

**“BIO AUTO QUALITY”**

**CALIDAD DE LA INMUNOREACTIVIDAD**

**EN BIOMATERIALES DE ANATOMÍA**

**PATOLÓGICA**

Camila F. Mejías Orellana, 18.375.169-7, +56 9 81634883,  
[Camila.mejias.o@gmail.com](mailto:Camila.mejias.o@gmail.com)

Ailyn R. Rojas Agosto, 17.807.649-3, +56 9 96168719,  
[Rachel.agusto@gmail.com](mailto:Rachel.agusto@gmail.com)

Profesor Guía Pablo Olivero R., BQ, PhD  
[pablo.olivero@uv.cl](mailto:pablo.olivero@uv.cl)

Profesor Co-Guía Carlos Lozano B., MD, Msc  
[carlo.lburgos@gmail.com](mailto:carlo.lburgos@gmail.com)

Profesor Co-Guía Claudio Córdova L., TM, Msc  
[Claudio.cordova@uv.cl](mailto:Claudio.cordova@uv.cl)

## RESUMEN

A medida que la medicina se torna más especializada, emerge la necesidad de certificar la calidad de los procedimientos, para disminuir la incertidumbre asociada al proceso de observación y conclusión respecto a la evidencia. La evidencia empírica es el factor clave en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de los pacientes, siendo deber del profesional de salud brindar la mejor calidad de servicio.

Actualmente nuestros centros de salud de Chile no existen protocolos oficiales que verifiquen la calidad de los biomateriales contenidos en las muestras histológicas embebidas en parafina durante años. Específicamente, para la técnica inmunohistoquímica, una incorrecta manipulación y preservación ocasiona pérdidas de la inmunoreactividad del tejido, incidiendo directamente en el diagnóstico, pronóstico y terapéutica.

En este contexto, el presente estudio presenta un método de análisis y validación masivo de muestras “Bio Auto Quality” que, por medio de la clasificación digital, reducción física inmunoreactividad primaria permite evaluar la calidad del tejido y optimizar la interpretación de los resultados del análisis inmunohistoquímico en los laboratorios de histopatología.

De acuerdo con lo observado en este estudio podemos decir que el tiempo de fijación ideal para una muestra de  $0,5 \text{ cm}^3$  es de 8 horas hasta 18 horas, sin afectar la inmunoreactividad de la muestra, mientras que el tiempo de isquemia fría (retraso en la fijación) es de 0 horas, es decir, fijación inmediata. Tras analizar la cohorte de muestras del Hospital Carlos Van Buren con “Bio Auto Quality” se determinó que todas son muestras de alta calidad.

**PALABRAS CLAVES:** Calidad de tejidos, Cáncer de mama, Análisis cuantitativo, Inmunohistoquímica.

## LISTA DE ACRÓNIMOS

- **AC:** Anticuerpo
- **AG:** Antígeno
- **AP:** Anatomía patológica
- **CK:** Citoqueratinas
- **HER 2:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2
- **H-E:** Hematoxilina – Eosina
- **IG:** Inmunoglobulina
- **IHQ:** Inmunohistoquímica
- **IRI:** Índice en base a la inmunoreactividad
- **RE:** Receptor de estrógenos
- **RP:** Receptor de progesterona
- **TF:** Tiempo de fijación
- **TIF:** Tiempo de isquemia fría
- **TMA:** Microarreglo de tejido
- **TQI:** Índice de calidad de tejido
- **VIM:** Vimentina

# ÍNDICE

Resumen.....	2
Lista de acrónimos.....	3
Capítulo I Introducción.....	9
1.1 Laboratorio de anatomía patológica.....	9
1.2 Calidad en anatomía patológica.....	10
1.2.1 Desarrollo de la calidad en asistencia sanitaria.....	10
1.3 Argumentación del problema.....	24
Capítulo II Presentación del problema.....	25
2.1 Presentación del problema.....	25
2.2 Pregunta de investigación.....	25
2.3 Relevancia.....	25
Capítulo III Objetivos.....	26
3.1 Objetivo general.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
Capítulo IV Metodología.....	27
4.1 Tipo de estudio.....	27
4.2 Población.....	27
4.3 Muestra.....	27
4.4 Tipo de muestreo.....	27
4.5 Criterios de inclusión y exclusión.....	28

4.6 Variables en estudio.....	28
4.7 Fuentes y métodos de recolección de datos.....	30
4.8 Procedimiento y actividades.....	30
4.8.1 Diseño experimental.....	31
4.8.2 Preparación de muestras para curvas de calidad.....	31
4.8.3 Selección de muestra para la realización de la cohorte.....	33
4.8.4 Confección de Tissue Microarray.....	34
4.8.5 Cortes histológicos.....	35
4.8.6 Inmunohistoquímica.....	36
4.8.7 Recolección de imágenes para análisis computarizado.....	37
4.9 Plan de análisis.....	39
4.9.1 Evaluación de resultados.....	39
4.9.2 Plan de Análisis.....	40
Capítulo V Resultados.....	43
5.1 Obtener un algoritmo de clasificación automatizado de la inmunoreactividad (Bio Auto Quality), para caracterizar los tejidos en base a su calidad.....	44
5.2 Comparar la calidad del tejido con distintos tiempos de isquemia fría (TIF) y distintos tiempos de fijación (TF), utilizando Bio Auto Quality.....	46
5.3.- Caracterizar la calidad de una cohorte de cáncer de mama formada por muestras procesadas de forma estándar de acuerdo con el protocolo usado en el hospital Carlos Van Buren utilizando Bio Auto Quality.....	48
Capítulo VI Discusión.....	52
Capítulo VII Conclusión.....	55

Bibliografía.....	57
Anexos.....	66
Anexo 1. Procesamiento de tejido .....	66
Anexo 2. Tissue Microarray.....	74
Anexo 3. Inmunohistoquímica .....	78
Anexo 4. Protocolo de construcción de curvas de calidad .....	98
Anexo 5. Protocolo de construcción de Tissue Microarray .....	99
Anexo 6. Protocolo de tinción inmunohistoquímica para CK y VIM .....	100
Anexo 7. Imagen digital .....	101

**ÍNDICE DE TABLAS**

TABLA 1.1 Componentes del control de calidad en Patología (modificado por Barr J.) .....	23
TABLA 4.1 Tiempos de retraso de la fijación.....	32
TABLA 4.2 Distintos tiempos de fijación.....	33
TABLA 4.3 Evaluación de calidad.....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1 Diseño TMA para análisis de calidad.....	31
Figura 4.2 Esquema de procedimiento de confección de Tissue Micro Array.....	34
Figura 4.3 Histomoldes de TMA.....	35
Figura 4.4 Placa TMA 1.....	36
Figura 4.5 Placa TMA 2 y 3.....	36
Figura 4.6 Esquema de captura fotográfica.....	38
Figura 4.7 Posibles escenarios de la marcación inmunohistoquímica.....	39
Figura 4.8 Escala de grises de 1, 2, 3, 4 y 8 bits.....	41
Figura 5.1 Controles de calidad, Gráfico e Indicadores de calidad.....	45
Figura 5.2 Grafico tiempo de fijación.....	47
Figura 5.3 Grafico tiempo de isquemia fría.....	48
Figura 5.4 Tabla rangos de calidad, Gráfico intervalos de calidad, Gráficos calidad del tejido en distintos años, Gráfico relación calidad de ambos ac.....	50

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1: Subtipos tumorales de cáncer mamario de las muestras en estudio.....	43
---	----

## **I. INTRODUCCIÓN**

Los servicios de Anatomía Patológica (AP) son los responsables de recibir muestras histológicas para analizarlas, procesarlas y emitir un diagnóstico certero, además de proporcionar una serie de variables que constituirán factores pronósticos y predictivos para el tratamiento de enfermedades, representando un papel fundamental en el cuidado de los pacientes. La reducción de los errores médicos en esta disciplina es fundamental para cualquier sistema de salud, ya que, diagnósticos imprecisos o inadecuados tienen consecuencias inmediatas en el manejo y tratamiento de los pacientes e inciden en el ámbito económico, con el consiguiente uso incorrecto de los recursos disponibles (1,2).

### **1.1 LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**

La Anatomía Patológica es una de las áreas menos conocida de la medicina, inclusive para las personas relacionadas con las Ciencias de la Salud. Corresponde a la “Rama de la medicina que se ocupa del estudio, por medio de técnicas morfológicas, de las causas, desarrollo y consecuencias de las enfermedades. El fin último es el diagnóstico correcto de biopsias, piezas quirúrgicas, citologías y autopsias” (3). Esta especialidad médica constituye un importante cimiento, sin el cual, el resto de las otras especialidades difícilmente podrían funcionar de manera oportuna, ya que, se relaciona con todas las otras especialidades, contribuyendo a un estudio más completo de la enfermedad (4).

Se apoya sobre complejos y sofisticados procedimientos cuyo seguimiento y adecuación requieren ser evaluados y controlados, por el personal especializado en el laboratorio, dentro de ellos cabe destacar el rol del médico patólogo, profesional que tiene como misión el estudio de las muestras de tejidos, las que son procesadas en el laboratorio por el personal especializado y posteriormente examinadas al microscopio.

El trabajo del médico patólogo es de gran importancia, puesto que, según el diagnóstico que este efectúe, se basará la conducta terapéutica del especialista, lo que repercutirá en el pronóstico y posible tratamiento de la enfermedad. Dada la gran importancia de la labor del patólogo, los centros hospitalarios de alta complejidad cuentan con un laboratorio de Anatomía Patológica, donde se reciben las muestras y se procesan para finalmente examinar las láminas

histológicas al microscopio y así emitir un diagnóstico certero. En el anexo 1, se puede encontrar en detalle todo lo concerniente al procesamiento de los tejidos.

## **1.2 CALIDAD EN ANATOMÍA PATOLÓGICA**

Los servicios de AP tienen un papel fundamental en el cuidado de los pacientes, por lo tanto, la reducción de los errores interpretativos en esta disciplina es primordial para cualquier sistema de salud. Diagnósticos erróneos, imprecisos o inadecuados tienen consecuencias inmediatas en el manejo y tratamiento de los pacientes y de tipo económicas, con el consiguiente uso incorrecto de los recursos disponibles. Por lo tanto, el objetivo genérico de la calidad debe ser disminuir en el mayor porcentaje posible el número de errores en los diagnósticos anatomopatológico (5).

Referirse a Calidad cuando se aplica a la asistencia sanitaria y más aún si es a la especialidad de AP, puede resultar complejo, por la diversidad en la interpretación y aplicación del significado (6). Y como es un concepto que ha ido variando a lo largo del tiempo, para comprenderla a cabalidad, se describirán los antecedentes para contextualizarla en asistencia sanitaria.

### **1.2.1 Desarrollo de la calidad en asistencia sanitaria**

#### *1.2.1.1 Antecedentes históricos*

En el ámbito sanitario las primeras formas de regulación de la práctica se encuentran en el Código de Hammurabi, en el antiguo Egipto (estándares de práctica médica de unos 4.000 años), en el 1.000 a.C. en China (regulando las competencias profesionales), o en el trabajo de Hipócrates de Cos, 500 años a. C., que recoge las primeras bases éticas y legales de obligado cumplimiento para los médicos y que aún hoy siguen vigentes. Otra contribución importante fue la de Galeno (200 d.C.), quien publicó “Methodo medendi” (Sobre el arte de la curación), estandarizando el conocimiento médico de la época y que estuvo en vigencia quince siglos y Vesalio que publicó en 1.600 un tratado de anatomía humana (7).

También son importantes los primeros trabajos de evaluación sistemática de la práctica clínica, que tratan de evaluar y conocer los resultados de la atención sanitaria. Dentro de éstos cabe mencionar el tratado sobre “Política Aritmética”, escrito en el Siglo XVII por Sir. W. Petty, donde intentaba comparar la calidad de la asistencia de los hospitales de Londres y Paris. Y los trabajos a finales del siglo pasado de Sir. W. Fahr sobre mortalidad hospitalaria de y F. Nightingale sobre infección quirúrgica y A. Codman en el área quirúrgica. Tras estas experiencias puntuales de evaluación de la atención sanitaria, los primeros años del Siglo XX, dan inicio a la evaluación sistemática de la calidad de la atención sanitaria y abre el período de lo que se ha venido a denominar como el pasado reciente (6,7).

#### *1.2.1.2 Antecedentes del Siglo XX*

A mediados del Siglo XX, la Comisión Conjunta de Acreditación de Hospitales en EE. UU. Comenzó a exigir estándares de calidad a los hospitales. Sin embargo, la calidad asistencial le debe a Awedis Donabedian su desarrollo en los términos en los que hoy día la conocemos. Fue el, quien en el año 1966 escribió y analizó los estudios sobre la evaluación de la calidad asistencial publicados, ordenándolos en términos de la estructura, el proceso y los resultados (8), clasificación que tiene vigencia hasta hoy en día.

En el año 1972, con el objetivo de revisar la calidad de la asistencia que impartían los hospitales que utilizaban los programas Medicare y Medicaid, surgió en EE. UU. la Organización de Revisión de Normas Profesionales (PSRO por su sigla en inglés) (7).

J. Wennberg en el año 1973 inicia sus primeros trabajos sobre las variaciones de la práctica clínica entre diferentes áreas geográficas de Estados Unidos (9).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su Objetivo 31 de “Salud para todos en el año 2000” para la Oficina Regional Europea en 1980 estableció: *“De aquí a 1990 todos los Estados miembros deberán haber creado unas comisiones eficaces que aseguren la calidad de las atenciones a los enfermos en el marco de sus sistemas de prestaciones sanitarias”. “Se podrá atender este objetivo si se establecen métodos de vigilancia, continúa y sistemática, para determinar la calidad de los cuidados prestados a los enfermos, convirtiendo las actividades de evaluación y control en una preocupación constante de las actividades habituales de los profesionales sanitarios, y finalmente, impartiendo a todo el personal sanitario una formación*

*que asegure y amplíe sus conocimientos”* (7). Enunciando este problema y planteando las posibles soluciones, la OMS hacía énfasis en que la evaluación de la calidad de los cuidados no se debe limitar únicamente al nivel del desarrollo técnico o de experiencia, puesto que, es una responsabilidad que concierne a todos los distintos tipos de trabajadores; profesionales de la sanidad, autoridades, investigadores y beneficiarios (6).

En 1988 P. Ellwood propone el desarrollo de un programa nacional para Estados Unidos, donde se busca orientar los resultados de la asistencia sanitaria (Gestión de Resultados) en pos de desarrollar un diseño para estándares y guías de práctica clínica (7).

Y en el año 1989 D. Berwick propugna la “Mejora Continua”, como un modelo de mejora de la asistencia sanitaria, extrapolado del modelo industrial, válido para los servicios sanitarios (10).

La Comisión Conjunta en 1990, impulsa con la llamada agenda para el cambio, la incorporación de los modelos de (Mejora Continua de Calidad) CQI (por su sigla en inglés) y la necesidad de orientar los programas hacia la evaluación de resultados y a implicar a todos los profesionales en los proyectos de mejora (7).

Calidad, responsabilidad y costes son los tópicos que interesan a los Sistemas de Salud hoy en día. Si las décadas de los años 1960 – 70 se caracterizaron por la expansión y el desarrollo científico y tecnológico, las décadas siguientes, lo están siendo por la necesidad de disminución de los costos asociados. Se está iniciando en la actualidad la etapa en que la necesidad de consenso y de evaluación en el campo sanitario en la que es de vital importancia comprender a cabalidad que es y que implica la calidad.

### *1.2.1.3 Error en Anatomía Patológica*

En Noviembre del año 1999, el IOM (Institute of Medicine) emitió un informe sobre la prevalencia y consecuencias de los errores médicos, en el que se afirmaba que hasta 98.000 estadounidenses hospitalizados fallecían anualmente por este tipo de errores (11). Este informe despertó el interés en los errores médicos, lo que condujo a políticos, periodistas y abogados a interesarse en áreas de la medicina, que hasta el momento habían recibido poca atención (12). Unos cuatro meses después de la publicación del informe del IOM, el foco de atención se dirigió a la Unidad de Anatomía Patológica, cuando el New York Times publicó un artículo en el que se

discutía un trabajo del Johns Hopkins Medical Center sobre segunda opiniones para estimar que aproximadamente 30.000 diagnósticos anuales de cáncer en EEUU eran erróneos (13). A raíz del informe del IOM se creó por mandato presidencial un “Centro para la Seguridad del Paciente” en los EEUU y aumentó la presión para que se declarasen obligatoriamente los errores médicos (14). En unos pocos años los errores médicos en los EEUU han pasado a considerarse un problema de proporciones epidémicas (15). No obstante, resulta evidente que el error, más que una aberración, es una parte intrínseca de la práctica médica y que incluso médicos excelentes cometen ocasionalmente errores de nefastas consecuencias (15).

En Chile, la Intendencia de Prestadores en apoyo a la acreditación de los laboratorios de Anatomía Patológica, creó guías que norman los procedimientos y contribuyen en la identificación de los errores de la trazabilidad de la biopsia, pero no entregan datos estadísticos (16), en comparación con la existente en otros países, que permita determinar los casos de “errores médicos”. por lo que, la mejora en la seguridad de la atención del paciente y la prevención de los errores se ha convertido en un objetivo fundamental de los sistemas de salud (5).

Los servicios de Anatomía Patológica tienen un papel esencial en el cuidado de los pacientes, por tanto, la reducción de los errores médicos en esta disciplina es primordial, ya que, la emisión de diagnósticos anatomopatológicos acertados y reproducibles, es el objetivo principal y la piedra angular del tratamiento de enfermedades oncológicas y no oncológicas (5). Diagnósticos erróneos, imprecisos o inadecuados tienen consecuencias inmediatas en el manejo y tratamiento de los pacientes, y también representan un impacto en el área económica, con el consiguiente uso inadecuado de los recursos disponibles, es por ello, que el objetivo genérico de calidad debe ser disminuir en todo lo posible el número de errores en los diagnósticos anatomopatológicos (5). Sin embargo, sin una adecuada definición del término “error”, no es posible establecer objetivos de calidad, ni mecanismos de control de procedimientos adecuados de corrección y mejoras (5).

El papel del patólogo es aplicar los conocimientos actuales para la correcta interpretación de los casos a los que se enfrenta. No obstante, debido a la complejidad del proceso diagnóstico, hay un buen número de oportunidades de llegar a una conclusión errónea. Una acertada definición de lo que es un error, podría ser “un acto involuntario (por acción u omisión) o que no logra el propósito pretendido (17). Pero, esta definición no es del todo correcta o completa

y exige algunas matizaciones, puesto que, no es lo mismo un acto médico que no cumple los requisitos o estándares mínimos en el momento en que se hace (negligencia) que las variaciones en dicho acto médico propias de diferentes opiniones aceptadas o de diferentes tecnologías, ya que, no siempre que el resultado no es el esperado, se está ante una negligencia (18). Tampoco es necesariamente un error un diagnóstico que posteriormente sea cambiado por la opinión de un experto. Aunque pueda parecer razonable asumir que, si dos patólogos diagnostican de manera diferente una misma lesión, uno de los dos diagnósticos ha de ser erróneo, esto no es necesariamente cierto, basta con leer la enorme cantidad de bibliografía sobre la variabilidad interobservadores de muchas lesiones o de la gradación de ellas (18). Ejemplos de esta variabilidad son entre otros la afirmación del “The non-Hodgkins Lymphoma project” (19), de que el 1,8% de los casos de linfoma no Hodgkin que revisaron no eran linfomas. Asumiendo que todos los hospitales de EEUU tuvieran la misma capacidad diagnóstica que los componentes de este grupo, aparecerían al año, alrededor de 1000 casos con diagnósticos falsos positivos de linfoma no Hodgkin (20). Hay estudios sobre la variabilidad interobservadores con resultados muy variados, debido a que la variación recogida en estos estudios es influenciada por la selección de casos, la habilidad diagnóstica de los participantes, la clasificación que se utilice y la disponibilidad de técnicas especiales (15). En estos estudios, cuando hay disparidad en los diagnósticos, el diagnóstico correcto se establece comparando con un estándar de consenso (por ejemplo, una alteración molecular conocida). Si no existe este estándar de consenso, se considera correcto el diagnóstico con mayor número de votos o aquel que hizo el patólogo de más “prestigio” (21).

Aun así, no todos los “errores” tienen las mismas implicaciones posteriores e incluso en algunos casos el término “discrepancia” sustituye y debe sustituir al término “error”. Aunque no es una definición unánimemente aceptada y es posible que esté sujeta a interpretaciones y revisiones posteriores, el Colegio Británico de Patólogos en 2006 propuso la siguiente clasificación (5):

- *Categoría 1*: Un error diagnóstico que es muy probable que tenga una influencia definitiva en el manejo clínico y en la evolución posterior.
- *Categoría 2*: Un error de interpretación o de supervisión con potencial de influir en el manejo clínico y en la evolución posterior.

- *Categoría 3:* Una discrepancia menor en la categorización de una enfermedad con poca o nula significación clínica.

Los errores de la categoría uno, se consideran de tipo operacional o técnico. En este grupo se incluyen las muestras mal etiquetadas, pacientes mal fichados o con información errónea o incompleta y muestras perdidas. Pero también incluiría tejidos mal fijados, mal incluidos, mal cortados o teñidos. E incluso a casos con técnicas inmunohistoquímicas o moleculares mal realizadas. Obviamente, una mala técnica puede inducir errores diagnósticos o al menos aumenta la variabilidad diagnóstica (22).

En la categoría dos, los errores se producen cuando los estándares o los criterios diagnósticos de una determinada lesión no están perfectamente establecidos, lo que conduce a diferencias de opinión que pueden interpretarse como error, o bien cuando la interpretación de los hallazgos es difícil o controvertida. Ejemplos de este tipo de errores se pueden apreciar en lesiones que forman parte de un espectro que va desde la benignidad a la malignidad: Diagnóstico de nevus displásico/ melanoma; mielodisplasia de alto grado/ leucemia aguda mieloblástica; hiperplasia epitelial ductal/ hiperplasia epitelial atípica ductal/ carcinoma ductal “in situ” de bajo grado/ carcinoma ductal “in situ” de alto grado. Otros errores que corresponden a esta categoría serían aquellos producto de una interpretación equivocada del inmunofenotipo de un tumor o de algunas características moleculares de este que conlleven a categorizarlo erradamente (22).

Finalmente, los errores de pertenecientes a la categoría tres, se producen cuando no se siguen criterios bien definidos, establecidos, consensuados y aceptados por la comunidad de Patólogos. Estos errores pueden explicarse meramente por falta de conocimiento (“solo se diagnostica lo que se conoce”). En este grupo se incluyen aquellos errores que se cometen por “pasar por alto” o por malinterpretar datos presentes en la preparación histológica (23). Se incluyen también en esta categoría, aquellos errores producto de una mala interpretación no del inmunofenotipo sino de la inmunotinción (por ejemplo valorar como positivo un marcaje para CD30 que no sea globular) (22).

Los psicólogos han agrupado el error en tres tipos que se superponen bastante bien con las subdivisiones que se mencionaron con anterioridad: 1) lapsus y fallos basados en la habilidad, 2) errores basados en reglas y 3) errores basados en el conocimiento. Curiosamente, las diferencias entre el novicio y el experto se deben más a las habilidades y reglas, que al conocimiento

propiamente tal. Si se manejan bien los dos primeros, se debe saber cuándo un caso hay que referirlo para una segunda opinión (18).

Existe además multitud de actitudes que tienden a sesgar el diagnóstico y por lo tanto, a producir errores: la tendencia a buscar datos que confirmen la hipótesis, a minusvalorar la importancia de la evidencia negativa, a ser influenciados por el contexto; la tendencia a usar más aquellos diagnósticos que más se manejan o a encerrarse con el primer diagnóstico y no dar cabida a otro probable (18).

A pesar de todo lo anterior sigue habiendo un cierto nivel de incertidumbre ya que la detección de errores o discrepancias en un alto porcentaje de casos dependerá de la comparación con un gold standard, referencia perfecta que no siempre es accesible o posible (5).

En el proceso diagnóstico, se pueden distinguir tres fases: 1) fase preanalítica, 2) fase analítica y 3) fase postanalítica, donde se ejecutan procesos diferentes con características distintas y son fuente de diferentes tipos de error. A su vez precisan también de medios no siempre disponibles, así como de un adecuado entrenamiento de todos los implicados en cada fase. Por último, cada una de las fases de este proceso precisará de diferentes instrumentos de control que deben implantarse y desarrollarse de una forma armónica (14).

## **I Fase preanalítica:**

La etapa preanalítica, es la que incluye todos los procesos desde la solicitud del análisis por parte del clínico, envío de la muestra al laboratorio, su identificación; con la correcta información de filiación y clínica, hasta el procesamiento de la muestra véase anexo 4 (1).

Hay muchas evidencias de que la mayor parte de los errores se generan en esta fase, por lo que se pueden realizar una serie de consideraciones respecto al manejo y el procesamiento de las muestras recibidas en el laboratorio de Anatomía Patológica (5).

La primera consideración, tiene que ver con la automatización de los distintos pasos del proceso, en medida de lo que sea posible. La implementación de sistemas de automatización permite una mejor estandarización de los procedimientos, un control más eficaz de los resultados, un análisis más simple y eficaz de los posibles defectos y una corrección más rápida de los mismos

(5). A continuación, se explicarán más a detalle, los errores que se presentan en el procesamiento de la muestra:

**a) Recepción e identificación de las muestras:** Los problemas de identificación y etiquetado han sido definidos como cualquier discrepancia entre la información del formulario de solicitud de biopsia y la etiqueta que acompaña la muestra recibida en el laboratorio. También se puede considerar como error de identificación cualquier resultado que fue reportado para un espécimen incorrecto (o lo habría sido sin alguna intervención) (16). En esta fase, el uso de sistemas informáticos, reduce notablemente la posibilidad de errores humanos (5). Su alcance es amplio y abarca:

- *Muestras mal etiquetadas:* Aquellas en que uno o los dos identificadores del paciente no son correctos, por ejemplo, una muestra con una etiqueta de un paciente diferente, dos etiquetas contradictorias en una misma muestra, o etiquetas cuyos datos no coinciden exactamente con los de la solicitud (incluyendo los datos del paciente u origen de la muestra) (16).
- *Muestras sin etiqueta:* Muestras recibidas en el laboratorio sin etiqueta o sin ningún tipo de identificación del paciente en la etiqueta (16).
- *Muestras parcialmente etiquetadas:* Muestras con etiqueta que contiene solo una forma de identificación del paciente (por ejemplo, solo el nombre o solo el número de historia clínica). Etiqueta sin el órgano o muestra que contiene el frasco (16).
- *Solicitudes incompletas:* Muestras recibidas con una solicitud que no incluye al menos dos identificadores del paciente, o la información adicional requerida para su procesamiento correcto (por ejemplo, que no se haya enumerado él o los frascos de cada caso) (16).
- *Etiqueta ilegible:* Aquellas en las que los identificadores del paciente no pueden ser leídos manual o electrónicamente de un modo confiable (16).

En la fase preanalítica, los errores incluyen (24):

1. En el frasco que contiene la muestra o en el portaobjetos con el frotis:
  - Etiquetado con un nombre de paciente incorrecto o sin nombre.
  - Error en el número de historia clínica
  - Falta de etiquetado
  - Errores tipográficos de distinta magnitud
  - La falta o error de etiquetado de las diferentes muestras u órganos de un mismo paciente. Por ejemplo, un caso con dos bolsas y cinco frascos que incluyan estómago, bazo, ganglios de distintos orígenes, tejido adiposo y piel; o casos de órganos bilaterales en los que no se especifica de qué lado es cada muestra; o muestras de piel de distintos sitios en los que solo diga “piel” o solo mencione el diagnóstico.
  
2. En el formulario de solicitud:
  - Identificación incorrecta del paciente o falta de identificación
  - Error u omisión de la lateralidad de la muestra
  - Error u omisión del tejido a que corresponde a cada una de las muestras
  - Errores tipográficos de distinta magnitud

A lo anterior se debe sumar los casos de “contenedor vacío”, que son recibidos sin muestra, o con muestra, pero sin fijador. También cabe destacar los casos cuando la muestra viene inmersa en agua o alcohol incidiendo en el deterioro del tejido (16).

**a) Fijación, descripción macroscópica y muestreo tisular:** Para evitar posibles deficiencias en esta fase, debe disponerse de protocolos estandarizados accesibles para cualquier miembro del equipo de trabajo del laboratorio. Es por ello, que en el proceso de protocolización diagnóstica deben incluirse los aspectos de fijación, disección, descripción y muestreo adecuados para cada tipo de muestra. Al igual que en el caso de la recepción e identificación de muestras, los sistemas informáticos pueden ayudar a dirigir estas actividades, así como recopilar la información necesaria (demora en la fijación, tipo de fijador, tiempo de fijación) (5).

**b) Procesamiento del tejido, sección, tinción, montaje y etiquetado de las muestras:** Al igual que en los puntos anteriores, los sistemas automatizados son fundamentales para el control de estos aspectos. Además de los sistemas informáticos (recopilación y manejo de los datos relevantes), impresoras de casetes, procesadores, teñidores y montadores automáticos de tejido, facilitan el manejo de estas fases del proceso (5).

## **II Fase analítica:**

Esta fase abarca todos los procedimientos relacionados directamente con el procesamiento; el estudio macroscópico de la misma, la elaboración de los bloques de parafina, las secciones histológicas con su posterior tinción, para facilitar la correcta interpretación del diagnóstico (1). Además, se relaciona con el estudio e interpretación de los hallazgos microscópicos, la integración de los resultados de las pruebas complementarias necesarias y la preparación del informe diagnóstico. Es probablemente la parte más compleja de analizar de todas, ya que en ella intervienen aspectos subjetivos muy difíciles de evaluar (5).

## **III Fase postanalítica:**

Esta etapa se fundamenta en la validación de los resultados, elaboración y emisión de un informe por parte del laboratorio, que se remite al facultativo responsable del manejo del paciente y se almacenan las muestras en óptimas condiciones (1).

En las fases analítica y post analítica, los errores abarcan (16):

- Errores de identificación en la recepción y codificación inicial de las muestras en el laboratorio
- Errores de identificación en los bloques y láminas de microscopía
- Cambio de numeración o rotulación de casetes histológicos y láminas
- Error de compaginación entre la hoja del caso por ver y las láminas de dicho caso
- Pérdida de muestras
- Errores de identificación durante la redacción, transcripción y compaginación de los informes

El aseguramiento de la calidad en el laboratorio de anatomía patológica consiste en evaluar el cumplimiento en todos los pasos del análisis, incluyendo las tres fases anteriormente explicadas, de esta forma se promueve la excelencia en el resultado de la práctica médica (1). Es por ello, que se precisa entender a cabalidad el concepto de calidad y su importancia en el correcto funcionamiento de todos los procesos llevados a cabo para la resolución de un correcto diagnóstico.

#### *1.2.1.4 Calidad*

El concepto de calidad ha evolucionado continuamente según las necesidades y las características de las personas y organizaciones a lo largo de la historia, implicando un juicio de valor tanto individual como colectivo (25).

La Calidad es una cualidad o propiedad inherente a las cosas que permiten que estas sean comparadas con otras de su misma especie. Si se hace referencia al cliente (médicos y -en segundo plano- pacientes), permite satisfacer sus necesidades y deseos, aunque también, puede aportar valores al cliente, usuario o consumidor (25).

Con relación a la asistencia sanitaria, existe una preocupación en los servicios hospitalarios, por establecer objetivos de calidad, es desde esa premisa que surge el aseguramiento de la Calidad, el cual, comprende el control de la calidad, que representa un componente integral, donde se incluyen los procesos y las técnicas destinadas a detectar, reducir y corregir las deficiencias en el proceso analítico y la mejora de la calidad, que es la práctica continua de la evaluación y el ajuste en el rendimiento por medio de procedimientos estadísticos y científicos validados (1).

Y es por la complejidad de estos procedimientos más los múltiples factores implicados en el proceso diagnóstico, que se dificulta el establecer recomendaciones relativamente fáciles de cumplir para obtener los objetivos de calidad expuestos, debido a que en la actualidad, no hay definidos estándares concretos y objetivos, más allá de la definición general de obtener un diagnóstico completo, ajustado, reproducible y accesible en el menor tiempo posible (5).

Para llevar a cabo la aplicación estos objetivos, es necesario una serie de requisitos que con frecuencia dependen del equipamiento del laboratorio, la formación tanto del personal técnico como del personal médico y en última instancia de las características del hospital, que precisarán

por tanto de la adecuación de los objetivos de calidad a cada circunstancia individual, teniendo como referencia a otros hospitales o laboratorios de características similares (5).

Por último, es importante destacar que muchos de los aspectos que se han expuesto, están implicados en los procesos de acreditación o certificación, y que en muchos casos representarán requisitos indispensables para su obtención.

#### *1.2.1.5 Acreditación del laboratorio*

Los estándares generales de acreditación para prestadores institucionales de atención abierta y cerrada incluyen entre sus exigencias, que los establecimientos de salud aseguren la trazabilidad de las biopsias realizadas a los pacientes (16).

Genéricamente la trazabilidad puede ser definida como un conjunto de procedimientos preestablecidos que permiten conocer el histórico, la ubicación y la trayectoria de un producto, o lote de productos a lo largo de una cadena de suministros, en un momento dado (16).

En el caso de las biopsias, que suelen involucrar múltiples procesos y “cambios de mano”, el sentido del estándar es evitar errores asociados a la identificación del paciente al que pertenece la biopsia, contribuir a localizar muestras o informes extraviados o con retardo en la entrega de los resultados, y apoyar a cualquier investigación frente a un posible error en estos procesos, es por esta razón, que mantener la identificación del paciente a través de todo el proceso preanalítico y su posterior procesamiento es fundamental para cualquier laboratorio de anatomía patológica y ha sido catalogado como un objetivo principal entre los National Patient Safety Goals de Joint Commission (26).

Sin embargo, para la obtención de objetivos de calidad es necesaria una labor de concienciación de todos el equipo de trabajo, ya sea personal médico, de laboratorio o administrativo, puesto que es una labor conjunta donde todo el personal debe estar implicado (5).

A continuación se describirán una serie de recomendaciones dadas por Sola Gallego (5) para ser aplicadas a cualquier laboratorio de Anatomía Patológica, independiente de su tamaño y características particulares:

- Todos los procesos que puedan ser automatizados, deben serlo, por lo que, la infraestructura debe considerar el espacio necesario para todo el equipamiento utilizado en el laboratorio,

además de contar con los recursos que permitan un adecuado aprovechamiento de los sistemas informáticos, con el objeto de establecer los adecuados estándares de calidad.

- En todo laboratorio debe existir una figura que sea responsable de calidad, el cual, será el encargado de la puesta en marcha de los procesos, su mantenimiento y de la redacción de las recomendaciones necesarias para corregir las discrepancias detectadas.
- Son de suma importancia las auditorías internas, la aplicación de protocolos consensuados en cada laboratorio a la espera de protocolos generales, la regulación de las consultas internas y externas y la participación en comités externos, los cuales, representan instrumentos relativamente sencillos de implementar y que pueden permitir detectar en las fases iniciales aquellos aspectos más deficitarios y que precisan de una actuación más urgente.
- Es imprescindible la participación en todos aquellos programas de garantía de calidad externos que estén disponibles, puesto que, son el instrumento que permite la comparación interlaboratorios y además la base, junto con los documentos o guías de consenso, del establecimiento de los estándares mínimos comunes a todos los laboratorios.
- La formación continuada de todo el personal implicado es un aspecto esencial en la obtención de los objetivos de calidad. Deben disponerse de los medios económicos y de tiempo necesario para garantizar un mínimo de asistencia a cursos acreditados, así como reuniones de actualización de todo el personal implicado.

Para finalizar en la siguiente tabla, se mencionarán los componentes para el control de calidad correspondientes a cada una de las fases del proceso para la obtención del diagnóstico.

**TABLA 1.1** Componentes del control de calidad en Patología (modificado por Barr J.) (5).

Aspectos Preanalíticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimiento biópsico y fijación en solución y contenedor adecuados</li> <li>• Petición correctamente rellena y transporte al laboratorio</li> <li>• Registro de entrada en el laboratorio e identificación de las muestras</li> <li>• Disección, descripción macroscópica y muestreo tisular</li> <li>• Procesamiento del tejido e inclusión en parafina</li> <li>• Corte de las secciones</li> <li>• Tinción, montaje y etiquetado de las secciones</li> </ul>
Aspectos analíticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudio microscópico de las secciones junto con los datos clínicos relevantes</li> <li>• Petición y estudio de las pruebas complementarias relevantes necesarias</li> <li>• Redacción y preparación del informe junto con el diagnóstico final</li> </ul>
Aspectos postanalíticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transcripción del informe en el formato del informe final</li> <li>• Transmisión del informe final al peticionario</li> <li>• Evaluación del tiempo total de emisión del informe</li> <li>• Archivo del informe</li> <li>• Archivo adecuado del material estudiado (seccione, bloques, especímenes)</li> <li>• Desecho de los especímenes después del adecuado período de retención</li> <li>• Petición y estudio de las pruebas complementarias relevantes necesarias</li> </ul>

Esta investigación se centró específicamente en analizar los siguientes aspectos:

- Aspectos preanalíticos:
  - Procedimiento biópsico y fijación en solución y contenedor adecuados.
  - Petición correctamente rellena y transporte al laboratorio.
  - Registro de entrada en el laboratorio e identificación de las muestras
  - Disección, descripción macroscópica y muestreo tisular
  
- Aspectos analíticos:
  - Estudio microscópico de las secciones junto con los datos clínicos relevantes
  - Petición y estudio de las pruebas complementarias relevantes necesarias

### 1.3 ARGUMENTACIÓN DEL PROBLEMA

Para reconocer la importancia de la calidad en los distintos procesos de los servicios de anatomía patológica y favorecer al diagnóstico y la prevención de los errores que los afectan, consideramos que:

En el transcurso del procesamiento de biomateriales humanos (DEF: Datos y muestras con control de calidad) en los servicios de anatomía patológica pueden presentarse diversas fallas humanas u omisiones. Buscar las causas de estos es una parte fundamental de la certificación de la calidad, pero esta búsqueda debe orientarse con el fin de mejorar éstos procesos al hacerlos menos vulnerables a dichos errores (16).

Es bajo este contexto y sumado al desarrollo de investigaciones operativas, término que en el contexto de los servicios de salud y de acuerdo con Zachariah et al. se refiere a: *“Investigación de las estrategias, las intervenciones, las herramientas o el conocimiento que puede mejorar la calidad, la cobertura, la eficacia o el rendimiento del sistema de salud o el programa en el que la investigación se está realizando”* (27), surge el desarrollo de esta investigación, la cual, forma parte de las investigaciones operativas del servicio de anatomía patológica del hospital Carlos Van Buren, cuyo fin es obtener un aseguramiento en la calidad de los biomateriales procesados y analizados, para que el diagnóstico sea certero, mejorando de esta manera la calidad en la atención que el servicio entrega a los pacientes.

## **II. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA**

### **2.1 Problema de investigación**

De acuerdo con el contexto presentado, hoy en día en Chile no existe un método que nos permita verificar la calidad de muestras y datos humanos generados en el laboratorio de anatomía patológica. Producto de errores procedimentales preanalíticos, no controlables por el laboratorio, es que se genera una alta incidencia de falsos positivos y falsos negativos en técnicas de suma importancia como la inmunohistoquímica, lo que conlleva a imprecisiones diagnósticas y terapéuticas (28).

### **2.2 Pregunta de investigación**

“¿Cómo evaluar la calidad de los biomateriales humanos para mejorar el diagnóstico y seguimiento terapéutico en cáncer?”.

### **2.3 Relevancia**

La relevancia de esta investigación radica en el desarrollo de un método que nos permita establecer parámetros de calidad cuantificables, que los procedimientos actuales no contemplan, acercándonos así al concepto de Medicina de Precisión. De esta manera, se contribuirá directamente a reducir las imprecisiones diagnósticas que radican en la subjetividad del análisis e interpretación de los exámenes inmunohistoquímicos.

### **III. OBJETIVOS**

#### **1.1 Objetivo General**

- Desarrollar un algoritmo de clasificación masiva para medir la calidad de la inmunoreactividad en biomateriales humanos.

#### **1.2 Objetivos Específicos**

- Ensayar un algoritmo de clasificación automatizado de la inmunoreactividad.
- Comparar la calidad del tejido con distintos tiempos de isquemia fría y distintos tiempos de fijación.
- Evaluar la calidad de una cohorte de biopsias de cáncer de mama formada por muestras generadas y almacenadas en el hospital Carlos Van Buren.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **4.1 Tipo de Estudio**

Estudio de tipo analítico y experimental, debido existen dos variables independientes para los investigadores: tiempo de isquemia fría y de fijación, que provocarán un efecto sobre la variable dependiente: calidad de la inmunotinción de las muestras. Se efectúa manipulación de las variables (29).

### **4.2 Población de Estudio**

Muestras de mastectomías anonimizadas para diagnóstico de cáncer de mama, tomadas en el Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso, en el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2012 al 31 de mayo de 2018.

### **4.3 Muestra**

Se seleccionaron 84 muestras histológicas embebidas en parafina y 36 muestras histológicas frescas procedentes de biopsia rápida de tejido mamario, todas estas muestras fueron facilitadas por el servicio de anatomía patológica del hospital Carlos Van Buren.

### **4.4 Tipo de muestreo**

De tipo no probabilístico y de conveniencia, pues no fueron escogidos aleatoriamente, sino que han sido seleccionados directa e intencionalmente de acuerdo a las características de la investigación (29).

## **4.5 Criterios de Inclusión y Exclusión**

### **4.5.1 Para curvas de calidad:**

#### **4.5.1.1 Criterios de inclusión**

- Muestra procedente de biopsia rápida.
- Muestra de tejido mamario

#### **4.5.1.2 Criterios de exclusión**

- Pieza quirúrgica de tamaño igual o menor a 8 cm.

### **4.5.2 Para la cohorte:**

#### **4.5.2.1 Criterios de inclusión**

- Casos diagnosticados con cáncer de mama.
- Casos con más de 3 tacos.
- Presentar áreas dentro del tejido con al menos un 50% de células malignas (independiente del tipo histológico).
- Áreas del tejido que sean representativas del tipo histológico del tumor que representa.
- Las células tumorales deben ser bien diferenciadas.
- Que el taco tenga un espesor de 3 mm como mínimo, para poder obtener una gran cantidad de tejido para insertar en la matriz de TMA.

#### **4.5.2.2 Criterios de exclusión**

- Bloques de tejido con número de folio ilegible.
- Bloques de tejido que se rompan al realizar el trocar.

## **4.6 Variables en Estudio**

### **4.6.1 Variables primarias:**

- Tiempo de isquemia fría
- Tiempo de fijación

- Temperatura ambiente

#### 4.6.2 Variables secundarias:

- Intensidad de la inmunotinción
- Área de la inmunomarcación

#### 4.6.3 Definición conceptual:

- ***Tiempo de isquemia fría:*** Intervalo de tiempo que transcurre entre la extracción del tejido del paciente hasta que es depositado en el líquido fijador.
- ***Tiempo de fijación:*** Intervalo de tiempo que transcurre el tejido inmerso en el líquido fijador.
- ***Temperatura ambiente:*** Temperatura del medio en el que se desarrolla el transporte de la muestra, puede ser medida en un sitio y momento determinado.
- ***Intensidad de la inmunotinción:*** Cantidad de ag presentes en el tejido que son afines con ac de interés los cuales reaccionan a un cromógeno produciendo la coloración.
- ***Área de inmunomarcación*** Zona del tejido que presenta marcación cromogénica.

#### 4.6.4 Definición operacional:

- ***Tiempo de isquemia fría:*** Intervalo de tiempo que transcurre entre que el tejido posterior a su extracción del cuerpo del paciente es puesto en inmersión en suero fisiológico y es transportado desde el pabellón hasta el laboratorio, donde es ingresado a la base de datos y es depositado en la formalina al 10%. El cual puede ser registrado por un cronómetro o reloj.
- ***Tiempo de fijación:*** Intervalo de tiempo que transcurre desde que la muestra es inmersa en la formalina al 10% hasta que es puesta en el procesador automatizado. El volumen del líquido fijador es 20 o 30 veces mayor que el de la muestra y el tiempo que está inmerso dependerá del grosor y tamaño de ésta, variando en un intervalo entre

12 y 24 horas (a mayor tamaño y grosor, mayor tiempo de permanencia en el líquido fijador).

- **Temperatura ambiente:** Temperatura ambiente a la que estará expuesta el tejido desde su extracción del cuerpo del paciente, transporte desde el pabellón hasta el laboratorio, manipulación en el laboratorio, inmersión en la formalina, procesamiento en el procesador automatizado y su posterior análisis.
- **Intensidad de la inmunotinción:** Clasificación de la coloración de los pixeles del área de marcación de acuerdo con una escala de grises de 8 bites. Se mide en bits por píxel.
- **Área de inmunomarcación:** Cantidad de pixeles que presentan marcación cromogénica. Se mide en pixeles al cuadrado.

#### **4.7 Fuentes y Métodos de recolección de datos**

Como fuente de datos para esta investigación se utilizaron los reportes histopatológicos de las muestras de pacientes diagnosticados con cáncer de mama del Hospital Carlos Van Buren, agrupados y anonimizados en tablas entregadas por el anatomopatólogo a cargo.

Los métodos de recolección de datos corresponden a la base de datos creada en el programa SQL server, el cual, sirve para analizar y organizar datos estadísticos. Los datos que se recolectaron corresponden al código de identificación de la biopsia, el tipo de cáncer diagnosticado y finalmente la clasificación de estas según Bio Auto Quality, sin incluir datos del paciente.

#### **4.8 Procedimientos y Actividades**

Un total de 36 muestras fueron obtenidas mediante biopsia rápida de tejido mamario (ya sea tejido sano o patológico), de 5 x 5 mm de grosor aproximadamente, se utilizaron para la realización de la curva que evaluó la calidad en triplicado. Se dividieron en grupos de 12 y se procesaron en 3 Tissue Microarrays (TMA) distintos, los tissue microarrays son un formato que permite el análisis en un tiempo de una gran cantidad de

muestras (véase anexo 2), un grupo estará en el TMA con la cohorte. Los grupos se volverán a dividir de modo que 6 muestras serán utilizadas para evaluar los distintos tiempos de isquemia fría, y las 6 muestras restantes para evaluar los distintos tiempos de fijación.

Para la realización de la cohorte en cambio, se utilizaron un total de 84 muestras almacenadas en el hospital, correspondientes a casos diagnosticados con cáncer de mama en el intervalo entre los años 2012 – 2018. Se escogieron 12 tacos por año, de al menos 3 o 4 casos, donde cada uno tenga 3 tacos como mínimo para hacer correlación entre ellos, y cada taco debe superar los 3 mm de espesor.

#### 4.8.1 Diseño experimental

Para la realización de este proyecto se diseñó un modelo de TMA en el cual se encontrarán todas las muestras que se utilizarán en este estudio (figura 1).



**Figura 4.1** Diseño TMA para análisis de calidad.

Como podemos observar en la figura, en la zona superior se encuentran las curvas de calidad, las cuales constarán de seis muestras cada una en las que variarán los tiempos de fijación e isquemia fría. A continuación, se presentan los controles negativos y positivos para los ac que se utilizaron como muestras referenciales para el análisis de la calidad, esto para normalizar los datos de 0 a 1 en base a los controles.

Tanto las curvas de calidad como las muestras de control se trabajaron en triplicado, es decir, contamos con tres réplicas de cada uno de estos elementos, pertenecientes a tres pacientes diferentes.

Por último, se observan las muestras que conforman la cohorte que se pretende caracterizar con este método, la que contiene tejido mamario procesado por el servicio de Anatomía Patológica del hospital Carlos Van Buren, entre los años 2012 y 2018.

#### **4.8.2 Curvas de calibración**

Para la realización de las curvas de calibración se utilizaron tejidos frescos, puesto que, en ellos se modificaron las variables ya mencionadas en este documento, para así observar cambios en la inmunoreactividad de estos tejidos. Cada trozo de tejido utilizado proviene de una única pieza quirúrgica, que es de tamaño 0,5 x 0,5 x 0,5cm.

##### **4.8.2.1 Curva de deterioro por isquemia fría**

Se retrasó la inmersión en líquido fijador de los tejidos de acuerdo con lo especificado en la tabla 1. Los trozos de tejido se mantuvieron en agua destilada hasta su inmersión en el líquido fijador. Para la fijación de las muestras se utilizó formalina al 10%. La fijación se realizó de acuerdo con el protocolo anexo (anexo 4). Cada muestra fue fijada en un casete rotulado, lo que permitió su correcta identificación.

**TABLA 4.1** *Tiempos de retraso de la fijación.*

<b>Tiempo de isquemia fría (Horas)</b>					
0	2	3	7	24	28

Se seleccionaron los tiempos de isquemia mencionados en la tabla 1 en base a la investigación de Neumeister et al., puesto que, se conoce que el efecto del TIF hasta la primera hora y media de retraso no representa una pérdida de calidad significativa, por lo que, se seleccionaron los primeros tres tiempos para observar si este cambio leve en la calidad se sostenía en el tiempo. Luego de las tres primeras horas se escogieron tiempos más extremos, para asegurar el registro de una pérdida de calidad significativa (30).

#### 4.8.2.2 Curva de deterioro por tiempo de fijación

Las muestras que conforman esta curva se mantuvieron inmersas en el líquido fijador, formalina al 10%, durante el tiempo especificado en la tabla 2. Cada muestra fue fijada en un casete rotulado, lo que permitirá su correcta identificación. Todo el procesamiento posterior fue llevado a cabo siguiendo el protocolo anexo (anexo 5).

**TABLA 4.2** *Distintos tiempos de fijación.*

Tiempo de Fijación (Horas)					
1	8	24	72	120	168

Se seleccionaron los tiempos de fijación mencionados en la tabla 2 de acuerdo con lo siguiente: los puntos de 1, 120 y 168 horas, son tiempos extremos, incluidos para obtener puntos en los que hubiese un efecto más marcado. 24 horas de acuerdo a la literatura es el tiempo ideal para la IHQ (31) , además este tiempo y el de 72 horas se asemeja a la realidad de los fin de semana y feriados largos que ocurren en el hospital.

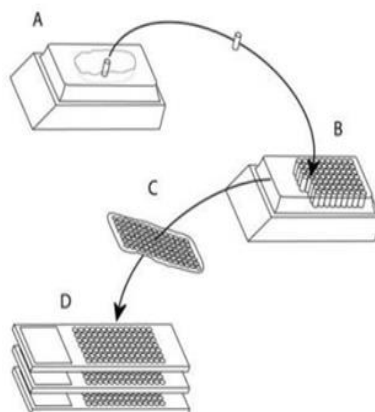
#### 4.8.3 Selección de muestra para realización de la cohorte

Se buscaron casos que cumplieran con los criterios de inclusión ya mencionados y posteriormente el patólogo del servicio de anatomía patológica seleccionó una zona representativa de cada uno, para incluirlo en la matriz de TMA, de acuerdo con el orden del diseño ya expuesto anteriormente (figura 1).

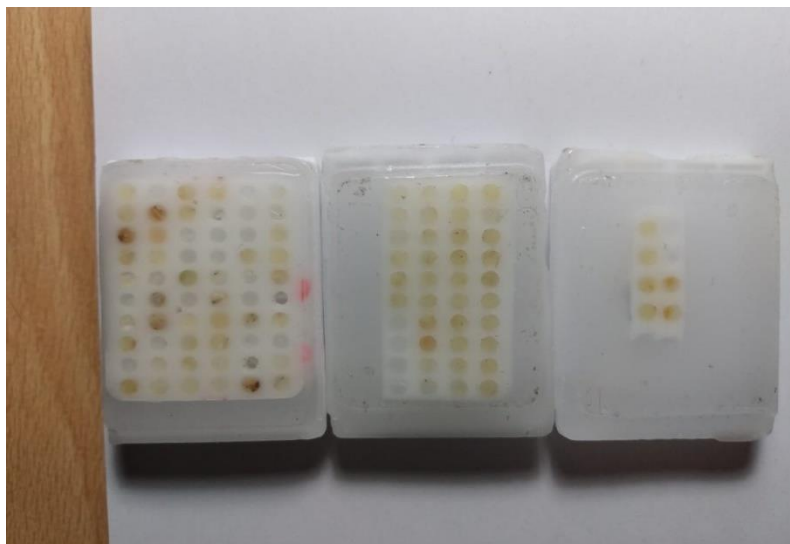
#### 4.8.4 Confección de Tissue Microarray

La matriz que se utilizó para la confección de este TMA contiene 45 cilindros de 0,5 cm de diámetro, en los que se posicionó cada una de las muestras, previo a esto se seleccionó una zona representativa del tejido, esto fue realizado por el patólogo del servicio de anatomía patológica del hospital Carlos Van Buren, quien indicó en la lámina histológica correspondiente a cada taco la zona que se desea estudiar.

Una vez seleccionadas las zonas, se comparó la lámina histológica con su molde de procedencia, para así extraer la zona de interés por medio de un trocar, posteriormente se colocó en la matriz del TMA (Figura 2). Al completarse la extracción y posicionamiento de todas las muestras se procedió a realizar la inclusión de la matriz, formando así un molde histológico del cual, se obtendrán láminas histológicas (Figura 3).



**Figura 4.2 Esquema de procedimiento de confección de Tissue array.** A) Taco de parafina con la muestra de tumor, se extrae un cilindro de 0,5 cm. B) se confecciona un nuevo taco de parafina donde están los cilindros extraídos. C) Se realizan cortes histológicos. D) se obtienen láminas de los tacos de Arreglo de tejido, listas para IHQ o FISH.



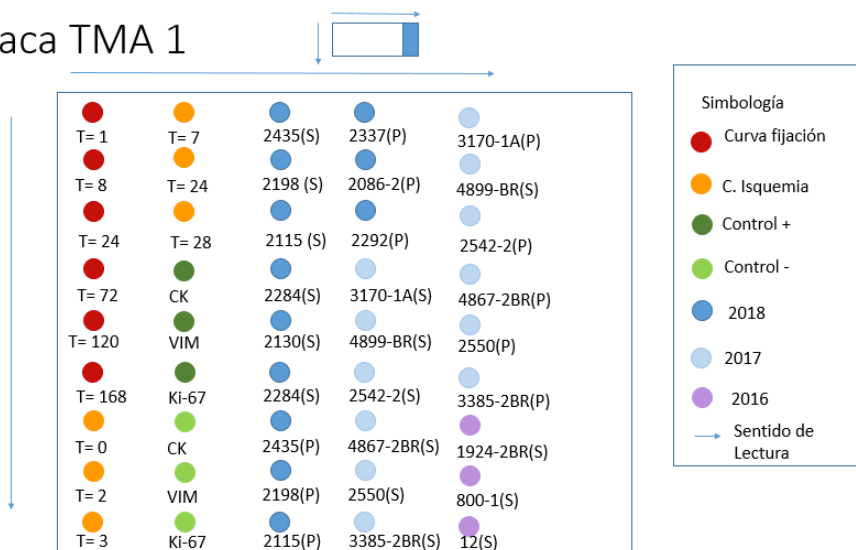
**Figura 4.3 Histomoldes de TMA.** De izquierda a derecha se encuentran el TMA 1, TMA 2, TMA 3.

En la etapa previa a la realización del TMA se consideró el uso de una matriz capaz de contener la totalidad de los tejidos utilizados, pero posteriormente solo se logró conseguir matrices con una capacidad de 45 especímenes, por lo cual, para evitar retrasos en la realización de la etapa experimental se optó por su uso, finalmente las muestras fueron dispuestas de acuerdo con los esquemas de las figuras 4 y 5.

#### **4.8.5 Cortes histológicos**

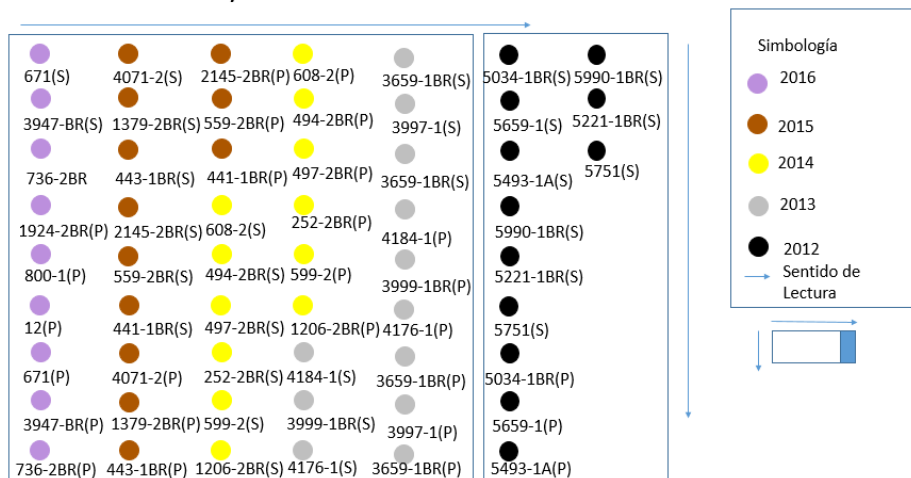
Una vez confeccionados los TMA, se procedió a realizar 6 cortes de 4 $\mu$ m. Cada uno de ellos será rotulado como TMA más el número de histomolde, agregando el ac a utilizar en las técnicas posteriores y el sentido de lectura de la lámina, de esta forma se sabrá claramente la posición de cada muestra en el contenido (figuras 4 y 5).

## Placa TMA 1



**Figura 4.4 Placa TMA 1.** En ella se encuentran las curvas de calidad, controles de referencia y parte de la cohorte (2018 aparte de 2016).

## Placa TMA 2 y 3



**Figura 4.5 Placa TMA 2 y 3.** En ella se encuentran los TMA 2 y 3, estos contienen las muestras de la cohorte desde 2016 hasta 2012.

#### 4.8.6 Inmunohistoquímica

Para esta parte del procedimiento se utilizaron los siguientes materiales:

- Equipo de recuperación antigénica
- EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH DAKO (1:50)
- Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin Clones AE1/AE3 DAKO

- Monoclonal Mouse Anti- Human Vimentin Clone V9 DAKO
- Anticuerpo secundario EnVision FLEX/HRP, DAKO.
- Cromógeno DAKO, EnVision FLEX DAB+Chromogen.
- Wash Buffer

La tinción inmunohistoquímica (véase anexo 3) se realizará de acuerdo con el protocolo utilizado en el hospital Carlos Van Buren, el cual, se encuentra en el anexo 6.

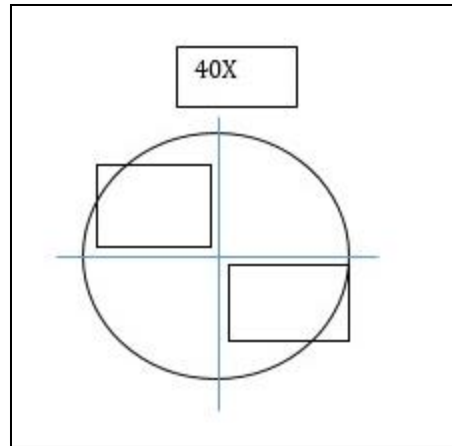
#### **4.8.7 Recolección de imágenes y análisis digital**

Las imágenes fueron digitalizadas mediante captura fotográfica con microscopio óptico Olympus DP71 y el programa de captura fotográfica DP Controller. Las imágenes obtenidas fueron analizadas automáticamente con el sistema de análisis de imágenes ImageJ. Este sistema analizó estas imágenes sin comprimir, distinguiendo entre las áreas de elementos tumorales y estroma, utilizando la máscara de CK y de VIM, lo que resultará en una sola máscara tumoral de CK binaria para cada terreno.

Para la captura de imágenes se utilizaron los ajustes siguientes:

- Exposición: 1/350
- Balance de blancos
- Rojo: 0,9
- Verde: 1,1
- Azul: 1,0

Las fotografías se tomaron en aumento de 40X en duplicado de acuerdo con la figura 6. El promedio de los datos obtenidos de las fotografías de 40X de CK y VIM conformarán los datos de la cohorte utilizada en este estudio.



*Figura 4.6 Esquema de captura fotográfica.*

Para el análisis de las fotografías se usaron los siguientes ajustes:

- Tamaño de la imagen 1000 x735 pixeles.
- Formato Lab; L: 0-130; a: 0-255; b: 110-255.
- Conversión de la imagen a escala de grises de 8 bits.

Los datos que se obtuvieron del análisis corresponden a la **intensidad promedio de la tinción** y al **área de marcación**.

Posterior a este primer análisis de las fotografías se realizó un segundo análisis con los siguientes ajustes:

- Tamaño de la imagen 1000 x735 pixeles.
- Formato Lab; L: 0-130; a: 0-255; b: 138-255.
- Conversión de la imagen a escala de grises de 8 bits.
- Oscurecimiento de fondo.

De este análisis se obtiene el dato de **área de tejido circundante**.

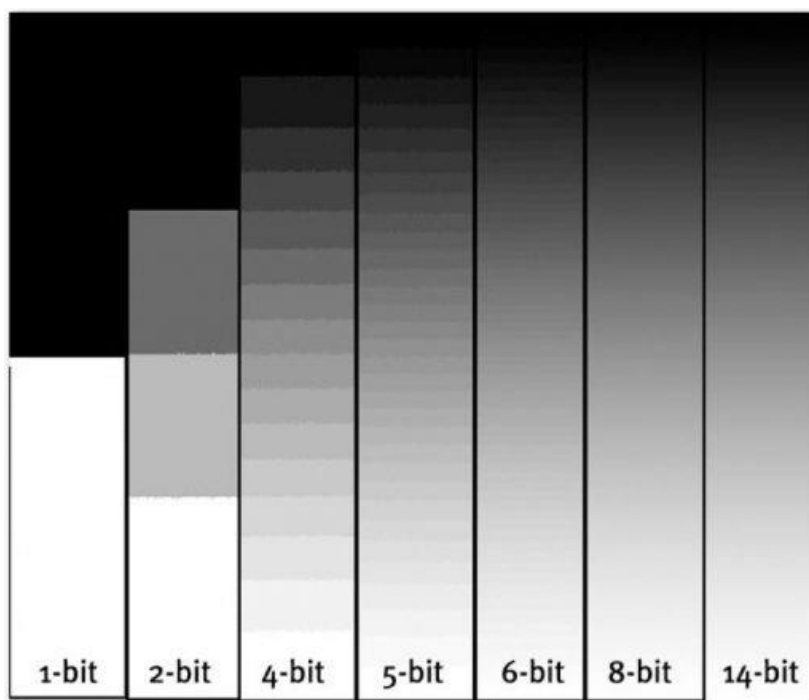
## 4.9 Plan de análisis

### 4.9.1 Evaluación de resultados

De los análisis anteriormente mencionados se obtuvieron los siguientes datos: intensidad promedio y área de marcación.

La intensidad se midió de acuerdo con una escala de grises de 8 bits, mientras que el área de marcación se midió de acuerdo con la cantidad de píxeles que son detectados de acuerdo con la máscara de CK.

La escala de grises de 8 bits comprende un total de 256 colores, de acuerdo con el esquema presentado en la figura 5.7 la menor intensidad percibida corresponde al color blanco (abajo), por lo cual, la mayor intensidad percibida por el programa de análisis corresponde al negro (arriba).



**Figura 4.7** Escala de grises de 1, 2, 4, 5, 6, 8 y 14 bits.

En base al control positivo se definieron patrones que permitieron la identificación de la marcación, de acuerdo con los parámetros indicados previo al análisis, que fueron establecidos de acuerdo con el formato Lab, que detecta los colores percibidos por el ojo humano del espectro visible.

Este modelo mide tres parámetros: L: Luminosidad de color, a: posición entre magenta y verde, b: posición entre amarillo y azul (32). Y para que el programa distinguiera la marcación antigénica de los demás, se ajustaron a los siguientes valores formato Lab; L: 0-130; a: 0-255; b: 110-255 (Véase anexo 7).

Una vez obtenidos los datos por medio del cálculo del índice de calidad de tejidos se realizó la clasificación de la cohorte, en base a los parámetros presentados en la tabla 3, los cuales, se definen de acuerdo al valor de la desviación estándar de las curvas de calidad y controles (30).

Como los rangos de calidad fueron definidos en base a la desviación estándar, ésta en cada rango toma un valor distinto, variando su valor entre los ac y los distintos aumentos.

**TABLA 4.3 Evaluación de calidad.** Esta tabla tiene los valores que puede tomar el TQI para que se consideren como de calidad óptima, media o baja.

Calidad	TQI CK	TQI VIM
Óptima	0.625 – 1.375	0.651 – 1.349
Media	0.250 - 0.624 / 1.376-1.750	0.302 – 0.650 / 1.350 - 1.698
Baja	< 0.250 / > 1.750	< 0.302 / > 1.698

#### 4.9.2 Plan de Análisis

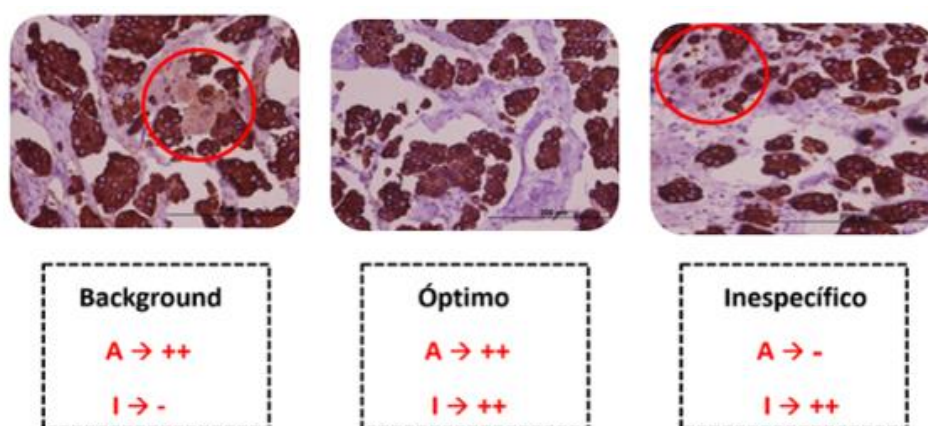
Para el análisis de los datos se utilizaron dos fórmulas con las que se obtuvo un índice de calidad que permitió medir la calidad de la cohorte recolectada (30).

En primer lugar, se midió el índice de inmunoreactividad (IRI) en escala de grises de 8 bits (30):

$$IRI_{(8\text{ bits})} = \frac{MGV_s / 256}{SA / TA}$$

IRI = Inmuno-Reactivity index  
 MGV(s) = Sample stain mean gray value  
 SA = Stain área  
 TA = Tissue área

El IRI integra el tamaño y la intensidad de las imágenes analizadas. Este índice ofrece como resultado tres niveles en los que se puede clasificar una muestra; óptimo, exceso de fondo y agregado proteico. La muestra solo puede pertenecer a uno de estos niveles, sin embargo, el valor de IRI por sí solo no nos permite caracterizar la calidad de una muestra.



*Figura 4.8 Posibles escenarios de la marcación inmunohistoquímica.*

Una vez calculados los valores de IRI se obtuvo el índice de calidad de tejidos (TQI), el cual, se adquirió a partir de la siguiente fórmula (30):

$$TQI = \frac{IRI_s - IRI_{neg}}{IRI_{pos} - IRI_{neg}}$$

TQI = Tissue Quality Index  
 S = sample  
 Pos = Positive control  
 Neg = Negative control

El TQI, relaciona los IRI de la muestra y las muestras control. Los valores que se obtuvieron de esta fórmula son los que finalmente permitieron caracterizar la calidad de las muestras, las que se dividieron en tres categorías según su calidad: Alta, media y baja.

Con las muestras ya clasificadas de acuerdo con las tres categorías, anteriormente mencionadas, se volvieron a clasificar en dos nuevas categorías: “Óptimas”; muestras de alta calidad y en condiciones para el estudio inmunohistoquímico, y “Descartables”; muestras de calidad media y baja, cuyo estado no permite su correcto análisis.

Para comprobar la validez de estos métodos, se realizaron las curvas de TIF y TF, ya que, estas variables afectan solamente a la calidad del tejido y no inciden directamente en otras variables a lo largo del procesamiento y análisis. Esto se realizó antes de caracterizar la cohorte en base al índice TQI.

Para el análisis de estos índices se utilizó un  $n=3$ , es decir, se efectuaron 3 réplicas de las curvas de calibración y 3 réplicas de las muestras controles, ambas correspondientes a tres grupos de muestras diferentes, más 3 pseudoréplicas correspondientes a las fotografías anteriormente mencionadas.

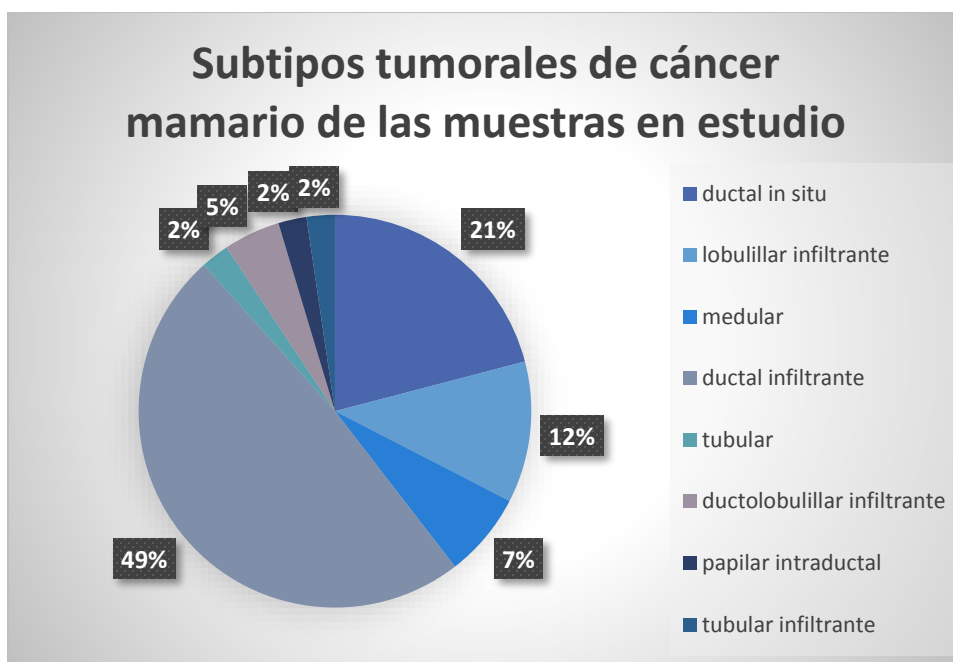
Todos los resultados fueron presentados como el promedio y el error estándar de al menos tres ensayos independientes para cada condición experimental. La prueba de menor diferencia significativa de Fisher y la prueba ANOVA, seguida por un test de Bonferroni se utilizarán para comparar varios grupos usando Statgraphics Centurion VX (Graph PAD). Un valor de  $p>0,05$  se utilizará para indicar la significancia estadística entre grupos. Todos los gráficos serán construidos en formato encapsulado (.eps) con codificación ASCII de 3 niveles mediante Origin Pro SR2 (Origin Lab) y resolución de 600 dpi, según recomendación estándar de revistas científicas de alto impacto.

## V. RESULTADOS

De acuerdo con lo descrito en el capítulo anterior se trabajó con un total de 120 muestras histológicas de cáncer de mama, de las cuales 12 se utilizaron para la comparación de distintos TF y TIF, 6 fueron muestras de control (referencia) y 84 conformaron la cohorte a caracterizar.

De las 84 muestras incluidas que conformaron la cohorte a caracterizar, 40 corresponden a tejido mamario sano, 44 a tejido mamario patológico, correspondiente a tumores primarios de cáncer mamario.

De las muestras correspondientes a cáncer mamario, el número de casos por cada subtipo histológico es el siguiente; 21 corresponden a casos de carcinoma ductal infiltrante, 9 a carcinoma ductal in situ, 5 a carcinoma lobulillar infiltrante, 3 a carcinoma medular, 2 a carcinoma ductolobulillar infiltrante, y un caso para carcinoma tubular, para carcinoma papilar intraductal y carcinoma tubular infiltrante.



**Gráfico 5.1: Subtipos tumorales de cáncer mamario de las muestras en estudio.** Los subtipos tumorales de las muestras utilizadas para la cohorte en esta investigación es la siguiente; ductal infiltrante en un 49%, ductal in situ en un 21%, lobulillar infiltrante 12%, medular 7%, ductolobulillar infiltrante 5%, tubular 2%, papilar intraductal 2% y tubular infiltrante 2%.

### 5.1.- Ensayar un algoritmo de clasificación automatizado de la inmunoreactividad.

Se probó un algoritmo de clasificación automatizado que permitió fraccionar el área y la intensidad de la marcación obtenida de la IHQ de controles positivos y negativos para CK y VIM, lo que permitió evaluar la máxima y la mínima expresión de la inmunoreactividad de estos ac.

En la figura 1(a) se aprecia el control positivo (C+) de CK, correspondiente a una muestra de epitelio gástrico, evidenciándose una intensa expresión de la inmunoreactividad, con una clara delimitación del área que corresponde al epitelio. Mientras que el control negativo (C-) está representado por la figura 1(c), para la cual se utilizó una muestra de tejido adiposo, donde no se detecta la presencia del marcador de interés.

Para el control positivo de VIM representado en la figura 1(b), se empleó una muestra de tejido ganglionar, el cual, presenta una gran intensidad y distribución normal del marcador. En cambio, para el control negativo, correspondiente a la figura 1(d) se utilizó nuevamente el tejido adiposo, por no presentar expresión del ac buscado.

Mediante el uso del algoritmo del sistema de análisis de imágenes ImageJ, se detectó el área y la intensidad de la señal positiva para ambos marcadores analizados y con la cuantificación de estos controles se establecieron los rangos mostrados en 2(a).

De esta forma, se determinó por medio del análisis de los datos del control positivo, que el índice de calidad máximo tiene un valor de 1, mientras que el control negativo al no presentar expresión de marcador, su índice de calidad tiene un valor de 0, siendo éste el valor mínimo que puede tomar el índice de una muestra cualquiera.

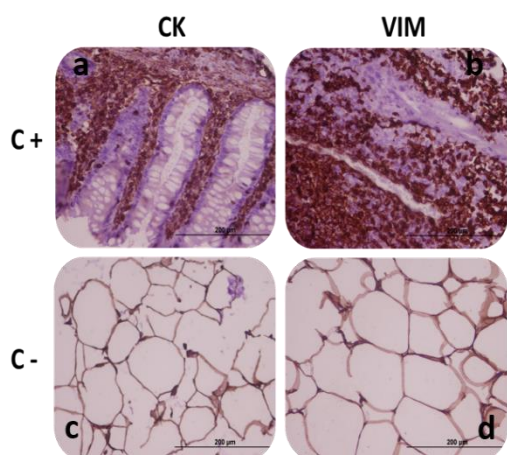
Con la obtención de estos índices, se estableció como rango óptimo  $\pm 1x$  desviación estándar del control positivo para las muestras analizadas con CK, mientras que para las muestras control analizadas con VIM se estableció como rango óptimo  $\pm 2x$  desviaciones estándar.

Con estos parámetros ya fijados, podemos obtener tres posibles escenarios de cómo se podría apreciar la calidad del tejido, en el caso de la imagen 2(b) la muestra no alcanza el rango de calidad óptimo exhibiendo un exceso de fondo “background”, que se caracteriza por manchas de mayor área, pero de muy baja intensidad, obteniéndose una marcación inespecífica.

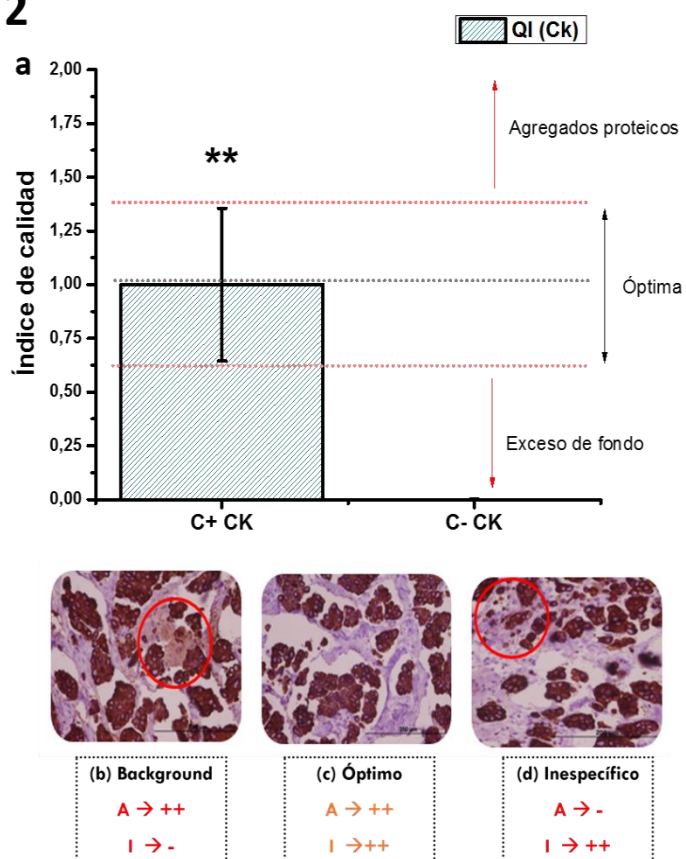
En la imagen 2(c) se visualiza una inmunomarcación óptima, donde la señal de área y de la intensidad dan una marcación específica, ya que están dentro del rango donde se obtiene una inmunotinción de calidad.

Finalmente puede ocurrir lo representado en la imagen 2(d) cuando el índice de calidad del tejido de una muestra escapa del rango óptimo debido a la presencia de un agregado proteico, el que ocasiona manchas de un área pequeña, pero de alta intensidad, con lo que se obtiene una marcación inespecífica.

1



2



**Figura 5.1: 1. Controles de calidad.** Fotografía correspondiente a las muestras de control positivo (C+) en (a) de CK y en (b) de VIM y a las muestras de control negativo (C-) en (c) de CK y en (d) de VIM, microfotografías en aumento de 40X. **2(a). Gráfico indicador de calidad.** Gráfico que señala los valores que puede tomar el índice de calidad (representado en el eje Y), en base a la inmunomarcación detectada de CK en los tejidos controles (representado en el eje X). De esta forma se puede determinar los rangos en que varía la calidad del tejido. **Indicadores de calidad.** Imágenes representativas de los posibles escenarios de calidad del tejido, en (b) muestra de baja calidad, correspondiente a tejido mamario, tinción de CK, aumento de 40X. (c) muestra de calidad óptima, correspondiente a tejido mamario, tinción de CK, aumento de 40X. (d) muestra de mediana calidad, correspondiente a tejido mamario, tinción de CK, aumento de 40X.

## **5.2.- Comparar la calidad del tejido con distintos tiempos de isquemia fría y distintos tiempos de fijación.**

Una vez establecidos los rangos de calidad se analizó el rendimiento de la técnica automatizada (Bio Auto Quality), evaluando el efecto del tiempo de fijación (figura 5.2.1) y el de isquemia fría (figura 5.3.1) sobre la inmunoreactividad de las muestras de la cohorte.

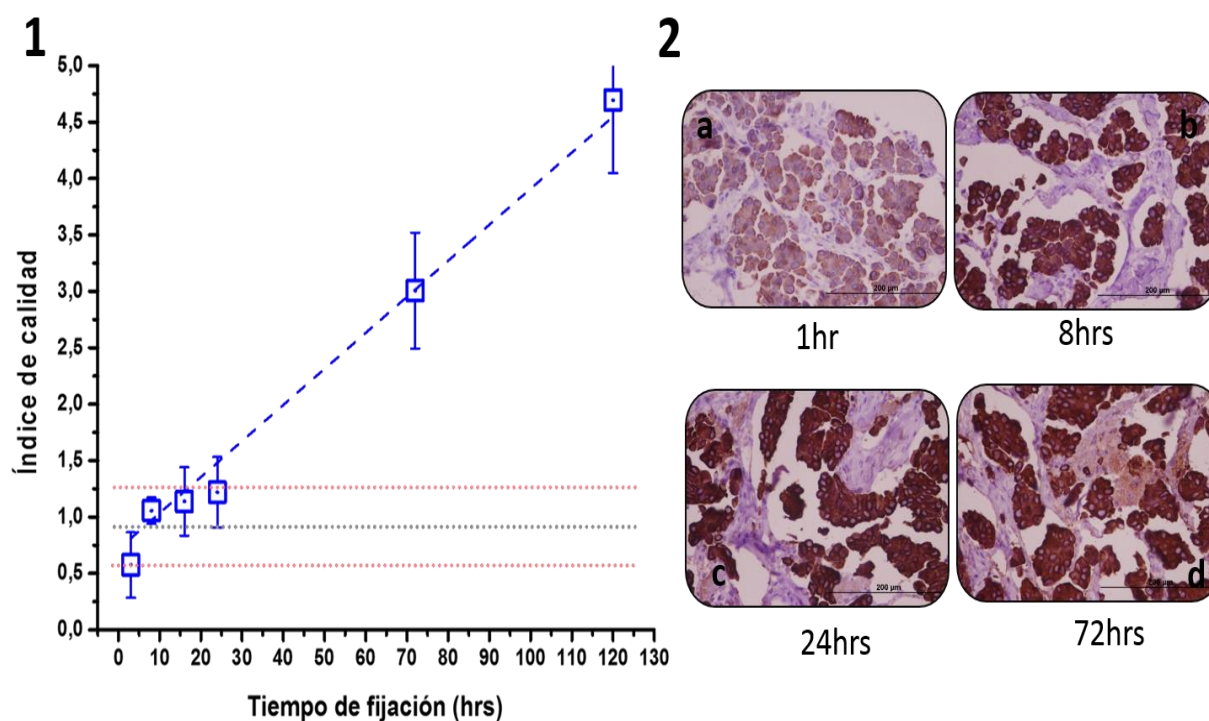
En la figura 5.2 se observa que el tiempo de fijación ideal con formalina al 10% para obtener un índice de calidad óptimo de las muestras es de 8 horas, como se observa en la figura 2(b), mientras que luego de 18 horas de fijación, la calidad comienza a decaer, lo que también se verá reflejado en un incremento de agregados proteicos en las muestras e incluso un aumento de fondo de inmunomarcación.

En la figura 5.2 (2), las imágenes señalan puntos de la gráfica donde se observan cambios de la inmunoreactividad. En (a) se observa una fijación escasa, lo que repercute en la intensidad de la inmunomarcación, en (b) se observa una fijación ideal para una muestra de 0,5 cm<sup>3</sup>, en (c) se observa una fijación de mediana calidad, donde se comienzan a evidenciar agregados proteicos y ligera tinción de fondo y en (d) se observa una fijación de mala calidad, donde se evidencia marcada tinción de fondo.

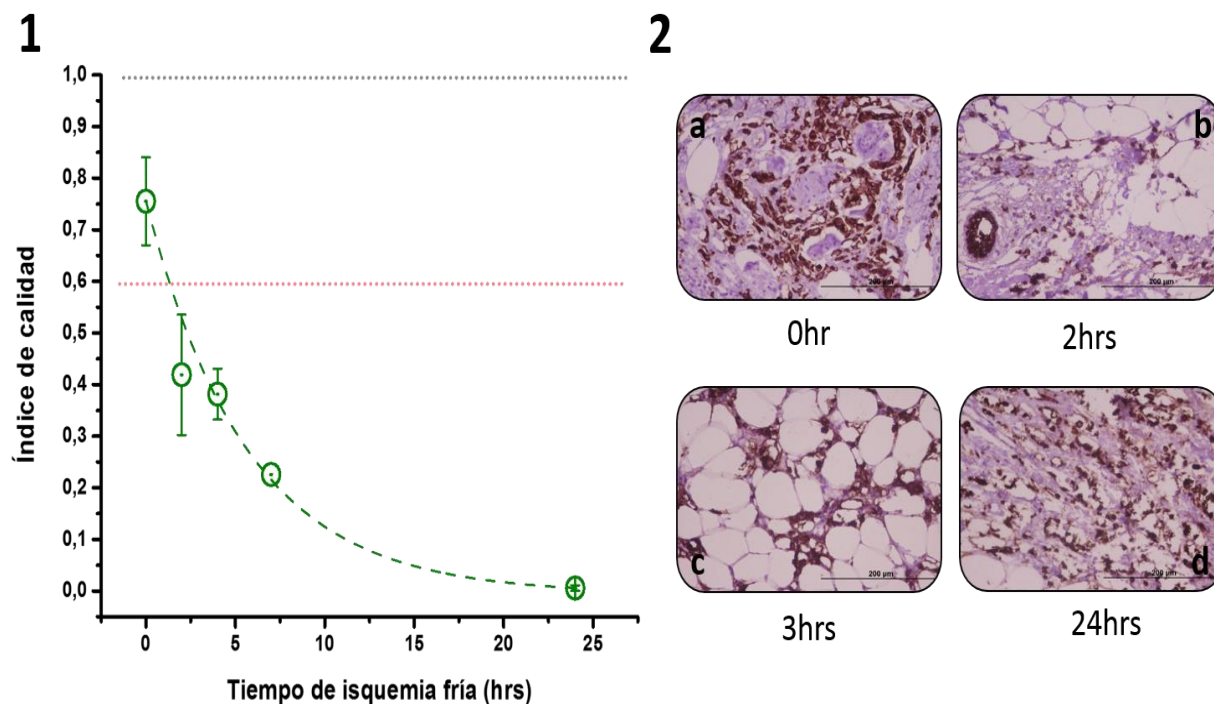
En la figura 5.3 en cambio, se observa que el tiempo ideal de isquemia fría para un tejido son 0 horas, es decir, que el tejido debe ser embebido lo más rápido que sea posible en el fijador, mientras que, para que la calidad del tejido no se afecte significativamente, el tiempo máximo que puede pasar antes de la inmersión del líquido fijador es de 1 hora, posterior a esto, no

solo se verá afectada la histoarquitectura del tejido, sino que también incidirá en un aumento de fondo de inmunomarcación inespecífica.

En la figura 5.3 (2), las imágenes señalan puntos representativos de la gráfica, donde se observa el cambio de la calidad del tejido. En (a) se observa el tiempo de ischemia fría ideal (fijación inmediata), en (b) se observa que se comienza a perder la histoarquitectura del tejido, en (c) se observa inespecificidad de la tinción y en (d) se observa una completa pérdida de la histoarquitectura del tejido, inespecificidad de la inmunomarcación con presencia de agregados proteicos y una ligera tinción de fondo.



**Figura 5.2: 1. Gráfico tiempo de fijación.** Gráfico que relaciona la variación del índice de calidad de los tejidos (representado en el eje Y), en función del tiempo de fijación de las muestras de la cohorte (representado en el eje X). De esta forma se determinó el tiempo óptimo de fijación para los tejidos. **2. Imágenes representativas.** Imágenes que señalan el estado del tejido en ciertos puntos (horas) de la curva del gráfico de tiempo de fijación. En (a) tiempo 1 hora de fijación, en (b) 8 horas, en (c) 24 horas y en (d) 72 horas de fijación.



**Figura 5.3: 1. Gráfico tiempo de isquemia fría.** Gráfico que relaciona al índice de calidad de los tejidos (representado en el eje Y), en función del tiempo de isquemia fría de las muestras de la cohorte (representado en el eje X). De esta forma se determinó el tiempo óptimo de isquemia fría. **2. Imágenes representativas.** Imágenes que señalan el estado del tejido en ciertos puntos (horas) de la curva del gráfico de tiempo de isquemia fría. En (a) fijación inmediata, en (b) 2 horas de isquemia fría, en (c) 3 horas de isquemia fría y en (d) 24 horas de isquemia fría.

### 5.3.- Evaluar la calidad de una cohorte de cáncer de mama formadas por muestras generadas y almacenadas en el hospital Carlos Van Buren.

En la tabla de la figura 5.3.1(a), se especifican los valores de los rangos para la clasificación de las muestras en calidad óptima, media o baja, en base al TQI de ambos ac. Mientras que el gráfico 1(b), es una representación gráfica de la tabla 1(a), en la que se puede comparar la amplitud de los rangos en ambos ac y estos a su vez con su control negativo, el cual, para ambos ac es de valor cero. Cabe destacar que para CK se usó 1x desviación estándar para señalar el rango óptimo de calidad, mientras que para VIM 2x desviaciones estándar.

El rango óptimo hace referencia a una intensidad y patrones de distribución de inmunotinción específicos, resultando en una inmunotinción óptima, según los estándares de buena calidad dados para la técnica inmunohistoquímica.

En el rango medio se consideran las muestras que, si bien escapan del rango óptimo, ya sea, por presentar agregado proteico o un exceso de fondo, pero que si se compensan estos valores pueden ser utilizadas para el estudio cuantitativo de la calidad del tejido.

Por último, el rango bajo corresponde a todas las muestras que resultaron con un exceso de agregado proteico y/o fondo inespecífico, lo que se traduce en una mala calidad de la inmunomarcación, lo que las imposibilita para su uso.

En la figura 2 ambos gráficos están representando la variación de la calidad de la inmunoreactividad de las muestras de ca de mama almacenadas en el hospital en el periodo comprendido entre los años 2012 y 2018, para cada ac estudiado.

Al analizar los datos del gráfico 2(a) correspondiente al ac CK, se observó que:

- Un gran porcentaje de las muestras presentan una calidad óptima de la inmunoreactividad.
- Un bajo porcentaje de muestras exhiben una mediana calidad de su inmunoreactividad.
- No se observan muestras con una mala calidad en su inmunoreactividad.
- No se observa pérdida significativa de la inmunoreactividad en las muestras almacenadas.

En cambio, al analizar los datos referentes a la VIM, gráfico 2(b), se observó lo siguiente:

- Como la cantidad de tejido conectivo en los carcinomas mamarios es menor en comparación a la presencia de epitelio, el porcentaje de inmunomarcación de VIM es menor, motivo por el cual, las muestras que alcanzaron el rango de calidad media fueron incluidas en la categoría de muestras de óptima calidad.
- El mayor porcentaje de las muestras presentan una calidad óptima de la inmunoreactividad.

- A partir del año 2014, se observa una disminución importante de muestras de calidad media, lo que concuerda con el inicio de la colaboración entre el laboratorio EFC y la unidad de anatomía patológica del hospital
- No se observan muestras con una mala calidad en su inmunoreactividad.

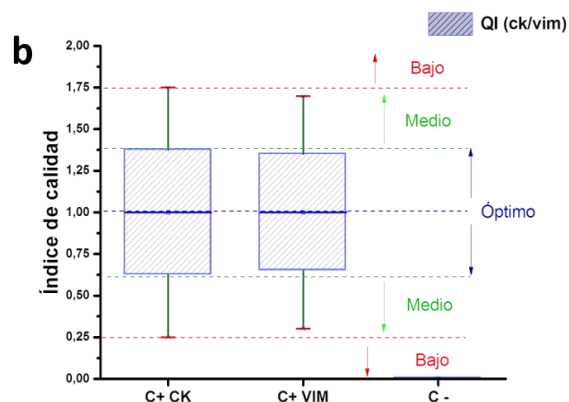
En la figura 3, el gráfico representa la relación entre las muestras inmunoteñidas con ambos ac. Se consideraron los resultados obtenidos con el ac CK como los más influyentes, debido a que este se encontraba en mayor proporción en el tejido. De esta forma se estableció una relación entre CK y VIM para cada grado de calidad, por cada año estudiado en la investigación, el cual, fue representado en valores de porcentajes.

Basándonos en los resultados de los gráficos, la mayor parte de las muestras tiene un procesamiento óptimo, mientras que un porcentaje menor tiene un procesamiento deficiente pero que no repercute en el análisis de las muestras para su uso diagnóstico y pronóstico.

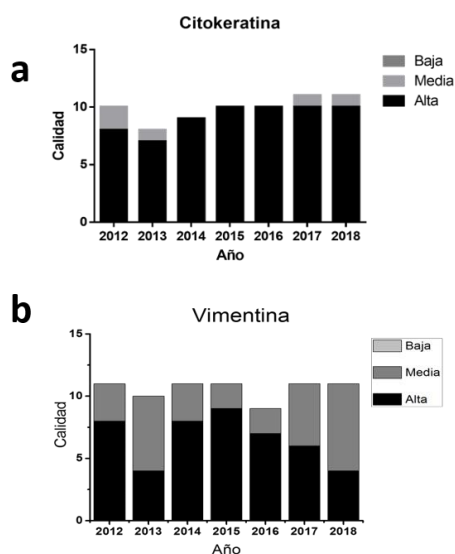
1

**a**

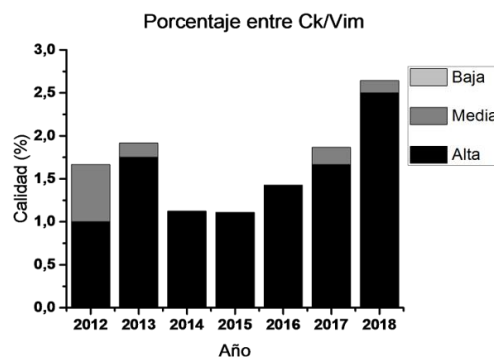
Calidad	TQI CK	TQI VIM
Óptima	0.625 – 1.375	0.651 – 1.349
Media	0.250 - 0.624 / 1.376-1.750	0.302 – 0.650/ 1.350 - 1.698
Baja	< 0.250 / > 1.750	< 0.302 / > 1.698



2



3



**Figura 5.4: 1(a). Tabla rangos de calidad.** Tabla que indica los valores que puede tomar el TQI de CK como de VIM, para poder caracterizar a las muestras en calidad óptima, rescatables o descartables para ambos ac. **(b) Gráfico indicador de calidad.** Gráfico que señala el grado de calidad del tejido; óptimo, medio o bajo, en relación con los valores que puede tomar el índice de calidad representado en el eje Y, en base a la inmunomarcación detectada en los controles positivos y negativos de ambos ac, en las muestras pertenecientes a la cohorte representados en el eje X. **2. Gráficos calidad del tejido en distintos años.** Gráficos de barra que indican la variación de la calidad de las muestras de mama almacenadas en el hospital en función de los años (entre el 2012 y 2018) en (a) para CK y en (b) para VIM. **3. Gráfico relación calidad de ambos ac.** En este gráfico se representa la relación que hay entre la calidad de las muestras de CK y VIM. Donde Y representa el porcentaje de la calidad de las muestras en conjunto mientras que en el eje X están representado la variación de la calidad en el periodo de años de investigación.

## VI. DISCUSIÓN

A partir de la premisa de desarrollar un algoritmo de clasificación automatizado de la inmunoreactividad “Bio Auto Quality” y comprobar su capacidad para medir calidad de los biomateriales humanos utilizados en IHQ, los resultados presentados en el capítulo anterior nos indican lo siguiente:

Se logró obtener un algoritmo de clasificación automatizado, lo que permitió evaluar la máxima y la mínima expresión de la inmunoreactividad de los ac en cuestión. Estos resultados guardan relación con lo que sostiene Pérez y Rodríguez (33) que el tejido del carcinoma mamario expresa principalmente el filamento intermedio CK, específicamente expresión de CK de distinto peso molecular, mientras que Wick y Hornick (34) sostienen que en menor proporción se encuentra VIM, ya que ésta se encuentra más comunmente en coexpresión con Desmina, proteína asociada a tumores de origen muscular.

Ello es acorde con lo hallado en este estudio, donde la proporción de la inmunomarcación de CK es mayor que la de VIM, motivo por el cual, los parámetros dados al algoritmo para analizar y clasificar la inmunomarcación de CK fue más acotado en comparación a los parámetros de VIM.

Sin embargo, McCabe et al. (35) manifiestan que existen ac que presentan naturalmente una expresión menor en ciertos tejidos, reflejando una baja calidad en la inmunomarcación, suscitando el uso del ac en concentraciones mayores a las que comúnmente se utilizan en la clínica. Lo que sugiere que el uso de concentraciones mayores de ac es un parámetro para considerar en inmunohistoquímicas masivas. En este estudio no se consideró este parámetro pues se buscaba analizar la cohorte utilizando los mismos métodos utilizados por el hospital de origen de las muestras, pero consideramos que usando Bio Auto Quality es posible analizar este parámetro en estudios posteriores.

Con respecto a la calidad del tejido, se logró observar como afecta el tiempo de isquemia fría y de fijación la intensidad y distribución de la inmunoreactividad. De esta forma se pudo clasificar en tres categorías la calidad (óptima, media y baja) y se calcularon los tiempos óptimos para la fijación e isquemia fría.

Se observó que el tiempo óptimo de isquemia fría son cero horas (inmediata fijación), mientras que la inmunoreactividad no se ve afectada hasta pasada una hora y media aproximadamente. Además que un aumento en el tiempo de isquemia fría incide en la acumulación de agregados proteicos, lo que ocasiona que la muestra pierda la especificidad del análisis inmunohistoquímico, resultados que guardan relación con lo expuesto por Neumeister et al.(30) que afirma que el aumento de tiempo de isquemia fría es proporcional a la pérdida de inmunoreactividad del tejido.

También se observó que el tiempo óptimo para la fijación de las muestras de 5 x 5 x 5 mm. son de 8 horas, tiempo suficiente para lograr una buena calidad de la inmunoreactividad. Según lo expuesto por Kiernan (31), el tiempo de fijación recomendado es entre 12 y 24 horas (dependiendo del tamaño de la muestra), para técnicas histoquímicas usando como solución fijadora formalina al 10%, mientras que para la IHQ el tiempo recomendado es de 24 horas. Al considerar que el tamaño de las muestras analizadas era menor, se esperaba que el tiempo de fijación óptimo fuera menor que el recomendado en la literatura.

En lo que respecta a los resultados del análisis de la cohorte, se observó que la inmunoreactividad se conserva en el tiempo y que por medio del análisis inmunohistoquímico masivo es factible analizar la calidad del tejido.

Considerando los datos presentados en la sección de resultados, es crucial tener en cuenta la composición del tejido a analizar a la hora de ajustar los parámetros del análisis, lo que está en concordancia con lo descrito por Khoury (36), quien propone que la concentración del ac debería variar según el tipo de tejido, ya que, esto sumado a que la prolongación de la isquemia fría incide tanto disminuyendo la intensidad y la especificidad de la inmunomarcación, variable que no está del todo controlada, por lo que, los resultados que se obtienen pueden presentar variaciones que repercutirán tanto en el grado diagnóstico como en la terapia posterior a realizar.

La variabilidad de la composición del tejido y la concentración del ac usada comúnmente en el ámbito clínico, -que es la misma para todos los tejidos-, son factores que repercutieron al analizar la cohorte con ambos marcadores, dándole prioridad al ac predominante en el tejido, en este caso CK, ajustando los parámetros del análisis a éste, puesto que, al tener una mayor distribución en el tejido, permitió analizar el estado de la inmunoreactividad en una mayor área de

la muestra, lo que se podría asociar al estado de deterioro de la inmunoreactividad de otros ac específicos usados para diagnosticar el cáncer de mama, como lo señala Khoury et al.(37), quien afirma que hay una disminución de la inmunoreactividad de los ac Her2, receptor de estrógeno y progesterona, posterior a una hora de isquemia fría, lo que se asemeja a los hallazgos de la presente investigación.

## VII. CONCLUSIÓN

Este estudio fue realizado por el equipo del Laboratorio EFC UV perteneciente a la Universidad de Valparaíso, Campus Casa Central, en colaboración con la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Carlos Van Buren, donde se evaluó la calidad de una cohorte de tejido mamario en un periodo comprendido entre los años 2012 y 2018, para lo cual, se hizo uso de la técnica Tissue Microarray, para que el estudio de las muestras mediante la IHQ fuera en simultáneo, para finalmente evaluar el tejido con el algoritmo automatizado de la inmunoreactividad Bio Auto Quality.

- Bio Auto Quality permitió detectar los cambios en la inmunoreactividad del tejido mamario, permitiendo calcular los tiempos ideales de fijación e isquemia fría, siendo de 8 y 0 horas respectivamente. Además, sirvió para la clasificación de la calidad de una cohorte de tejido mamario en tres categorías óptima, media y baja.
- Tras el análisis de la cohorte, podemos asumir que las muestras procesadas en el servicio de anatomía patológica del hospital Carlos Van Buren, cumplen con altos estándares de calidad tanto en su procesamiento como en su almacenamiento.
- Se recomienda guiarse para el análisis de la calidad por el marcador que tiene una mayor expresión en el tejido a analizar.
- El análisis mediante de Bio Auto Quality se recomienda para análisis retrospectivos.
- Se sugiere tener un registro de los tiempos de isquemia fría, para tener datos sobre el retraso de la fijación. También sugerimos la elaboración de una escala que mida la expresión de los principales AC usados clínicamente, para referencia de la variación de la inmunomarcación.

- En vista de los resultados proponemos que la realización de futuros estudios similares sea en un aumento de 20X, de esta forma podría observarse un área mayor sin perder detalles de la intensidad de la marcación. Además del análisis con un aumento menor proponemos la realización de estudios similares en otros tejidos y estudios con distintas concentraciones de AC.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Tresserra F. Aseguramiento de la calidad en el laboratorio de Anatomía Patológica. Rev Senol y Patol Mamar [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2019 Mar 7];28(3):93–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S021415821500064X>
2. Carbajo Vicente M, Gonzalez Lopez LM, Murillo Lázaro MC. Gestión en anatomía patológica. In: Libro blanco 2009 de la Anatomía Patológica en España Recursos, calidad e impacto de la patología en España. 2nd ed. España; 2009. p. 43–55.
3. Fernández Frez S. Implementación de Sistema de Trazabilidad para aportar a la eficiencia en Anatomía Patológica Digital [Internet]. Universidad de Chile; 2017 [cited 2019 May 31]. Available from: [https://cimt.uchile.cl/wp-content/uploads/2017/10/2017\\_Fernandez-Frez-Sebastian.pdf](https://cimt.uchile.cl/wp-content/uploads/2017/10/2017_Fernandez-Frez-Sebastian.pdf)
4. Oviedo MI, Ortiz E, Monzones C. Anatomía patológica: La gran desconocida de las especialidades médicas. Enfermería Glob. 2008;(13):1–14.
5. Sola Gallego JJ. Objetivos de calidad. In: Libro blanco 2009 de la Anatomía Patológica en España Recursos, calidad e impacto de la patología en España. España; 2009. p. 57–65.
6. Acevedo Barbera A, Lorenzo Martinez S, Pinedo Moraleda F. Sistemas de gestión de la calidad. In: Libro blanco 2009 de la Anatomía Patológica en España Recursos, calidad e impacto de la patología en España. España; 2009. p. 67–87.
7. Rodríguez Pérez P. Perspectva histórica sobre la Calidad de la Atencion Sanitaria: evolución, tendencias y métodos. Arbor. 2001;CLXX(670):371–81.
8. Donabedian A. Evaluating the Quality of Medical Care. Milbank Mem Fund Q. 1966;44(3):166–203.
9. Wennberg JE. Dealing with medical practice variations: a proposal for action. Health Aff. 1984;3(2):7–32.
10. Berwick DM. Continuous improvement as an ideal in health care. N Engl J Med. 1989;320(1):53–6.

11. Kohn L, Corrigan J, Donaldson M. To Err is Human. Building a Safer Health System. Institute of Medicine Comité on Quality of Health Care in America. Washington, D.C.: National Academies Press (US); 1999.
12. Prager L. Report unleashes furious interest in medical errors. *Am Med News*. 1999;1.
13. Value of Second Opinions Is Underscored in Study of Biopsies - [Internet]. [cited 2019 Jul 17]. Available from: <https://www.nytimes.com/2000/04/04/health/value-of-second-opinions-is-underscored-in-study-of-biopsies.html>
14. Prager L. Mandatory reports cloud error plan. *Am Med News*. 2000;1.
15. Foucar E. Error in Anatomic Pathology. *Am J Clin Pathol*. 2001;116(Suppl 1):S34–46.
16. Araujo M, Intendencia de Prestadores. Errores de Identificación y Trazabilidad de Biopsias y Componentes Sanguíneos [Internet]. 2011 [cited 2019 Jan 31]. Available from: [http://www.supersalud.gob.cl/observatorio/671/articles-7297\\_recurso\\_1.pdf](http://www.supersalud.gob.cl/observatorio/671/articles-7297_recurso_1.pdf)
17. Leape LL. Error in Medicine. *JAMA*. 1994;272(23):1851–7.
18. Contreras F. Curso Corto Límites de la Patología [Internet]. Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP). 2003 [cited 2019 Jul 17]. Available from: <http://www.conganat.org/seap/congresos/2003/cursolimites/contreras.htm>
19. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997 Jun 1;89(11):3909–18.
20. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*. 1998 Aug;16(8):2780–95.
21. Schnitt SJ, Connolly JL, Tavassoli FA, Fechner RE, Kempson RL, Gelman R, et al. Interobserver reproducibility in the diagnosis of ductal proliferative breast lesions using standardized criteria. *Am J Surg Pathol*. 1992 Dec;16(12):1133–43.

22. Foucar E. "Individuality" in the specialty of surgical pathology: self-expression or just another source of diagnostic error? *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2000 Nov;24(11):1573–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11075863>
23. Ramsay AD. Errors in histopathology reporting: detection and avoidance. *Histopathology* [Internet]. 1999 Jun;34(6):481–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383691>
24. Zarbo RJ, Tuthill JM, D'Angelo R, Varney R, Mahar B, Neuman C, et al. The Henry Ford Production System: reduction of surgical pathology in-process misidentification defects by bar code-specified work process standardization. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2009 Apr 1;131(4):468–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289582>
25. Pan American Health Organization. Gestión de Calidad y Gestión de Calidad y Seguridad del Paciente Situación actual y desafíos para la región [Internet]. 2011 [cited 2019 Jun 25]. Available from: [http://www.supersalud.gob.cl/observatorio/671/articles-10236\\_2\\_Dra\\_Cho.pdf](http://www.supersalud.gob.cl/observatorio/671/articles-10236_2_Dra_Cho.pdf)
26. Wenz B, Mercuriali F, AuBuchon JP. Practical methods to improve transfusion safety by using novel blood unit and patient identification systems. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1997 Apr;107(4 Suppl 1):12–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9124223>
27. Zachariah R, Harries D, Ishikawa N, et al. La investigación operativa en los países de bajos recursos: ¿Qué, por qué y cómo? *Lancet Infect Dis*. 2009;9:711–7.
28. Hede K. Breast Cancer Testing Scandal Shines Spotlight on Black Box of Clinical Laboratory Testing. 2008;100(12):836–8.
29. Hernandez Sampieri R, Fernandez Collado C, Baptista Lucio M del P. Metodología de la investigación. Quinta Edi. MAres Chacon J, editor. México: McGraw-hill / Interamericana editores S.A de C.V; 2010.

30. Neumeister, Veronique M. Paris F, England, Allison M. , Siddiqu S, Anagnostou V, Zarrella E, Vassilakopoulou M, Bai Y, et al. A Tissue Quality Index – an Intrinsic Control for Measurement of Effects of Pre-analytical Variables on FFPE Tissue. *Lab Invest* 2014 April ; 2014;4(94):467–74.
31. Kiernan JA. *Histological and histochemical methods: theory and practice* J. A. Kiernan. 4th ed. 2008 LS, editor. 2008. 20–97 p.
32. Molina L. *Sobre Colores: Modo de color Lab* [Internet]. 2010 [cited 2019 Jun 11]. Available from: <https://sobrecolors.blogspot.com/2010/03/modo-de-color-lab.html>
33. Pérez M, Rodríguez M. *El citoesqueleto celular en la glándula mamaria y su aplicación diagnóstica*. Vol. 67, Sanid. mil. 2011.
34. Wick MR, Hornick JL. *Immunohistology of Soft Tissue and Osseous Neoplasms*. *Diagnostic Immunohistochem* [Internet]. 2011 Jan 1;83–136. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978141605766600008X>
35. McCabe A, Dolled-Filhart M, Camp R, Rimm D. Automated Quantitative Analysis (AQUA) of In Situ Protein Expression, Antibody Concentration, and Prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(24):1808–15.
36. Khoury T. Delay to formalin fixation (cold ischemia time) effect on breast cancer molecules. *Am J Clin Pathol*. 2018;149(4):275–92.
37. Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2020 May 13];22(11):1457–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734848>
38. García del Moral R. *Fundamentos del proceso de fijación tisular*. In: *Laboratorio de Anatomía Patológica*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 1993. p. 27–54.
39. Lynch M. *Métodos de Laboratorio*. In: *Técnicas Histológicas*. Interamericana; p. 1099–181.
40. Chacín B. *Métodos de deshidratación, aclaración e inclusión en parafina*. In: *Curso Básico de Técnicas Histológicas*. Santiago de Chile: Universidad de los Andes; 2009. p. 12–5.

41. Montalvo Arenas CE. TÉCNICA HISTOLÓGICA [Internet]. México DF; 2010 [cited 2019 Jun 4]. Available from: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal de Recursos en Linea/Apuntes/3\\_tecnica\\_histologica.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal de Recursos en Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf)
42. García del Moral R. Fundamentos generales sobre procesamiento histológico de los tejidos. In: Laboratorio de Anatomía Patológica. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 1993. p. 15–26.
43. Montalvo Arenas CE. TÉCNICA HISTOLÓGICA. México DF; 2010.
44. Laguna Campos E. Microtomía o corte de los tejidos. In: Curso Básico de Técnicas Histológicas. Santiago de Chile: Universidad de los Andes; 2009. p. 16–7.
45. Mendoza Gaviria C. Desparafinado, Coloración con Hematoxilina y Eosina y Montaje. In: Curso Básico de Técnicas Histológicas. Santiago de Chile: Universidad de los Andes; 2009. p. 18–21.
46. García del Moral R. Coloraciones histopatológicas rutinarias de mayor interés. In: Laboratorio de Anatomía Patológica. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 1993. p. 155–7.
47. García del Moral R. Fundamentos generales de coloración. In: Laboratorio de Anatomía Patológica1. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 1993. p. 119–42.
48. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of Tissue Microarray Technology in Breast Carcinoma. *Lab Investig* [Internet]. 2000 Dec 1 [cited 2018 Aug 16];80(12):1943–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/3780204>
49. García-Caballero T, Gallego R, Morel G. Técnicas inmunohistoquímicas. In: Atlas de Inmunohistoquímica Caracterización de células, tejidos y órganos normales. Díaz de Santos; 2014. p. 3–73.
50. Grace-Jones W. Tissue microarray. In: Bancroft J, Gamble M, editors. *Theory and practice of histological techniques*. 6<sup>o</sup> edition. Philadelphia, Churchill Livingstone: Elsevier; 2008. p. 572–535.

51. Milanes-Yearsley M, Hammond E, Pajak T, Cooper J, Chang C, Griffin T, et al. Tissue Micro-Array: A Cost and Time-Effective Method for Correlative Studies by Regional and National Cancer Study Groups | Modern Pathology. *Mod Pathol* [Internet]. 2002 [cited 2019 Nov 26];15:1366–73. Available from: <https://www.nature.com/articles/3880701>
52. Packeisen J, Buerger H, Krech R, Boecker W. Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunohistochemistry. *J Clin Pathol* [Internet]. 2002 [cited 2019 Nov 26];55(8):613–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12147657>
53. Ni R, Mulligan AM, Have C, O'Malley FP. PGDS, a novel technique combining chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of ErbB2 (HER2/neu) status in breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007 Sep;15(3):316–24.
54. Hsu F, Nielsen T, Alkushi A, Dupuis B, Huntsman D, Liu C, et al. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol* [Internet]. 2002 [cited 2019 Nov 26];15(12):1374–80. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12481020>
55. Taylor C. Principles of immunomicroscopy. In: Taylor C, Cote R, editors. *Immunomicroscopy A diagnostic tool for the surgical pathologist*. 3<sup>o</sup> edición. Philadelphia: Elsevier; 2006. p. 1–45.
56. Gulmann C, Loring P, O'Grady A, Kay E. Miniature tissue microarrays for HercepTest standardisation and analysis. *J Clin Pathol*. 2004;57:1229–31.
57. de Dios Soler M, Acosta Haab G. *Guía de inmunohistoquímica para técnicos*. 1st ed. Buenos Aires: Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer; 2018. 1–46 p.
58. Tresserra F, Martinez Lanao MA, Soler MT. Manejo de las muestras para test inmunohistoquímicos, moleculares y genéticos en el cáncer de mama. *Rev Senol y Patol Mamar* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2019 Jun 3];29(1):26–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0214158215001206>

59. Universitat de les Illes Balears. Fundamentos técnicos La Inmunohistoquímica tiene por objeto la identificación de... [Internet]. [cited 2019 Aug 26]. Available from: [http://ibdigital.uib.es/greenstone/cgi-bin/library.cgi?e=d-10100-00---off-0medicinaBalear-00-2----01-10-00---0---0direct-10----4-----3-11--10-ca-250---50-about---00-3-1-01-00--4--0--0-0-01-10-0utfZz-8-00&a=d&c=medicinaBalear&cl=CL1.8&d=Medicina\\_Balear\\_](http://ibdigital.uib.es/greenstone/cgi-bin/library.cgi?e=d-10100-00---off-0medicinaBalear-00-2----01-10-00---0---0direct-10----4-----3-11--10-ca-250---50-about---00-3-1-01-00--4--0--0-0-01-10-0utfZz-8-00&a=d&c=medicinaBalear&cl=CL1.8&d=Medicina_Balear_)
60. Calderón R, Stock R. Curso de Métodos Físicoquímicos en Biotecnología, Inmunoquímica. Cuernavaca; 2007.
61. Montenegro MA, Ibarra GC, Rojas M. EXPRESION DE CITOQUERATINAS EN EL EPITELIO ORAL DE LA MUCOSA GINGIVAL HUMANA Y DE RATON. Rev Chil anatomía [Internet]. 1998 [cited 2019 Jun 3];16(2):211–7. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-98681998000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-98681998000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
62. Cid Mouteira P, Ortíz Rey JA, Antún Badiola I, San Miguel Fraile P, Alvarez Alvarez C, Zungri Telo E, et al. Expresión coordinada de citoqueratinas 7 y 20 en el carcinoma transicional de vejiga: Utilidad diagnóstica. Actas Urol españolas. 2002 Jan 1;26(4):279–84.
63. Rebolledo V, Colombo C, Rebolledo L. Expresión de citoqueratinas en el cáncer de mama y subtipos tumorales por inmunohistoquímica. Obs Ginecol. 2016;76(2):93–101.
64. Brenes Pino F, Brenes Leñero E, Alfaro Alcocer E. El valor de la Inmunohistoquímica en el diagnóstico de Carcinomas Hepáticos primarios y secundarios. Med Leg Costa Rica [Internet]. 2011 [cited 2019 Oct 9];28(2):35–42. Available from: [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152011000200004](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152011000200004)
65. Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT. Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. J Cell Biol [Internet]. 1982 Nov 1 [cited 2019 Oct 9];95(2):580–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6183275>

66. Tseng SCG, Jarvinen MJ, Nelson WG, Huang J-W, Woodcock-Mitchell J, Sun T-T. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: Monoclonal antibody studies. *Cell* [Internet]. 1982 Sep [cited 2019 Oct 9];30(2):361–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6183000>
67. Sun T-T, Eichner R, Schermer A, COOPER D, NELSON W, WEISS R, et al. Classification, Expression, and Possible Mechanisms of Evolution of Mammalian Epithelial Keratins: A Unifying Model [Internet]. 1984 [cited 2019 Oct 9]. Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=9c895555-9ae4-4132-9e57-3500a33db380>
68. Eichner R, Bonitz P, Sun TT. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *J Cell Biol* [Internet]. 1984 Apr 1 [cited 2019 Oct 9];98(4):1388–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6201491>
69. DAKO. Monoclonal Mouse, Anti-Human, Cytokeratin, Clones AE1/AE3 [Internet]. [cited 2019 Oct 11]. p. 1–3. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/107610005.PDF>
70. DAKO. FLEX, Monoclonal Mouse, Anti-Vimentin. Clon V9, Ready-to-use (Dako Autostainer/Autostainer Plus) [Internet]. [cited 2019 Oct 11]. p. 1–2. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/116905002.PDF>
71. Martínez Pérez JM, Martínez Rodríguez JM. Revisión sobre filamentos intermedios, con especial referencia a las citoqueratinas. *Rev Complut Ciencias Vet* [Internet]. 2010;4(2):1–11. Available from: <http://digital.csic.es/handle/10261/40890>
72. Robinson-Bennett B, Han A. Role of Immunohistochemistry in Elucidating Lung Cancer Metastatic to the Ovary from Primary Ovarian Carcinoma. *Handb Immunohistochem Situ Hybrid Hum Carcinomas* [Internet]. 2006 Jan 1;4:537–45. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874578405801163>

73. Azumi N, Battifora H. The Distribution of Vimentin and Keratin in Epithelial and Nonepithelial Neoplasms: A Comprehensive Immunohistochemical Formalin- and Alcohol-Fixed Tumors. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1987 Sep 1 [cited 2019 Oct 11];88(3):286–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2443000>
74. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2000 Feb;12(1):79–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067499000605>
75. Abyntek Biopharma. Diluciones y título de anticuerpos [Internet]. 2019 [cited 2019 Oct 11]. Available from: <http://www.abyntek.com/diluciones-y-titulo-de-anticuerpos/>
76. García del Moral R. Técnicas inmunohistoquímicas (II). In: Libro de anatomía patológica. McGraw Hill; 1993. p. 340–68.
77. Sánchez Lera R, Rosa Oliva García N. Historia del microscopio y su repercusión en la Microbiología. *Humanidades Médicas* [Internet]. 2015;15(2):355–72. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/hmc/v15n2/hmc10215.pdf>
78. Profesorado I nacional de tecnologías educativas y de formación del. Imagen digital [Internet]. 2019 [cited 2019 Aug 20]. Available from: <http://platea.pntic.mec.es/~lgonzale/tic/imagen/conceptos.html>

## ANEXOS

### ANEXO 1. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS

Para la obtención del resultado de una biopsia, es necesario realizar un procesamiento de la muestra, para obtener una lámina histológica, la cual, posterior a su tinción, es visualizada por el médico patólogo al microscopio para poder emitir el diagnóstico. Todos los procedimientos que acontecen entre la recepción de la pieza de tejido y la obtención de la lámina histológica son descritos a continuación.

#### 1. Fijación

EL proceso de fijación tisular, “Consiste en interrumpir los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular, tratando de conservar la arquitectura y composición tisular lo más próxima posible a como se encontraba en el organismo vivo” (38).

Genéricamente, los agentes fijadores se clasifican según su mecanismo de actuación en dos grupos; fijadores por métodos físicos y fijadores por métodos químicos.

**a) Fijación por métodos físicos:** Se emplea el enfriamiento por congelación del tejido como método para detener la autólisis y putrefacción tisular, utilizando para ello, agentes como el isopentano o el nitrógeno líquido. Éste método es de elección cuando se pretende realizar estudios morfológicos o funcionales en los que se requiere conservar intacta la estructura antigénica del tejido o su contenido enzimático (38).

**b) Fijación por métodos químicos:** En este método, los agentes fijadores se encuentran generalmente en estado líquido, y actúan desnaturalizando e insolubilizando las proteínas tisulares, lo cual, produce un bloqueo de la autólisis por inactivación enzimática. Además algunos de estos agentes impiden el crecimiento bacteriano (38).

**TABLA 1** Fijadores químicos según su mecanismo de acción (38).

<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Deshidratación tisular</b>	Actúan eliminando tanto el agua libre como aquella ligada a las moléculas proteicas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcohol etílico</li> <li>• Acetona</li> </ul>
<b>Cambios en el estado coloidal de las proteínas</b>	Provoca que las proteínas lleguen a su punto isoeléctrico, de esta forma adquieren una estabilidad mínima y una disociación máxima, haciendo que las proteínas se desprendan del agua ligada a ellas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido acético</li> <li>• Ácido tricloroacético</li> <li>• Ácido crómico</li> </ul>
<b>Formación de sales con los tejidos</b>	Se emplean cationes metálicos o un derivado orgánico que forman proteinatos o picratos con los tejidos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cloruro de mercurio</li> <li>• Dicromato potásico</li> <li>• Ácido pícrico</li> <li>• Acetato de uranilo</li> </ul>
<b>Reticularización de proteínas</b>	Desnaturaliza las proteínas induciendo la ruptura masiva de los puentes de hidrógeno que determinan la estructura helicoidal de las proteínas y forma en su lugar, una malla reticular polipeptídica.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formaldehído</li> <li>• Glutaraldehído</li> <li>• Tetróxido de Osmio</li> </ul>
<b>Mezclas fijadoras</b>	Combina fijadores simples en soluciones complejas, sumando las ventajas de cada uno, amortiguando sus inconvenientes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bouin</li> <li>• Gendre</li> <li>• Zenker</li> <li>• Carnoy</li> </ul>

Existen ciertas propiedades fundamentales que debe poseer un fijador ideal, éstas son (38):

1. *Capacidad para bloquear la autólisis:* Cuanto mayor sea la capacidad, mejor será el agente fijador. Esto depende del poder para producir la desnaturalización proteica, de forma que la actividad enzimática quede paralizada.
2. *Efecto microbicida:* Impide la acción bacteriana que es responsable de la putrefacción.
3. *No provocar retracción o distorsión sobre el tejido:* Este efecto provoca anomalías en la arquitectura tisular.
4. *Inducción de cambios en la textura y composición tisular:* Esto favorecerá la inclusión, corte y coloración del material histológico.

El formaldehído es el fijador más ampliamente utilizado en los laboratorios de AP, esto debido a que es una de las mejores opciones considerando las características ideales que se requieren en un fijador, mencionadas anteriormente.

## **Formaldehído**

El mecanismo de acción mediante el cual la formalina fija las estructuras es, a través, del radical metilenglicol, que es su forma reactiva. Esta sustancia tiende a formar enlaces químicos con todos los grupos químicos, excepto con los de carácter ácido. Por este motivo, tras la ruptura de los puentes de hidrógeno intermoleculares, se forman puentes metílicos entre las moléculas proteicas adyacentes, de forma que los surgidos entre grupos amino, imino, imido, guanidil, hidroxilo, carboxilo y sulfhidrilo son reversibles. Por el contrario, los que se forman entre aminoácidos aromáticos, como la tirosina, triptófano, fenilalanina e histidina, son irreversibles (38). En otras palabras, posee una acción polimerizante, es decir, la formación de complejos de adición por creación de uniones entre las proteínas (39).

### **1. Deshidratación**

Procedimiento cuya finalidad es la remoción o eliminación completa del agua de los tejidos para que se puedan embeber adecuadamente en un medio de inclusión hidrofóbico (40). Este proceso debe ser completo porque, de lo contrario, el solvente no actúa de forma adecuada y el bloque de inclusión no alcanza la dureza requerida (41).

Se puede realizar utilizando cualquier reactivo capaz de absorber el agua de los tejidos, mediante agentes deshidratantes, los principales son alcohol etílico, alcohol metílico, alcohol butílico, dióxido de etileno, acetona, alcohol isopropílico y tetrahidrofurano (40). Se prefieren utilizar los alcoholes isopropílico o etílico, cumpliéndose los siguientes parámetros (40):

**a) Graduación de los alcoholes:** Empleando una serie de alcoholes de graduación ascendente (70%, 80%, 95% y 100%), para evitar una marcada retracción del tejido por acción brusca que produce someterlo inmediatamente a una elevada gradación de este agente.

**b) Volumen y número de baños de deshidratación:** El volumen del baño debe ser por lo menos 10 veces superior al volumen de la muestra que se pretenda deshidratar y debe realizarse en al menos tres baños de deshidratación.

**c) Duración de la deshidratación:** Se considera en función del volumen de las muestras y de su contenido de agua. Debe ser completa y evitar exposiciones prolongadas para provocar endurecimiento excesivo de los tejidos.

## **2. Diafanización**

Es un proceso en el cual, se consigue la sustitución del agente deshidratante por una sustancia miscible con el medio de inclusión que va a utilizarse. Con ello se pretende que toda la pieza histopatológica se halle embebida en un agente químico líquido, en el que pueda disolverse en medio de inclusión y, de este modo, penetrar en el tejido (42). Algunos líquidos diafanizadores son el tolueno, el cloroformo y el xilol, siendo este último el más frecuente (43).

El procedimiento generalmente se hace mediante baños sucesivos en el agente diafanizador, de duración variable en función de las características del agente y del volumen de la muestra (42).

## **3. Impregnación e inclusión**

Este proceso consiste en embeber los tejidos con un medio que llene todas las cavidades naturales, espacios e intersticios tisulares e intracelulares, que proporcione la consistencia firme necesaria para hacer cortes bastantes delgados sin provocar distorsión ni alterar las relaciones espaciales del tejido y los elementos celulares (39). Generalmente se pueden

emplear tres medios de impregnación e inclusión, que pueden ser celoidina, gelatina o parafina, siendo esta última la más frecuente (39).

#### *4.1 Inclusión en parafina*

Las parafinas son hidrocarburos saturados provenientes de la destilación del petróleo, generalmente son sustancias sólidas a temperatura ambiente (43). Existen diferentes tipos de parafinas, que se caracterizan por sus puntos de fusión, los cuales, oscilan entre 40° C y 65°C, estas se clasifican en:

**a) Blandas:** Tienen un punto de fusión de 45°C – 52°C. Son recomendables para incluir tejidos en los que se detectarán ag mediante IHQ (43).

**b) Semiduras:** Sus puntos de fusión son de 54°C – 58°C. Es la parafina que se emplea con mayor frecuencia en los laboratorios donde se realiza técnica histológica. De acuerdo a la temperatura del medio, se recomienda su uso, pues se pueden obtener secciones de 5 a 7 de  $\mu\text{m}$  (43).

**c) Duras:** Tienen un punto de fusión de 60°C – 65°C. Son parafinas que deben usarse en ambientes con climas de temperaturas altas (43).

Durante la inclusión, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que posee la dureza y la consistencia suficiente para obtener secciones delgadas y transparentes.

#### **4. Microtomía y corte**

Se denomina Microtomía al proceso que tiene como finalidad la obtención de cortes, muy delgados del tejido o espécimen que se encuentra incluido en parafina (44). Las secciones delgadas o “cortes” se obtienen mediante un micrótopo, que secciona el bloque de parafina en cortes delgados y de grosor uniforme, estos deben ser de un grosor de 3 a 5  $\mu\text{m}$ , en la mayoría de los casos (43).

Se utilizan dos tipos principales de micrótopos para los cortes de especímenes embebidos en parafina; el de rotación y el de deslizamiento.

**a) Micrótopo de rotación:** Provoca el corte debido a la transformación de un movimiento de rotación en otro de ascenso y descenso del portamuestras. Su principal ventaja es la precisión de los cortes, la posibilidad de obtener secciones seriadas con facilidad y la automatización del proceso de corte, mediante motores eléctricos (44).

**b) Micrótopo de deslizamiento:** Se obtienen cortes mediante un movimiento de deslizamiento del bloque sobre la cuchilla o viceversa. Cabe destacar que estos son más sencillos mecánicamente y su disposición permite cortar bloques más grandes o bloques de celoidina, aunque están cayendo en desuso (44).

Estos instrumentos brindan la ventaja del control del grosor del corte, pudiendo regular el número de micras deseadas, también producen cortes seriados, es decir, cuando se obtiene un corte, éste queda adherido por su borde anterior al borde posterior del que lo precedió; formándose de esta manera una cinta de cortes que va descendiendo por la superficie anterior de la navaja (43).

## **5. Desparafinación**

Para que el corte pueda ser coloreado debe estar completamente libre de parafina y suficientemente hidratado. El proceso para la eliminación de la parafina se denomina Desparafinación y consiste en sumergir la muestra en xilol, lo que provocará la eliminación de la totalidad de la parafina del tejido. Posterior a esto, la muestra debe pasar por baños de alcohol de graduación descendente, para eliminar el xilol restante e hidratar la muestra gradualmente. Finalmente, la muestra es sumergida en agua para su hidratación.

Todo este procedimiento se realiza, porque los colorantes están disueltos en agua destilada o en alcohol, por ende, la parafina no se mezcla con ellos y como ésta ha penetrado en el interior de las células, éstas no podrán ser teñidas (45).

## **6. Tinción de tejidos**

Los tejidos en general carecen de color, por lo que la finalidad de utilizar coloraciones en los preparados histológicos es para poder contrastar y diferenciar estructuras que, por lo general, no poseen color propio.

EL procesamiento completo de los tejidos deja como resultado un corte de tejido incoloro y relativamente traslúcido. Para lograr visualizarlo al microscopio, el tejido debe ser teñido con algún agente colorante. De esta forma, se pueden evaluar tanto la morfología como la distribución de los componentes de la muestra (39).

### *7.1 Tinción Hematoxilina – Eosina*

Técnica considerada de rutina en los laboratorios de AP, puesto que permite evaluar la morfología general del tejido y verificar si se encuentra o no alterado. Con esta técnica se puede obtener un diagnóstico certero o bien solicitar estudios adicionales con otras técnicas como tinciones histoquímicas o reacciones inmunohistoquímicas para complementar el diagnóstico presuntivo.

La tinción de H-E, utiliza como principio básico la combinación de un colorante básico (Hematoxilina) con uno ácido (Eosina), coloreando el tejido mediante la unión electrostática a los componentes ácidos (ADN y ARN) y básicos (citoplasma y fibras colágenas) del tejido, respectivamente.

**a) Hematoxilina:** Colorante básico de origen natural, que se extrae el árbol Hematoxylon Campechianum, el cual, fue encontrado por primera vez en la región de Campeche, México (39).

El extracto natural que se obtiene de la madera no es un colorante activo, por lo que, debe ser oxidado, para formar hemateína. Es en este proceso de transformación oxidativa, donde el hematoxilón pierde dos átomos de hidrógeno y uno de sus núcleos se vuelve quinona. En solución alcohólica o acuosa, la oxidación espontánea es muy lenta y puede requerir hasta de un año. Este proceso de oxidación se denomina “maduración” y se puede lograr casi instantáneamente con oxidantes químicos como el óxido de mercurio, yodato de sodio, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno e hipoclorito cálcico (39).

La hemateína sin mordiente es casi inútil, pues es un colorante que produce una tinción ámbar. Los mordientes son sustancias cuya estructura fisicoquímica facilita la fijación del colorante sobre los tejidos. Para esta tinción se utilizan como mordientes sales bi o trivalentes o

hidróxidos de metales, como las sales de aluminio, hierro, cromo, cobre, molibdeno y vanadio; además de sales simples como sulfatos y cloruros, pero suelen preferirse los alumbres, como el alumbre de potasio, hierro o amonio. El complejo resultante se denomina “laca” de hematoxilina (39).

Este agente es capaz de teñir la cromatina de los núcleos permitiendo evaluar los cambios en los patrones de ésta junto con las alteraciones del tamaño y la forma nuclear, lo cual, constituye un marcador diagnóstico en patología (46).

**b) Eosina:** Son xantenos ácidos o colorantes de ftaleína y es un colorante artificial de naturaleza química ácida, lo que permite ser atraído fuertemente hacia los radicales básicos de la histidina, lisina y arginina presente en las proteínas citoplasmáticas y tisulares. Los representantes más comunes de este grupo de colorantes comerciales son la Eosina Y, la Eosina B y la Safranina. La eosina misma deriva su nombre de su color parecido a la aurora; el “Y” quiere decir amarillento, pues éste es el color predominante de la solución. La eosina se utiliza sobre todo como colorante de fondo o de contraste, en unión con los colorantes de núcleos como la hematoxilina (39,47).

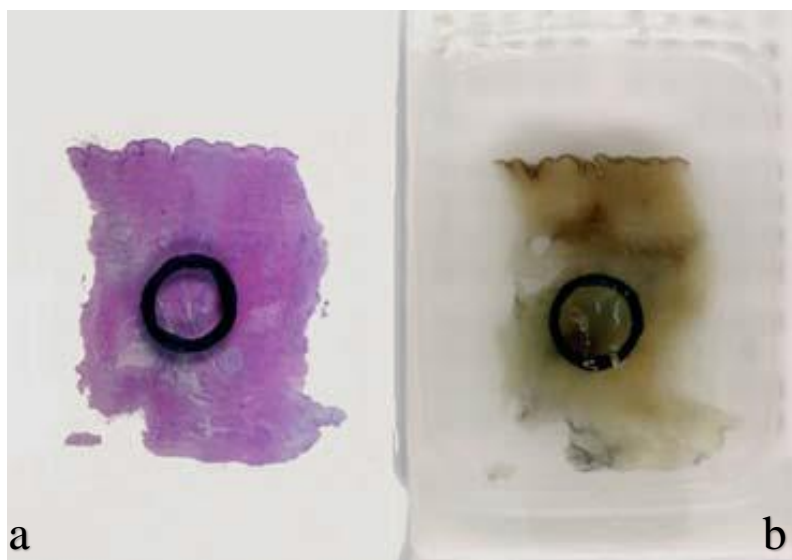
Finalmente con la combinación de ambos colorantes, se visualizan los núcleos de color azul / negro, eritrocitos naranja a rosa y estructuras restantes rosado a rojo (47).

## ANEXO 2. TISSUE MICROARRAY

El Tissue Microarray (TMA) es un mecanismo que es desarrollado por Kononen y cols en 1998, ante la necesidad del análisis de nuevos marcadores para tejidos afectados por cáncer, cuya validación tomaría demasiado tiempo por los métodos convencionales (48).

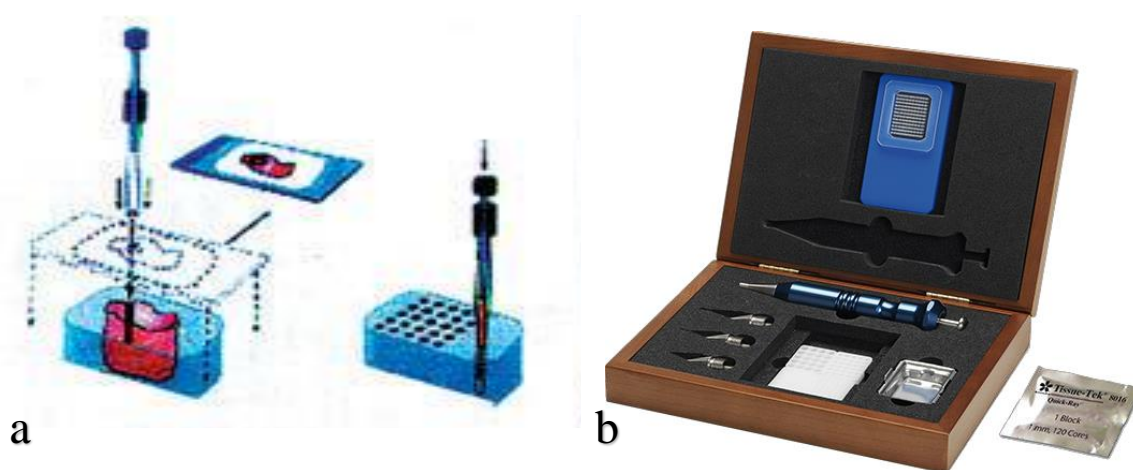
Los TMA consisten en bloques de parafina de hasta 500 muestras (puede llegar incluso a 1200) procedentes de bloques rutinarios previamente seleccionados (49).

Para la confección de los TMA el patólogo selecciona el área de interés y la marca con un rotulador permanente tanto en el portaobjetos como en el bloque de parafina correspondiente (49).



**Figura 1:** (a) *Lámina HE.* Preparación de HE en la que se señala la zona que se desea incluir en el TMA. (b) *Muestra en el bloque de parafina.* En el bloque de parafina se señala la misma zona para extraer el tejido del área seleccionada (49).

Posteriormente se extraen cilindros (0,6 – 2 mm de diámetro y 3-4 mm de longitud) de los bloques de parafina de interés mediante trocar con punta de distintos diámetros. Estos cilindros se transfieren a un bloque receptor de parafina que constituirá la matriz de parafina (49).



**Figura 2:** (a) *Confección TMA.* Esquema que muestra la confección de un bloque de TMA. De la zona seleccionada se extrae un cilindro del bloque de parafina y este cilindro se lleva al bloque matriz de TMA. (b) *Puncher Sakura. Tissue- Tek® Quick- Ray™ Tissue Microarray System Kit* con los utensilios usados para la confección de los TMA.

Una vez cortado el bloque, se obtiene portaobjetos con gran número de secciones circulares que pueden incluir muestras de todos los tejidos, tanto órganos normales, como distintos tipos tumorales o de distintos casos de un tipo tumoral (49).

Para muestras tumorales suelen emplearse agujas de 0,6 – 1,5 mm. Para muestras de tejidos normales se recomienda el empleo de agujas de 1,5 mm, ya que proporcionarán secciones de un área suficiente para incluir diferentes capas tisulares (49). Además, cabe destacar que el empleo de agujas de mayor calibre (2mm) es desaconsejado por algunos autores pues pueden dañar el bloque donante (50).

Para un óptimo aprovechamiento del TMA pueden realizarse todas las secciones en una única sesión de corte hasta agotar el bloque. De esta forma se evita la pérdida de material que conlleva la reorientación del bloque en cada sesión de corte (49).

De un bloque pueden obtenerse hasta 200 secciones, dependiendo de la habilidad del tecnólogo y de la longitud de los cilindros. Esto conlleva el problema del almacenamiento de las secciones, a fin de evitar pérdida de antigenicidad, la que va disminuyendo con el tiempo (49).

El pequeño tamaño de las secciones de los TMA puede plantear dudas acerca de la representatividad de las muestras, sin embargo, se ha comprobado la perfecta correlación entre los resultados obtenidos con los TMA y los obtenidos con bloques convencionales (51,52). Incluso se

pueden obtener mejores resultados con TMA que con secciones completas cuando se trata de comparar resultados con diferentes técnicas, debido al menor campo analizado y, por tanto, a la mayor homogeneidad de las observaciones (53).

### **1. Ventajas y aplicaciones**

- Permitir un gran ahorro de reactivos y tiempo (tanto en la realización de la técnica como en la interpretación). Una sola sección de TMA inmunoteñida sustituye a decenas o cientos de cortes completos (49).
- Validar y optimizar técnicamente nuevos ac de forma rápida y económica (54).
- Analizar el perfil de expresión de nuevos ac en diferentes tejidos normales y tumorales incluidos en los TMA (55).
- Asegurar la homogeneidad del protocolo en todas las muestras del TMA, permitiendo una comparación fiable de los resultados inmunohistoquímicos en múltiples casos (49).
- Disminuir las variaciones interobservadores en la valoración cuantitativa inmunohistoquímica de distintos casos (49).
- Posibilitar la correlación con otras técnicas histológicas en cortes seriados (49).
- Permitir añadir a determinados casos una sección de un pequeño TMA (minicontrol) con líneas celulares o muestras seleccionadas de distintos scores (muy útil en el análisis de marcadores predictivos de cáncer de mama) (49). El TMA en miniatura (12 cilindros de 0,6 mm) sirve no solo para controlar la técnica, sino también como guía para la interpretación de los resultados (56).
- Disponer de múltiples tejidos normales o patológicos en una única preparación con fines docentes (49).
- Facilitar la cesión de bloques de tejidos humanos y, por tanto, la colaboración entre diversos grupos de investigación (49).

## 2. Problemas y limitaciones

- El principal problema en la elaboración de los TMA radica en conseguir que los extremos de los cilindros formen una superficie plana en el bloque receptor (49).
- Dificultad para cortar los TMA con aprovechamiento óptimo, lo que genera pérdida de muestras en la seriación, al ser los cilindros de diferente altura o desprenderse (49).
- Artefactos al cortar los cilindros si están muy juntos, por lo que, los cilindros deben separarse lo suficientemente para evitar estos problemas, aún a costa de incluir menos cilindros (49).
- Rotura de bloques debido a la heterogeneidad (49).
- Representatividad de la muestra, si se trata de tejidos heterogéneos (49).
- Dificultad inherente al análisis y archivo de los números datos extraídos de 500 o más secciones (49).
- Necesidad de disponer de un equipamiento costoso para la confección del TMA. Aunque se han publicado alternativas manuales que permiten el análisis en un mismo portaobjetos de hasta 220 secciones (49).

Para el desarrollo del método que permite medir la calidad de los biomateriales usados en los laboratorios de histopatología, se utilizó el TMA que asegura la homogeneidad del protocolo en todas las muestras de tejido mamario de pacientes que padecen cáncer mamario. Condición que fue escogida, porque el diagnóstico, pronóstico y orientación terapéutica de esta enfermedad, depende del análisis inmunohistoquímico de las muestras.

### **ANEXO 3. INMUNOHISTOQUÍMICA**

La inmunohistoquímica (IHQ) una técnica esencial y de uso rutinario en anatomía patológica, que combina la histología y la inmunología permitiendo el diagnóstico específico de enfermedades, en particular las neoplásicas; permitiendo una adecuada clasificación en función del linaje y origen (tales como carcinoma, melanoma, linfoma, etc.); de esta forma brinda información pronóstica y sus resultados evaluados en el contexto clínico, contribuyen a la elección del tratamiento de los pacientes (57).

Se basa en la alta especificidad y afinidad de la reacción antígeno-anticuerpo, (ag-ac) permitiendo mediante el empleo de ac específicos y sistemas de detección, determinar la expresión de biomarcadores (proteínas). Se puede realizar tanto sobre tejido en fresco, fijados en formol y coágulos citológicos incluidos en parafina, permitiendo la evaluación simultánea de la morfología (57).

Es una técnica compleja, en la cual, el resultado final está influenciado por múltiples parámetros de las fases preanalítica, analítica y postanalítica. Dependiendo de la selección y el rendimiento de estos parámetros, el resultado final de la técnica utilizando el mismo ac primario, puede variar un rango de negativo a positivo para el ag obtenido (57).

Para que su empleo sea de máxima utilidad y los resultados obtenidos sean reproducibles y confiables es imprescindible la estandarización de cada uno de los pasos o fases desde la obtención de la muestra, con la adecuada fijación de los tejidos, hasta el ajuste de la técnica, lectura y valorización de los obtenidos a los criterios establecidos mediante controles de calidad internos y externos (57).

Una adecuada técnica de IHQ debe asentarse en una base sólida. En este sentido deberá prestarse especial atención a los factores que influyen de manera más significativa (57):

**TABLA 1.** Fases que deben estandarizarse para una adecuada técnica de inmunohistoquímica (57).

<b>FASE PREANALÍTICA</b>	<b>FASE ANALÍTICA</b>	<b>FASE POSTANALÍTICA</b>
1. Prefijación 2. Fijador 3. Fijación 4. Postfijación: - Procesamiento: deshidratación, lavados e impregnación en parafina - Cortes de parafina - Almacenamiento	1. Recuperación antigénica 2. Bloqueo de enzimas endógenas 3. Anticuerpo primario 4. Diluyente 5. Sistema de detección 6. Cromógeno 7. Contracolor y montaje	1. Diseño de controles 2. Controles positivos 3. Controles negativos 4. Interpretación 5. Indicadores críticos de coloración

## 1 Fase preanalítica

La mayoría de las variables preanalíticas impactan en el resultado de la técnica de la IHQ. La tasa de pérdida de integridad de epítopes antigénicos depende de ellas. Una fijación inadecuada impide cualquier resultado fiable y la falta de reproducibilidad de la técnica de IHQ es en parte consecuencia de aquella (57).

### 1.1 Prefijación

Según de Dios Soler (57), los factores que influyen en el resultado de la IHQ comienzan con la toma de la muestra. Por lo que, lo primero que se ve afectado es el tiempo de isquemia, el cual, hace referencia al período que transcurre entre la interrupción del flujo sanguíneo y el inicio de la fijación. Cabe destacar que un periodo de isquemia prolongado conlleva acidosis tisular, degradación enzimática y alteración de la inmunoreactividad, lo que puede comprometer la calidad tisular, incidiendo en un diagnóstico errado. Se distinguen dos tipos de isquemia:

**a) Tiempo de isquemia caliente (IC):** es el tiempo que transcurre entre la interrupción del flujo sanguíneo y la exeresis.

**b) Tiempo de isquemia fría (IF):** es el tiempo que transcurre desde que la muestra de tejido es obtenida (exeresis) y sumergida en formalina. Cabe destacar que la demora en la fijación

(mayor tiempo de isquemia fría) altera de manera significativa no solo a las proteínas, ya sea aumentando, disminuyendo o deslocalizando la inmunoreactividad, sino también al material nuclear (ADN y ARN), cuya adecuada conservación es imprescindible para la realización de técnicas moleculares. Las guías internacionales recomiendan un tiempo de IF no superior a 1 hora.

El deterioro de los epítopes antigénicos causados por la IF no puede ser revertido mediante la recuperación antigénica.

Otras variables de fijación que pueden influir en el resultado de la IHQ son la coagulación de proteínas por calor, resultante del uso de electrobisturí en el procedimiento quirúrgico y el secado del tejido.

A diferencia de la isquemia caliente, la IF está sujeta a un cierto control, por lo que, es una de las variables estudiadas en la presente tesis.

## *1.2 Fijador*

El fijador universalmente aceptado; formol o formalina (solución acuosa de formaldehído), es el usado en IHQ. Las características específicas del espécimen en cuestión fueron explicadas en la sección “Fijación/ Formaldehído” del apartado “Procesamientos de tejidos” descrito anteriormente.

## *1.3 Fijación*

La fijación tiene como objetivo la preservación de los tejidos, conservando la morfología celular lo más parecido posible al estado vivo, previo a los fenómenos de autólisis y putrefacción. El detalle de este procedimiento está detallado en la sección “Fijación” del apartado “Procesamiento de tejidos”, descrito en el capítulo anterior.

Cabe destacar que el efecto reticulante de la formalina, desnaturaliza las proteínas del tejido, rompiendo los puentes de hidrógeno presentes para formar uniones entre cruzadas (cross-linking), evitando la degradación de las proteínas, de esta manera se ven enmascarados los epítopes del ag. Si bien estas uniones pueden ser revertidas por la recuperación antigénica, los tejidos con un tiempo de fijación menor a 24 horas experimentan una fijación híbrida; donde periféricamente se fija con formalina, mientras que la zona más profunda se fija con los alcoholes empleados en el proceso de deshidratación, dejando a las proteínas más expuestas a la recuperación antigénica

pudiendo generando posibles falsos positivos, mientras que un periodo excesivo de fijación incrementa el enmascaramiento antigénico, ocasionando que el tejido en cuestión requiera un mayor tiempo de recuperación antigénica (31,57,58).

Un aspecto que debe evitarse es que el tejido se seque en cualquiera de las etapas, ya sea durante la extracción, el procesamiento o la realización de la técnica propiamente tal. Esto es debido a que el secado puede causar cambios morfológicos especialmente incide en una pobre definición de la cromatina y puede generar cambios estructurales en los bordes celulares, ocasionando por una parte la inhibición de la unión ag-ac, y por otra incidir en el incremento de la unión inespecífica, lo que interferirá finalmente en la interpretación del resultado. Es por esto, que se recomienda constatar cada periodo de tiempo, tanto el de IF, el de fijación y el tipo de fijador empleado. El conocer estos datos, otorgará al momento de la interpretación, la solución de posibles problemas técnicos y de explicación a resultados inesperados (57).

#### *1.4 Postfijación*

Los procesos que están involucrados en esta etapa corresponden a la deshidratación, impregnación, montaje, corte y almacenamiento, los cuales, fueron descritos en profundidad en la sección “Procesamiento de tejidos” del capítulo anterior.

Cabe destacar que los cortes están dados por secciones de 3-4  $\mu\text{m}$ . de espesor y el montaje debe efectuarse siempre en portas de vidrios limpios silanizados o de carga positiva, para evitar que el tejido se desprenda, esto se debe a que la carga electrostática positiva resultante en el portaobjetos, interactúa con las cargas negativas de las proteínas atrayéndolas. Un error en la manipulación del portaobjetos, puede provocar desprendimientos parciales del tejido, lo que incidiría en falsos positivos, debido al atrapamiento de reactivos (31,57).

## **2 Fase analítica**

Esta fase comienza con el desparafinado y termina con el montado de los cortes contracolorados. Es en esta fase donde se efectúan los procedimientos de la técnica IHQ propiamente tales. Las variables de esta fase, las cuales, a diferencia de las preanalíticas pueden controlarse y modificarse dentro del laboratorio de patología, son:

### *2.1 Recuperación antigénica*

Es el procedimiento mediante, el cual, se restaura la estructura molecular del ag y se recupera la inmunoreactividad, permitiendo obtener resultados inmunohistoquímicos óptimos. Se puede obtener mediante tres métodos distintos; inducida por calor, por digestión enzimática o la combinación de ambos métodos (57). En la presente investigación se utilizó el método inducido por calor.

### *2.2 Bloqueo de enzimas endógenas*

La enzima peroxidasa y fosfatasa alcalina son las utilizadas para la coloración en IHQ y debido a que se encuentran en una variedad de tejidos, su actividad endógena debe ser bloqueada, para evitar señales que se generarían al interactuar con el sustrato y el cromógeno, interfiriendo al momento del análisis (57).

La enzima por bloquear dependerá de la enzima que se vaya a usar para la coloración. En el caso de la peroxidasa su actividad es una propiedad común de todas las hemoproteínas, cuyo sitio activo tiene un grupo con contenido de hierro (hemateína), por lo que, se puede encontrar en la hemoglobina (glóbulos rojos), mioglobina (células musculares), citocromo (granulocitos, monocitos) y catalasas (hígado y riñón). La actividad de la peroxidasa puede ser inhibida por exceso del sustrato peróxido de hidrógeno (31,57). La fosfatasa alcalina tiene varias isoformas y es producida en el hígado, hueso, túbulos proximales del riñón, neutrófilos, intestino, placenta, folículos y zona del manto del tejido linfoide. Su actividad es inhibida por la adición de lavamisol al cromógeno/sustrato (57).

### *2.3 Anticuerpo primario*

El ac es una molécula que posee la capacidad de unirse en forma específica a otra molécula o proteína denominada ag. Mientras que el ag es una sustancia o molécula capaz de desencadenar una respuesta inmunológica y de unirse a un ac (31).

La reacción ag-ac se fundamenta en la unión específica del ag de la molécula a identificar al ac correspondiente para dar un complejo exclusivo (59).

Cuando se diseña un procedimiento experimental, es importante diferenciar entre ac monoclonales y policlonales, ya que estas diferencias son el fundamento de las ventajas y limitaciones en su uso (60).

Los ac monoclonales se obtienen a partir de células de mieloma de ratón fusionadas con células B humanas o de un animal, productoras del ac deseado (hibridomas), de esta forma, se consigue una población celular de crecimiento indefinido productora de un solo ac específico (59). Los ac monoclonales se caracterizan por ser de extremada pureza, afinidad y avidéz, pero su uso exige sumo cuidado en el tratamiento del tejido para evitar que se altere el único determinante a reconocer, sin embargo, de forma general son los ac más recomendables y con los que se obtienen mejores resultados (57,59).

Los ac policlonales en cambio, son una mezcla de inmunoglobulinas (Ig) sintetizadas por diferentes clones de células plasmáticas y que reaccionan con distintos epítopes sobre el ag para el cual fueron creados (57). Se obtienen por extracción del suero de un animal (habitualmente conejos) previamente inmunizado con el ag que se pretende estudiar (57,59). La presencia de ac humanos contra proteínas del conejo es mucho más rara que contra proteínas de otros animales y al detectar varios epítopes antigénicos tienen gran avidéz y alta sensibilidad, ya que, aunque alguno de los epítopes se destruya durante el procesamiento quedarán otros epítopes que serán reconocidos, proporcionando de esta forma un ensayo más consistente (57).

La selección del ac primario y las condiciones analíticas aplicadas tienen un impacto significativo con respecto a la sensibilidad y especificidad del diagnóstico IHQ que incide directamente en el manejo y tratamiento de los pacientes, por lo que, es primordial el uso de ac que sean de buena calidad, altamente sensibles y específicos, con resultados reproducibles y robusto (no influenciado por factores preanalíticos) (57).

### *2.3.1 Anticuerpos de interés*

Los ac que se utilizaron en la presente investigación fueron; citoqueratina (CK) y vimentina (VIM), para caracterizar la calidad de los tejidos provenientes de las muestras de mama.

### **a. Citoqueratina (CK)**

Constituyen el principal componente del citoesqueleto de las células epiteliales (incluyendo mucosa y glándulas), así como también en algunas células no epiteliales, donde forman un gran grupo de filamentos intermedios cuyo diámetro oscila entre 8 y 10 nm (61–63).

En la especie humana forman una compleja familia que corresponden a un grupo de 19 proteínas que se clasifican en tipo A o clase I; proteínas pequeñas, más acídicas y numeradas de 9 a 19 y tipo B o clase II; proteínas relativamente grandes (56 a 67 kDa), básicas, numeradas de 1 a 8 (61,64).

Se ha establecido que las CK de bajo peso molecular (40 kDa), se encuentran en epitelios simples y glandulares, las de peso molecular intermedio en epitelios estratificados y las de alto peso molecular (~ 67 kDa) en epitelios queratinizados (61).

Específicamente en la investigación se utilizó CK clones AE1/AE3, que es una mezcla de dos ac monoclonales que se obtienen inmunizando ratones con queratinas callosas humanas (65). Se ha observado que AE1/AE3 identifica la mayoría de las CK humanas y, por tanto, puede ser usado como herramienta para la identificación inmunocitoquímica positiva de células de origen epitelial estratificado y simple (65–67). El ac AE1 inmunorreacciona con un determinante antigénico presente en la mayoría de las CK de subfamilia A (67), mientras que el ac AE3 reacciona con un determinante antigénico compartido con las CK de la subfamilia B (68).

Los clones AE1/AE3 identifican dos tipos de isótopos presentes en la mayoría de CK epiteliales (69). De esta forma los resultados contribuyen en la clasificación del tejido normal y neoplásico como de origen epitelial (65,66).

### **b. Vimentina (VIM)**

Es una proteína de filamentos intermedios, de un peso molecular de 57 kDa, que forma parte del citoesqueleto de las células de los vertebrados (70). La VIM pertenece a la clase III de las cinco clases de filamentos intermedios, que tienen un diámetro de 10 nm y son encontrados principalmente en las células de origen mesenquimal como; fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, células de Schwann, linfocitos, así como células mioepiteliales de las glándulas

sudoríparas, salivales y de mama (71,72). Específicamente en la investigación se utilizó el ac monoclonal de ratón antivimentina, clon V9, isotipo Ig1, kappa (70).

Inicialmente se pensó que la especificidad del tipo de célula, exhibida por cada subtipo de filamentos intermedios, estaba retenida tanto en las células malignas como en sus homólogas normales, lo que convertía a los filamentos intermedios en importantes marcadores diagnósticos en histogénesis, pero en la actualidad se ha demostrado la coexpresión de los filamentos intermedios, particularmente la VIM y CK en una variedad de tejidos y células normales y en lesiones neoplásicas, por lo que, el rol que previamente cumplían como marcadores de histogénesis debe ser completado con él con el uso de paneles de ac más específicos para el diagnóstico diferencial de tumores (73,74).

#### *2.4 Diluyentes*

En la práctica es habitual diluir los ac antes de utilizarlos para optimizar las concentraciones finales de los mismos, puesto que, si se utiliza a concentraciones muy elevadas, las interferencias y el ruido de fondo serán mayores, además de que se utilizará más reactivo del necesario, encareciendo el coste de la experimentación, volviéndose imprescindible la dilución con el fin de obtener el mejor rango señal/ruido (75).

Es por ello, que para determinar la concentración óptima de uso de un determinado ac es necesario la titulación de este, utilizando diluciones seriadas de la solución madre del ac. De esta forma se logra una máxima coloración específica con el mínimo fondo, permitiendo observar tinción en tejidos con baja expresión del ag en cuestión (57).

Generalmente los fabricantes ofrecen reactivos prediluidos o recomiendan las condiciones óptimas, que incluyen; rangos de dilución, tiempo y temperatura de incubación y método de detección (57).

#### *2.5 Sistemas de detección*

Para que la unión del ac con el ag pueda ser vista al microscopio, es necesario emplear sistemas de detección y métodos de coloración que permitan su visualización.

### 2.5.1 Técnicas de inmunoperoxidasa

La enzima peroxidasa, obtenida del rábano picante, es el trazador enzimático más utilizado. Puede emplearse en técnicas con ac marcados (técnicas directas o indirectas o con ac sin marcar (técnica de peroxidasa antiperoxidasa) (76).

#### **Técnicas con anticuerpos marcados**

En este tipo de métodos el trazador va unido de forma covalente al ac, pudiendo procederse mediante los métodos directo o indirecto (76).

##### **1. Método directo**

Es el procedimiento más sencillo, pero también el menos sensible para la detección de ag. En él, el ac o antisuero primario se conjuga directamente con la enzima peroxidasa. El método presenta la desventaja que puede ser difícil conseguir la conjugación entre el ac y el trazador, también que durante el procedimiento de conjugación puede destruirse en parte la actividad del ac, enzima o ambos y por último es posible que se produzca una mezcla de ac conjugados y no conjugados de forma que sea casi imposible purificar los primeros (76).

##### **2. Método indirecto**

En este procedimiento el ac primario o específico sin conjugar se una en un primer paso con el ag presente en la sección de tejido. En una segunda fase se añade un ac marcado con el trazador enzimático, obtenido de un animal distinto al primario y específico para el animal y la clase de inmunoglobulina que constituye el ac primario. Este ac recibe también la denominación de secundario. El complejo así formado puede visualizarse incubando el corte de tejido con un sustrato cromógeno adecuado (76).

En resumen, según García de Moral (76), para la técnica de inmunoperoxidasa indirecta se utilizan dos ac:

- Uno primario sin marcar
- Uno secundario dirigido frente al primero, marcado con peroxidasa y obtenido de un animal distinto

El método indirecto posee las ventajas de ser más sensible que la técnica directa y el ac secundario puede utilizarse para todos los antisueros primarios posibles obtenidos de una misma especie (76).

### **Técnicas con anticuerpos no marcados**

#### **1. Método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP):**

Este procedimiento utiliza como trazador inmunocomplejos formados por la enzima peroxidasa y ac específicos frente a ella, en lugar de ac marcados. La peroxidasa se obtiene del rábano picante, mediante un proceso de purificación y se inocular a un animal para obtener los ac dirigidos frente a la enzima. De este modo, al poner en contacto <in vitro> los ac con la peroxidasa se forman complejos ag-ac (complejo peroxidasa-antiperoxidasa o complejo PAP) a través de una reacción de precipitación. Estos complejos están formados por tres moléculas de peroxidasa y dos de ac antiperoxidasa (76)

Para este procedimiento de inmunotinción, se utilizan sucesivamente tres reactivos inmunes diferentes (76):

2. Ac primario, semejante a los empleados para los métodos de inmunoperoxidasa directa e indirecta.
3. Ac puente o secundario, que unirá el ac primario al complejo PAP.
4. Complejo PAP, que contiene la enzima que actuará como trazador de la reacción inmune.

Este procedimiento de inmunolocalización es de 100 a 1000 veces más eficaz que los métodos indirectos que emplean ac marcados con fluorocromos o peroxidasa y 20 veces más sensible que las técnicas en que el ac antiperoxidasa y la peroxidasa se aplican como soluciones separadas (76).

#### *2.5.2 Técnicas con fosfatasa alcalina*

La fosfatasa alcalina es una enzima capaz de hidrolizar los ésteres de fosfato en un medio alcalino. Debido a la mayor dificultad de su manejo, se utiliza menos que la peroxidasa. La mayor ventaja para la utilización de esta enzima como trazador es debido a la escasa proporción

de tejidos que en condiciones normales la contienen, no suele ser necesario inhibir su actividad endógena (76).

### 2.5.3 *Métodos de avidina-biotina*

Se trata de procedimientos técnicos muy sensibles que utilizan ac marcados y se basan en la gran afinidad que entre si poseen las moléculas de biotina y las de avidina, de forma que se genera un fuerte enlace no covalente que representa una de las uniones químicas más fuertes que se conocen (49).

La avidina es una glicoproteína de alto peso molecular extraída de la clara del huevo, que se compone por cuatro subunidades que configuran una estructura terciaria con cuatro regiones hidrofóbicas de unión con la biotina (49,76).

La biotina por su parte es una vitamina de bajo peso molecular, que se encuentra en la yema del huevo, la cual, se conjuga fácilmente con ac y enzimas trazadoras por ligarse de forma covalente a cadenas laterales amino o carbonilo de residuos aminoácidos o de azúcares de proteínas y glicoproteínas (76).

En todos los métodos inmunoenzimáticos que utilizan el procedimiento de avidina y biotina para poner de manifiesto una reacción ag-ac, es posible realizar el marcaje con biotina del ac primario (técnica directa) o lo que es mucho más habitual, del ac secundario (técnica indirecta) (49).

La fase no inmunológica del proceso puede implicar (76):

- Realizar una unión del ac biotinilado con avidina sin marcar para ligar a continuación el complejo con una enzima también biotinilada (método puente avidina-biotina).
- Aplicar un complejo de avidina y trazador enzimático biotinilado que contenga lugares de unión libres en la avidina para que se produzca la fijación sobre el ac primario o secundario biotinilado (método de complejo avidina-biotina o ABC).

En todas las variantes expuestas puede unirse un gran número de moléculas de biotina a un ac único, por lo que, la proporción trazador/ac es muy elevada. Esto hace que la sensibilidad

de este tipo de métodos sea muy alta y permite que el ac primario pueda emplearse muy diluido (76).

## **Sistemas de detección basados en polímeros**

### **1. - Sistema EPOS (Tinción mejorada de polímero en un solo paso):**

Este sistema consiste en la utilización de un polímero hidrosoluble de dextrano, que lleva conjugado covalentemente tanto el ac primario (unas 10 moléculas) como la enzima (hasta 70 moléculas) (57)(49).

Es una técnica rápida, porque consta de un único paso (técnica directa) y se realiza la inmunotinción en 10 minutos, lo cual, representa una ventaja para biopsias intraoperatorias. Su principal limitación radica en que solo pueden emplearse los ac primarios que hayan sido conjugados con el polímero por el proveedor, lo que le resta versatilidad (57)(49).

### **2.- Método de polímero en dos pasos:**

**a) Método EnVision:** Este sistema es similar al anterior, pero consta de dos etapas en lugar de una, donde el ac secundario está unido a la molécula de dextrano, de tal forma que la coloración es realizada primero por incubación con el ac primario seguido por el polímero (57)(49). La conjugación de ac secundarios antiespecie (anti-conejo y/o anti-ratón) hacen al sistema útil para ac primarios poli y monoclonales, además cabe destacar que el polímero lleva incorporadas unas 20 moléculas de ac antiespecie y alrededor de unas 100 moléculas de enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina), con lo que la sensibilidad es muy alta (57).

**b) Método PowerVision:** Emplea pequeñas moléculas capaces de polimerizar con el ac secundario y con moléculas de enzimas de manera lineal y compacta a modo de “rascacielos” (57). Esta disposición permite la unión de múltiples conjugados a ag próximos, a los cuales, el dextrano por su alta masa molecular y su compleja disposición tridimensional podría ver comprometido su acceso (49). La disposición de este sistema, permite el incremento de la sensibilidad y eficiencia (49).

## 2.6 Enzimas y cromógenos

Basándose en la reacción enzima-sustrato los métodos de coloración inmunoenzimáticos utilizan enzimas para convertir cromógenos, sin color, en productos finales coloreados como resultado de su oxidación (57).

Las enzimas son proteínas catalizadoras, que pueden actuar como aceleradores o retardadores de una reacción químicas, en este procedimiento en particular son usadas las peroxidasa y la fosfatasa alcalina (76).

### Enzimas

**a) Peroxidasa (HRP):** Enzima oxidorreductasa que se aísla de la raíz del rábano (57). La hematina de la peroxidasa forma un complejo con el peróxido de hidrógeno (sustrato) dando como producto de reacción agua y oxígeno, el cual, al ser liberado provoca la oxidación del cromógeno 3,3'diaminobenzidina (DAB), originando un producto de color pardo e insoluble en alcohol y otros solventes orgánicos, lo que va a permitir la deshidratación de los cortes y el montaje en medio permanente (57)(49).

**b) Fosfatasa alcalina:** Enzima obtenida del intestino del ternero, la cual, hidroliza los ésteres de naftol fosfato (sustrato) dando origen a compuestos fenólicos y fosfatos (57). Los fenoles reaccionan con sales incoloras de diazonio (cromógeno) para producir colorantes insolubles azo (57).

### Cromógenos

**a) Diaminobenzidina (DAB):** 3,3' diaminobenzidina produce un producto final color marrón altamente insoluble en al alcohol y otros solventes orgánicos, su oxidación también causa polimerización que resulta en la habilidad para reaccionar con tetróxido de osmio aumentando su intensidad de coloración y densidad electrónica (49).

**b) Aminoetilcarbazol (AEC):** Tras la oxidación forma un producto final color rojizo, por lo que debe usarse contra coloración y en medio de montaje de tipo acuoso. Es sensible a oxidación posterior y la exposición a luz excesiva produce una disminución de la intensidad de su coloración (49).

c) **Naftol AS-MX fosfato:** Puede ser usado como Fast Red o Fast Blue, los que producen un producto final coloreado rojo o azul, respectivamente. Son solubles en solventes alcohólicos u otros solventes orgánicos, por lo que, se deben usar en medio de montaje acuoso (49).

d) **Fucsina nueva:** También da un producto final color rojo, pero a diferencia del Fast red o Fast blue, el color producido por la Fucsina nueva es insoluble en alcohol y otros solventes orgánicos, permitiendo deshidratar el espécimen antes de ser montado con cubreobjetos, obteniendo una mayor intensidad en su coloración en comparación a Fast red y blue (57).

### *2.7 Contracolor y montaje*

Posterior al procedimiento de revelado con el cromógeno, se contrasta con Hematoxilina preferentemente de Mayer, la cual es muy selectiva para colorear la cromatina nuclear y por tratarse de una tinción progresiva, no requiere diferenciación posterior, lo que la hace muy apropiada para el uso en IHQ, ya que el grado de acidificación provocado sobre el tejido es mucho menor (47).

Posterior al contraste se procede con el procedimiento estándar de deshidratar el corte, aclararlo y finalmente montarlo como una muestra de rutina.

### **Causas de falla de la técnica IHQ en la fase analítica:**

De acuerdo al estudio publicado por NordiQC luego de la evaluación de más de 300.000 casos durante el período 2003-2015 con participación de más de 700 laboratorios de 80 países del mundo las causas más frecuentes de falla en la fase analítica fueron (57):

**TABLA 2.** Causas más frecuentes de errores en la fase analítica (NordiQC) (57).

CAUSA	%
<b>1.- Elección inadecuada del ac:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ac poco sensible o específico</li> <li>• Ac poco robusto</li> <li>• Ac listo para usar pobremente calibrado</li> <li>• Ac dependiente de la plataforma</li> </ul>	<b>17%</b>
<b>2.- Dilución inadecuada del ac primario</b>	<b>20%</b>
<b>3.- Insuficiente o errónea recuperación antigénica</b>	<b>27%</b>
<b>4.- Sistemas de detección poco sensibles o propensos a errores</b>	<b>19%</b>
<b>5.- Otras:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteración morfológica secundaria a excesiva temperatura o tiempo de la recuperación antigénica o digestión enzimática</li> <li>• Sacado del tejido</li> <li>• Protocolos dependientes de la plataforma</li> <li>• Excesivo contracolor</li> </ul>	<b>17%</b>

### 3 Fase postanalítica

#### 3.1 Diseño de controles

Antes de proceder a valorar los resultados de la técnica IHQ hay que confirmar la especificidad de la reacción, por lo que es imprescindible reconocer los problemas que pueden plantearse y establecer los controles adecuados para detectarlos (49):

#### 1. Falsos negativos

Constituyen los problemas más difíciles de detectar, pero generalmente una vez localizados suelen ser los más fáciles de subsanar. Pueden ser debidos a factores previos a la técnica IHQ (preanalíticos), inherentes a la misma (analíticos) o posteriores a ella (postanalíticos) (49). En el procesamiento de la técnica IHQ, se pueden distinguir los siguientes errores dependiendo de la fase implicada, cabe destacar que no son estrictamente inherentes a la técnica

como tal, ya que algunos están relacionados al procesamiento de las muestras (como se detalló en el apartado “Error en anatomía patológica”).

Como indicó García-Caballero et al. (49) los errores asociados al procesamiento de la muestra que inciden posteriormente en el resultado de la técnica IHQ, son:

Fase preanalítica:

- Tiempo transcurrido desde la extracción de la muestra hasta su fijación.
- Fijación excesiva.
- Eliminación incompleta de la parafina por desparafinado que provoca la aparición de áreas negativas irregulares y problemas de fondo.

Y los errores que son exclusivos de la ejecución de la técnica IHQ son (49):

Fase analítica:

- Recuperación antigénica inadecuada.
- Dilución excesiva del ac primario u otro de los reactivos empleados.
- Tiempos de incubación insuficientes.
- Omisión involuntaria de alguna de las etapas u orden inadecuado de las mismas.
- Mal estado de alguno de los reactivos.

Fase postanalítica:

- Deshidratación y montaje en medio permanente tras el empleo de cromógenos solubles en alcohol.
- Contratación excesiva que podría llegar a enmascarar una inmunotinción en caso de ser esta muy débil.
- Interpretación errónea.

## **II. Falsos positivos**

Representan los problemas más graves que pueden ocurrir, pues conducirán a conclusiones erróneas. Los más importantes son inherentes al ac primario, pero pueden originarse en otras etapas del proceso (49).

### **Anticuerpo primario**

La selección del ac primario y las condiciones analíticas aplicadas tienen un impacto significativo con respecto a la sensibilidad y especificidad del diagnóstico inmunohistoquímico y por lo tanto, en el manejo de los pacientes (49). Por ende, se deben utilizar ac de buena calidad, donde el ideal es que sea altamente sensible y específico, reproducible y robusto (no influenciado por factores preanalíticos) (57).

Para escoger el ac, es recomendable realizar un análisis exhaustivo, de cada uno de los clones disponibles para el ac en cuestión, donde se deberá evaluar; sensibilidad, especificidad, utilidad para el propósito, dependencia de la composición química de los reactivos, de la secuencia de aplicación de los mismos y de la plataforma de tinción inmunohistoquímica utilizada por el laboratorio (57).

Es importante considerar que la sensibilidad de un mismo clon puede variar según el fabricante, por lo que, cada decisión incidirá de forma significativa en el resultado final (57). Muchos ac, como por ejemplo el cóctel de ac monoclonales de ratón AE1/AE3 contra “pancitoqueratina” y el ac policlonal de conejo contra “S100”, llevan años o décadas en el mercado y todavía proporcionan excelentes resultados de tinción, mientras que otros ac deben ser reemplazados cuando se dispone un ac nuevo y mejorado debido a su baja sensibilidad y/o especificidad (57).

### *3.2 Controles positivos*

Los controles positivos confirman que la técnica IHQ se desarrolló sin problemas, además sirven como control de una adecuada incubación de las diferentes etapas de la técnica y del buen estado de los reactivos (49).

### **Controles positivos externos**

Los controles positivos externos consisten en secciones que presentan el ag no investigado en buen estado de preservación y que se tiñen conjuntamente con las secciones en estudio, lo ideal es el empleo de secciones procedentes del mismo laboratorio (in house control), que aseguren que la fijación y el procesamiento fueron los mismos que en la muestra en estudio

(49). Se seleccionarán como controles externos muestras que no presenten una inmunoreactividad muy intensa, de forma que puedan detectarse cambios ligeros en la sensibilidad de la técnica (49).

### *3.3 Controles negativos*

Los controles negativos aseguran la especificidad de la inmunotinción y tienen dos acepciones; la biológica, que es opuesta al concepto de control positivo antes comentado, la que hace referencia a secciones (control negativo externo) o componentes de una sección (control negativo interno) que carecen del ag en estudio (49). La segunda acepción está relacionada con la técnica, puesto que, para poder afirmar que una reacción inmunohistoquímica es específica, hay que demostrar ausencia de inmunotinción al omitir alguna de las etapas esenciales de la técnica (49).

### *3.4 Interpretación*

La interpretación de los resultados requiere no solo gran experiencia en la técnica, sino también un conocimiento en profundidad del patrón de tinción de cada ac, de las diferentes células (normales y patológicas) que este puede marcar, de su especificidad y de la influencia de la fijación y la recuperación antigénica sobre el epítipo (49).

### *3.5 Indicadores críticos de coloración*

Recientemente un Comité Internacional Especial de Expertos Ad Hoc ha desarrollado el concepto de iCAPCs (Immunohistochemistry Critical Assay Performance Controls). Los iCAPCs son en esencia los tejidos que se usan de control positivo, que han sido bien caracterizados de acuerdo con los criterios acordados y que demuestran niveles predecibles y patrones de expresión y localización celular para proteínas específicas en condiciones definidas.

Se ha propuesto que iCAPCs sea el componente clave de selección de controles para el desarrollo de controles destinados al monitoreo diario de tejidos (57). Algunos ejemplos de lo anteriormente expuesto lo podemos observar en la siguiente tabla:

**TABLA 3.** *Controles tisulares de alta, baja y no expresión (NordiQC) (57).*

<b>Antígeno</b>	<b>Alto expresión</b>	<b>Baja expresión</b>	<b>No expresión</b>
Pan-CK	Apéndice	Hígado	Amígdala
CK-bajo peso	Apéndice	Hígado	Amígdala
CK-alto peso	Amígdala	Páncreas	Hígado
CK7	Hígado	Páncreas	Amígdala
CK20	Apéndice	Apéndice	Amígdala
CD3	Amígdala	Apéndice	Amígdala
CD20	Amígdala	Apéndice	Apéndice
CD31	Amígdala	Hígado	Apéndice
Desmina	Apéndice	Amígdala	Apéndice
Asma	Apéndice	Hígado	Apéndice
Sinaptofisina	Apéndice	Apéndice	Amígdala
Cromogranina a	Apéndice	Apéndice	Amígdala
TTF1	Tiroides	Pulmón	Amígdala
CDX2	Apéndice	Páncreas	Amígdala
S100	Apéndice	Amígdala	Apéndice
KI67	Amígdala	Amígdala	Amígdala

Cabe destacar que la calibración de la técnica IHQ, permite evaluar la robustez y el impacto de las condiciones preanalíticas e identificar el mejor protocolo para cada ac (clon, título, condiciones de recuperación ag, etc.) (57).

Cada vez que se incorpora un nuevo ac o se realiza un cambio de clon de un ac ya conocido se debe optimizar el protocolo de manera de obtener la señal más alta con el menor fondo (57).

El proceso de calibración u optimización debe realizarse en tejido procesado de la misma manera que el material diagnóstico, siendo los factores de procesamiento a incluir; fijador (es) utilizado, rango de tiempo en la fijación, métodos de descalcificación (si es relevante) y las condiciones de deshidratación usadas en el laboratorio (57).

Dado que, de rutina, el material puede experimentar una enorme gama de tiempos de fijación es esencial que tejidos fijados en diferentes tiempos estén incluidos en el proceso de optimización de la técnica, con el fin de evaluar el impacto del tiempo de fijación (57).

Para el proceso de optimización de la técnica, es muy valioso realizar las pruebas en microarrays de tejidos (TMA) compuestos de punch de diferentes tejidos normales, el uso del TMA permitirá evaluar la robustez (influencia de la fijación) e identificar el protocolo que proporciona el mejor resultado técnico para el ac en cuestión (57).

## **ANEXO 4. PROTOCOLO DE CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CALIDAD**

### **1.1. Preparación de los tejidos para isquemia fría**

- 1.1.1. Extraer 6 trozos de 5 x 5 mm de tejido mamario fresco.
- 1.1.2. Retrasar la fijación de cada muestra durante los tiempos aquí indicados: 0 horas\*, 2 horas, 3 horas, 7 horas, 24 horas y 28 horas. Mantener las muestras en agua destilada, a temperatura ambiente.

\*Fijación en formalina al 10% inmediata.

- 1.1.3. Fijar en formalina al 10% por 8 horas.
- 1.1.4. Paso por OH 70° por 12 horas aproximadamente.
- 1.1.5. Dos pasos por OH 95° de 30 min cada uno.
- 1.1.6. Tres pasos por OH 100° de 30 min cada uno.
- 1.1.7. Diafanización 3 pasos por xilol (agregar especificaciones de proporciones del xilol) por 1 hora cada uno.
- 1.1.8. Impregnación en 3 parafinas 1 hora cada una.
- 1.1.9. Incluir las muestras.

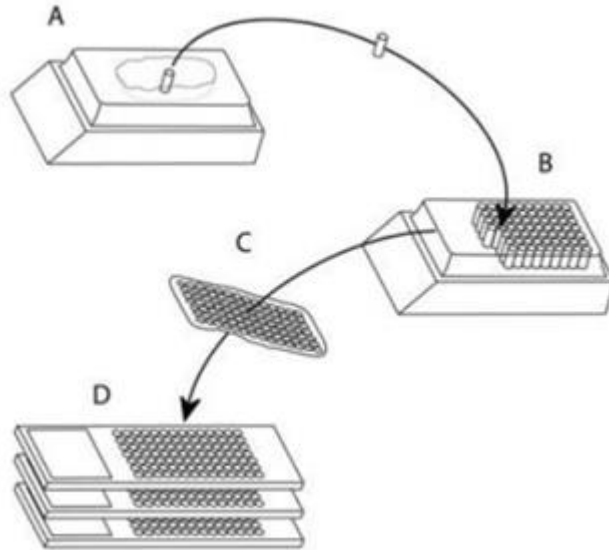
### **1.2. Preparación de los tejidos en distintos tiempos de fijación**

- 1.2.1. Extraer 6 trozos de 5 x 5 mm de tejido mamario fresco.
- 1.2.2. Fijar en formalina al 10% cada uno de acuerdo con los siguientes tiempos: 1 hora, 8 horas, 24 horas, 72 horas, 120 horas y 168 horas.
- 1.2.3. Paso por OH 70° por 12 horas aproximadamente.
- 1.2.4. Dos pasos por OH 95° por 30 min cada uno.
- 1.2.5. Tres pasos por OH 100° por 30 min cada uno.
- 1.2.6. Diafanización: tres pasos por xilol (lo mismo que arriba) por 1 hora cada uno.
- 1.2.7. Impregnación: tres parafinas durante 1 hora cada una.
- 1.2.8. Incluir las muestras.

## ANEXO 5. PROTOCOLO DE CONSTRUCCIÓN DE TISSUE MICROARRAYS

### 1.1. Selección de muestras para TMA

- 1.1.1. Recolectar tacos de parafina, con su respectiva lamina teñida con H-E.
- 1.1.2. Seleccionar un área representativa de la muestra de interés (selección realizada por un patólogo).
- 1.1.3. Realizar punch de 1,5mm en la zona seleccionada e insertarlo en la matriz.



- 1.1.4. Registrar el nuero de caso y su posición.
- 1.1.5. Incluir, marcar en el taco la dirección del molde

Al construir el TMA es importante realizar un registro de las posiciones de cada muestra contenida en él.

## **ANEXO 6. PROTOCOLO DE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA PARA CK Y VIM**

### **6.1. Obtención de cortes histológicos**

- 6.1.1. Realizar cortes de 4  $\mu\text{m}$  a los moldes de tissue array
- 6.1.2. Secar los cortes durante 1 día

### **6.2. Inmunohistoquímica**

- 6.2.1. Desparafinar y recuperar antígenos con pt link Dako a 43°C durante 1hr y 30 min.
- 6.2.2. Lavar en wash buffer diluido al 5% en agua destilada
- 6.2.3. Realizar bloqueo enzimático con 60  $\mu\text{l}$  de bloqueador por 10 minutos
- 6.2.4. Lavar en wash buffer
- 6.2.5. Aplicar 60  $\mu\text{l}$  de anticuerpo primario CK y VIM a cada corte por 20 minutos en cámara húmeda
- 6.2.6. Lavar con wash buffer
- 6.2.7. Aplicar anticuerpo secundario durante 20 minutos
- 6.2.8. Lavar con wash buffer
- 6.2.9. Aplicar 2ml de cromógeno DAB, cubriendo toda la muestra, durante 5 minutos
- 6.2.10. Lavar con wash buffer y agua destilada
- 6.2.11. Realizar tinción de contraste con hematoxilina de Harris por 30-45 segundos
- 6.2.12. Deshidratar y montar.

## **ANEXO 7: IMAGEN DIGITAL**

### **7.1 Definición de imagen digital**

El uso de la microscopia como herramienta de observación ha permitido ampliar los horizontes de la medicina y la investigación de manera considerable, de la mano de la experiencia adquirida de los profesionales microscopistas mediante la observación continua de un amplio de un número de eventos. Sin embargo, a medida que la investigación se torna más especializada y la medicina de precisión, construida sobre los procedimientos de calidad certificada, se instaure como nuevo objetivo del sistema de salud en el mundo, es de suma importancia disminuir en la mayor proporción posible la incertidumbre asociada al proceso de observación y conclusión en base a la evidencia. La evidencia empírica es el factor clave en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de los pacientes y el deber del profesional de salud asociado es comprometerse con brindar la mejor calidad de servicio bajo las condiciones actuales, teniendo como máxima el acercarse lo más posible a la realidad, dando la menor cabida a la interpretación (77).

Para cumplir con este objetivo, como profesional investigador y de la salud, el tecnólogo médico aporta al proceso científico desde dos aristas que constituyen los pilares fundamentales de la medicina de precisión: innovación tecnológica e integración básico-clínica. De esta manera, el uso de las herramientas más eficientes de la ciencia básica en pro de la mejora continua y sustentable del diagnóstico y seguimiento clínica es fundamental, y para el caso del diagnóstico en patología, las habilidades digitales en diseño experimental y análisis de imágenes microscópicas con sus datos asociados son una de las formas más directas de intervención junto a la implementación de la biología molecular, los procesos de automatización de bajo costo y los protocolos formales de acreditación bajo las normas ISO (de calidad y gestión de calidad) actuales en los que se incluye el concepto de interoperatividad. La patología y la microscopía en salud por definición caminan de la mano, y para el científico del siglo XXI microscopía es sinónimo de exactitud analítica (77).

Actualmente con los procesos de digitalización, la fotografía, el cine, la televisión, el diseño gráfico e incluso el diseño industrial produce miles de imágenes digitales, que son almacenadas en algún soporte físico, enviadas por un medio de transmisión electrónico, presentadas en una pantalla o impresas en papel en algún dispositivo. Esto también ha alcanzado

el área de la microscopía, en donde, es posible capturar imágenes de lo que se está observando para luego poder observarlas con mayor detalle y sin complicaciones en una pantalla (78).

Lo primero que debemos conocer es, si se está trabajando con una imagen vectorial o imagen bitmap. Cada uno de estos tipos de imagen se producen y editan con programas diferentes y tienen aplicaciones distintas. Conviene comprender en qué se diferencian y cuáles son las ventajas e inconvenientes de cada una (78).

### **7.1.1 Imágenes vectoriales**

Las imágenes vectoriales están compuestas por entidades geométricas simples: segmentos y polígonos básicamente. Cada una de estas entidades está definida matemáticamente por un grupo de parámetros (coordenadas iniciales y final, grosor y color del entorno, color del relleno, etc.). Por compleja que pueda parecer una imagen, puede reducirse a una colección de entidades geométricas simples. Al estar compuestas por entidades geométricas simples, las imágenes vectoriales se pueden cambiar de escala, para amplificarlas o reducirlas, sin que la imagen pierda calidad (78).

### **7.1.2 Imágenes bitmap**

Las imágenes de mapa bits están construidas mediante una gran cantidad de píxel. Cada uno de estos pixeles está lleno de un color uniforme, pero la sensación obtenida es el resultado de integrar visualmente en la retina, las variaciones de color y luminosidad entre pixeles vecinos. Las imágenes de mapa bits, también llamadas bitmap, son la alternativa ideal para reproducir objetos sutilmente iluminados y escenas con gran variación tonal. Las imágenes bitmap no permiten el cambio de escala (78).

## **7.2 Propiedades de una imagen digital**

### **7.2.1 Resolución de una imagen**

La resolución de una imagen es la cantidad de píxeles que la componen. Suele medirse en píxeles por pulgada (ppi) o píxeles por centímetro (pcm). Cuanto mayor es la resolución de una imagen, más calidad tendrá su presentación, pero desgraciadamente, más espacio ocupará en el disco el archivo gráfico que la contiene (78).

### **7.2.2 Dimensiones de la imagen**

Las dimensiones de una imagen se expresan como es habitual en centímetros (cm) o milímetros (mm). Por ejemplo, una imagen de 10 x 15 cm medirá 10 cm de ancho y 15 cm de alto. Sin embargo, a veces, los programas expresan el tamaño de una imagen en píxeles. Para calcular el tamaño de una imagen en píxeles basta con multiplicar las dimensiones lineales, en centímetros, por ejemplo, por la resolución en píxeles por centímetro (78).

### **7.2.3 Profundidad de color**

Cada uno de los píxeles de una imagen bitmap está coloreado con un color homogéneo. El archivo que contiene los datos de la imagen debe contener la información del color de cada uno de los píxeles. Profundidad de color es el número de bits utilizados para describir el color de cada píxel de la imagen. Es obvio que, cuanto mayor sea la profundidad de color de una imagen, más colores tendrá la paleta disponible y, por tanto, la representación de la realidad podrá hacerse con más matices, con colores más sutiles (78).

### **7.2.4 El modo de color**

El ojo humano percibe los colores según la longitud de onda de la luz que le llega. La luz blanca contiene todo el espectro de color, mientras que la ausencia de luz es percibida por nuestro ojo como el color negro. Los programas de edición de imágenes utilizan varios modos de color para definir y clasificar todos los colores posibles, la mayoría de los programas utilizan uno

de estos tres modos de color: HSB (tono, saturación y brillo), RGB (rojo, verde y azul) y CMYK (cyan, magenta, amarillo y negro) (78).

### **7.2.5 La saturación**

La saturación es la propiedad que describe la viveza del color. Un color muy saturado es un color con una tonalidad intensa y pura. Por el contrario, un color poco saturado, es el que tiene una tonalidad apagada. La saturación de un color se expresa en porcentaje y oscila entre 100%, que corresponde a los colores puros, saturados al máximo y el 0% que corresponde a los colores apagados en los que ya no se distingue la tonalidad (78).

### **7.2.6 La luminosidad**

La luminosidad describe la cantidad de luz reflejada. Se trata, por tanto, de una magnitud relativa, que se expresa también en forma de porcentaje, desde el 100% (luminosidad total), hasta el 0% (oscuridad total) (78).