Posteriormente, cubrir los portaobjetos con un medio de montaje con una base de xileno;

NOTA: Los portaobjetos no se deben deshidratar con series ascendentes de alcohol antes de cubrirse con cristal o lámina.

- El medio de montaje con base de xileno deberá secar a temperatura ambiente.

NOTA: Para minimizar la pérdida de intensidad, proteja los portaobjetos de la luz y almacénelos en un lugar a temperatura ambiente (20 – 25°C).

