



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

EFICACIA DE LA UTILIZACIÓN DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PARA EL  
DIAGNÓSTICO Y/O TIPIFICACIÓN DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS SOBRE  
FROTICES CITOLÓGICOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
NEOPLÁSICAS EN LOS AÑOS 2017 – 2018

**Línea de investigación:**

**Biología Celular y Molecular**

Trabajo Académico para obtener el Título de Segunda Especialidad en  
Genética y Biología Molecular

**Autora:**

Huamanciza Ostos, Yolanda Eugenia

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 000-0002-4075-1736

**Jurado:**

Saez Flores, Gloria María

Rodrigo Rojas, María Elena

Bohorquez Meza, Isabel Doris

**Lima - Perú**

**2022**



**Referencia:**

Huamanciza, O. (2022). *Eficacia de la utilización de la inmunocitoquímica para el diagnóstico y/o tipificación de enfermedades neoplásicas sobre frotices citológicas en el instituto nacional de enfermedades neoplásicas en los años 2017-2018* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5941>



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**EFICACIA DE LA UTILIZACIÓN DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PARA EL  
DIAGNÓSTICO Y/O TIPIFICACIÓN DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS  
SOBRE FROTICES CITOLÓGICOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE  
ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS EN LOS AÑOS 2017 – 2018**

Línea de Investigación:  
Biología Celular y Molecular

Trabajo Académico para obtener el Título de  
Segunda Especialidad en Genética y Biología Molecular

**Autora:**

Huamanciza Ostos, Yolanda Eugenia.

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés  
ORCID: 000-0002-4075-1736.

**Jurado:**

Saez Flores, Gloria María  
Rodrigo Rojas, María Elena  
Bohorquez Meza, Isabel Doris

**Lima – Perú**

**2022**

### **Dedicatoria**

A mi amada hija Alexandra, fuente de toda mi inspiración.

A mi amado esposo Luis, mi compañero desde la universidad y ahora de toda la vida.

A mi amada madre Yolanda, mi ejemplo de vida.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	4
ABSTRACT.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Descripción del problema.....	7
1.2. Antecedentes .....	8
1.3. Objetivos .....	11
1.4. Justificación.....	12
1.5. Impactos esperados del proyecto.....	12
II. METODOLOGÍA .....	14
2.1. Género y edad del paciente en estudio .....	14
2.2. Tipo de material citológico .....	16
2.3. Preparación citológica .....	18
2.4. Inmunocitoquímica.....	20
2.5. Cuantificación del resultado inmunohistoquímico.....	23
III. RESULTADOS.....	24
IV. CONCLUSIONES .....	26
V. RECOMENDACIONES .....	27
VI. REFERENCIAS .....	28
VII. ANEXOS.....	31

## RESUMEN

**Introducción:** La detección temprana de las distintas neoplasias es uno de los objetivos principales de la Unidad Funcional de Citopatología del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Se realiza mediante el análisis microscópico de los frotices citológicos de pacientes provenientes de Lima y diferentes regiones del país que acuden a nuestro Instituto para realizar el posterior diagnóstico y tratamiento del paciente. Una de las limitaciones es la escasez del material citológico colectado a través de las diferentes técnicas de obtención celular: biopsias por aspiración con aguja fina (BAAF), técnica de Papanicolaou, extracción de líquidos corporales, expectoraciones, etc. La técnica de inmunocitoquímica (ICQ) es de gran especificidad y alta sensibilidad para la detección de células neoplásicas mediante la interacción antígeno-anticuerpo, permitiendo identificar eficazmente moléculas en ínfimas cantidades en las células. **Objetivo:** Evaluar la eficacia del uso de técnicas como la ICQ para casos de frotices citológicos con sospecha de malignidad y sin otro tipo de material citológico que aporte elementos para un diagnóstico preciso. **Métodos:** Revisión de la base de datos del Laboratorio de Citología con resultados del sistema de visualización EnVision™ FLEX mini Kit, High pH (Dako Omnis), indicado para realizar ICQ con los instrumentos Dako Omnis. **Conclusión:** De los 304 casos con sospecha de malignidad, se pudo establecer la positividad en 244 (80.26%), la negatividad en 30 casos (9.87%) y 30 casos (9.87%) quedaron como sospechosos de malignidad.

*Palabras clave:* Inmunocitoquímica, biopsia por aspiración, citología, frotis citológico y anticuerpos.

## ABSTRACT

**Introduction:** The early detection of different neoplasms is one of the main objectives of the Cytopathology Functional Unit of the National Institute of Neoplastic Diseases. It is performed by microscopic analysis of the cytological smears of patients from Lima and different regions of the country who come to our Institute to carry out the subsequent diagnosis and treatment of the patient. One of the limitations is the scarcity of cytological material collected through the different cell collection techniques: fine-needle aspiration biopsies (FNAB), Pap smear technique, extraction of body fluids, expectorations, etc. The immunocytochemical technique (ICQ) is highly specific and highly sensitive for the detection of neoplastic cells through antigen-antibody interaction, allowing efficient identification of molecules in minute quantities in cells. **Objective:** To evaluate the efficacy of the use of techniques such as ICQ for cases of cytological smears with suspicion of malignancy and without other types of cytological material that provide elements for an accurate diagnosis. **Methods:** Review of the Cytology Laboratory database with results from the EnVision™ FLEX mini Kit, High pH (Dako Omnis) visualization system, indicated to perform ICQ with Dako Omnis instruments. **Conclusion:** Of the 304 cases with suspected malignancy, positivity could be established in 244 (80.26%), negativity in 30 cases (9.87%) and 30 cases (9.87%) were suspected of malignancy.

*Keywords:* Immunocytochemistry, aspiration biopsy, cytology, cytological smear and antibodies.

## I. INTRODUCCIÓN

En la Unidad Funcional de Citopatología del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas - INEN se realiza el diagnóstico de diversas enfermedades neoplásicas a partir de material citológico procedente de diferentes órganos del cuerpo.

Se utilizan técnicas variadas para su obtención como biopsias por aspiración con aguja fina (BAAF), técnica de Papanicolaou, extracción de líquidos corporales, expectoraciones, etc. Estas metodologías permiten obtener un diagnóstico rápido, efectivo y de costo beneficio para pacientes de bajos recursos, asimismo en el caso de las BAAF se puede obtener material citológico de órganos con difícil acceso para una biopsia convencional. (Koss,1988, Orell et al,1999).

El tipo de material citológico que se deriva de estas técnicas es el frotis celular, en el cual se coloca el material citológico mediante frotis sobre una lámina de vidrio (porta objeto), se fija, se colorea, se prepara para montaje y se observa al microscopio óptico. También se puede obtener el bloque celular y/o coágulo, que son sometidos al proceso de fijación, parafinización, corte histológico, se coloca en la lámina porta objetos, coloración, deshidratación, se procede al montaje para su posterior lectura al microscopio óptico. Alwahaibi menciona que el frotis citológico y el bloque celular (CB) se utilizan de forma rutinaria para diagnosticar muestras no ginecológicas. Sin embargo, existe escasa información en la literatura para comparar el frotis citológico y CB con las correspondientes biopsias de tejido. Este estudio tiene como objetivo evaluar la precisión del frotis citológico y CB en el diagnóstico de tumores malignos en muestras no ginecológicas. (Alwahaibi et al, 2018). En estos casos en los que la coloración citológica no vislumbra un diagnóstico preciso, es de gran importancia la realización de técnicas de inmunocitoquímica (ICQ) para conseguir este objetivo. La ICQ es una técnica de gran especificidad y alta afinidad y que permite identificar



moléculas en ínfimas cantidades en las células, mediante el uso de anticuerpos, para descartar si existe o no neoplasia (Brahmi et al, 2001), así como para tipificarla, beneficiando el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad (Dalquen et al,1993). De los diversos métodos de prueba de biomarcadores predictivos, la inmunocitoquímica (ICQ) es común, rentable, y fácilmente disponible en la mayoría de los laboratorios, tiene un tiempo de respuesta rápido, se puede realizar en relativamente todas las células tumorales y plantea la menor cantidad de técnica desafíos en comparación con otros métodos moleculares y de citogenética (Roy-Chowdhuri, 2020).

Aunque aproximadamente el 51% y el 75% de los laboratorios de citología en los Estados Unidos y Europa, respectivamente, informó el uso de preparaciones sin CB para el diagnóstico de ICQ en encuestas de 6 a 7 años atrás, su uso para ICQ probablemente ha disminuido más recientemente, particularmente en Estados Unidos, donde los laboratorios comerciales no aceptan frotis para ICQ (Jain et al, 2019).

Mandal et al. en 2013, trabajaron en 78 casos confirmados por histopatología e inmunohistoquímica. De 36 casos citológicos que hubo, 30 casos se correlacionaron histológicamente. Los seis casos incorrectos se debieron a material inadecuado en los frotis (tres casos) o a la tinción falsa positiva (tres casos).

En el INEN esta técnica de ICQ es utilizada de manera rutinaria sobre muestras de tejidos y sobre bloques y/o coágulos, así como en muestras citológicas cuando el caso lo amerita.

### **1.1. Descripción del problema**

El uso de técnicas inmunológicas en citología se expandió rápidamente durante los últimos 20 años. Situación similar ha llevado a histopatología a un aumento en la precisión diagnóstica. Además, las características de las células tumorales que determinan la sensibilidad a las terapias

dirigidas también se pueden definir en el material citológico (Skoog y Tani, 2011), así se han evaluado los casos analizados en el año 2017 y 2018, en el servicio de Citopatología del INEN, sobre frotices citológicos en los que se ha realizado la ICQ, para poder dar respuesta a lo siguiente:

¿Es eficaz la técnica de inmunocitoquímica para el diagnóstico y tipificación de las enfermedades neoplásicas realizados sobre frotices citológicos con sospecha de neoplasia, no contando con bloque celular y/o coágulo como respaldo?

## **1.2. Antecedentes**

El cáncer constituye un problema de salud pública a nivel mundial y en nuestro país, por su alta mortalidad y por la discapacidad que produce (MINSA, Programa presupuestal 2017), es que los profesionales de la salud tienen como objetivo la detección temprana de las neoplasias, su diagnóstico definitivo, tratamiento y pronóstico.

Muchos de estos diagnósticos dependen del estudio citológico que se realiza sobre las células o grupos celulares que se encuentran en las muestras tomadas. Los alcances de estos estudios datan del siglo XIX y mitad del XX con la citología exfoliativa (Papanicolaou, 1960) y la biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF) que tiene mayor popularidad por los años 60 en adelante (Koss, 1988), con la gran ventaja de ser rápida, eficaz y de atención ambulatoria permitiendo un mayor costo beneficio para el paciente, gracias a que puede llegar prácticamente a cualquier lugar del cuerpo, complementada con guía ecográfica, tomografía axial computarizada (TAC), etc., obteniéndose el diagnóstico con certeza y evitando muchas veces realizar una biopsia quirúrgica (Risberg et al. 1999).

Así, la interpretación citológica se basa en la identificación de la disposición y tamaño de las células y/o grupos celulares, además de la citomorfología del núcleo y el citoplasma; teniendo una valoración de exactitud de entre 80 a 100% según el órgano estudiado y la

experiencia del citopatólogo (Bibbo, 1996). Sin embargo, muchas veces se tiene que hacer uso de técnicas complementarias para los casos de diagnóstico diferenciales o en casos de sospecha de enfermedad por métodos convencionales.

Un obstáculo importante en la estandarización y el despliegue masivo de ICQ es la gran variabilidad en los tipos de preparaciones citológicas encontradas en laboratorios alrededor el mundo. Los laboratorios de citopatología pueden recibir portaobjetos previamente preparados en forma de frotices secados al aire o fijas, frotis preparados por el médico ordenante. Aspectos singulares de los frotices citológicos y los tipos de preparación variables son claramente factores limitantes para el desempeño de ICQ confiable y consistente. Las distintas preparaciones citológicas también restringen el uso de anticuerpos (Dupré, 2012)

En nuestro país, el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas es el ente rector en materia oncológica, atendiendo a pacientes de diferentes partes del territorio, tanto para despistaje como con diagnóstico oncológico previo. En la Unidad Funcional de Citopatología del INEN, en el año 2017 se atendieron 30,382 casos de pacientes. (Tabla 1 y Gráfico 1).

De estos 30,382 casos, 915 casos (18.8%) fueron sometidos a la técnica de ICQ a los frotices y/o IHQ a los bloques celulares y/o coágulos para ayuda diagnóstica (Tabla 2).

En el año 2018 se atendieron 22,299 casos de pacientes. (Tabla 1 y Figura 1). Del mismo modo de los 22,299 casos, a 909 casos se les realizó ICQ, a los frotices y/o IHQ a los bloques celulares y/o coágulos (Tabla 2).

Lamentablemente en estos materiales citológicos obtenidas por los diferentes métodos solo se pudieron contar con los frotices citológicos debido la escasez de la muestra o porque los coágulos y/o bloques celulares no fueron contributorios (hematíes, necrosis etc.).

Por anteriores reportes se ha podido evidenciar que la aplicación de la ICQ sobre frotices citológicos ha dado buenos resultados (Arias-Stella et al, 2003).

**Tabla 1**

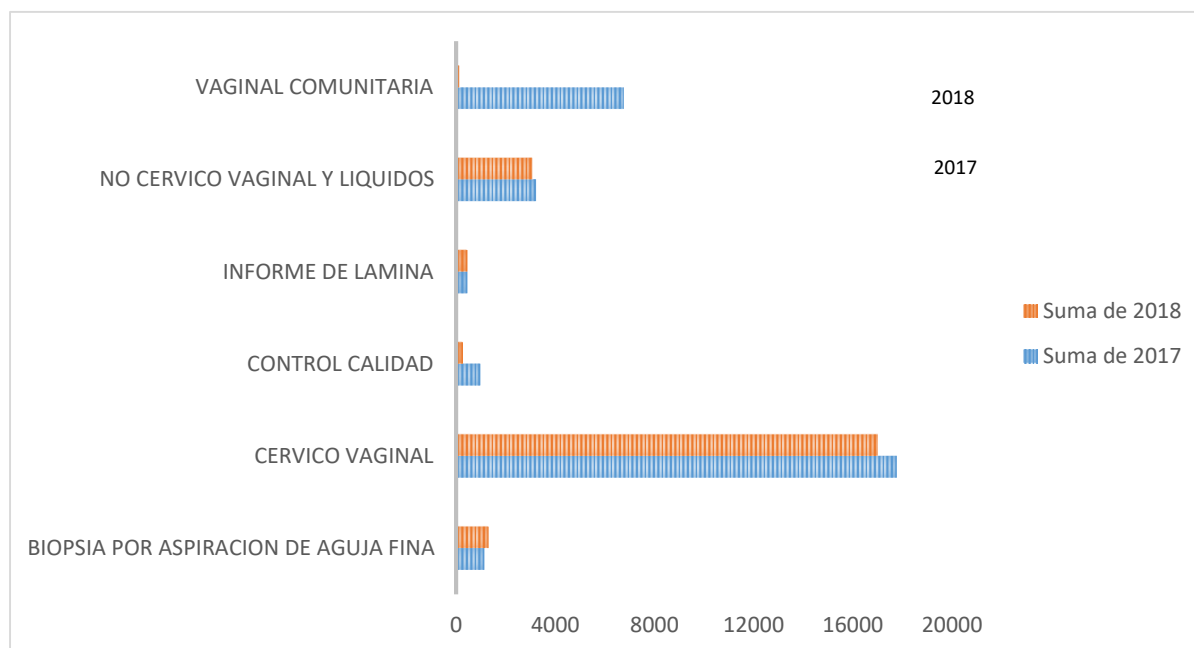
*Número de casos recibidos en la Unidad Funcional de Citopatología – INEN en el período 2017-2018*

<b>Tipo de material citológico</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2017 - 2018</b>
<b>No cérvico vaginal y líquidos</b>	3242	3090	6332
<b>Biopsia por aspiración de aguja fina</b>	1138	1318	2456
<b>Informe de lamina</b>	463	457	920
<b>Cérvico vaginal</b>	17778	17008	34786
<b>Vaginal comunitaria</b>	6776	144	6920
<b>Control calidad cervix</b>	985	282	1267
<b>Total</b>	<b>30382</b>	<b>22299</b>	<b>52681</b>

*Nota.* Tomado de Unidad Funcional de Citopatología del INEN

**Figura 1**

*Casos recibidos en la Unidad Funcional de Citopatología – INEN en el período 2017-2018*



**Tabla 2**

*Número de casos procesadas por ICQ en la Unidad Funcional de Citopatología – INEN en el período 2017-2018*

<b>Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2017 - 2018</b>
<b>Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica</b>	693	827	1520
<b>Inmunocitoquímica</b>	222	82	304
<b>IHQ Total</b>	915	909	1824

*Nota.* Tomado de: Unidad Funcional de Citopatología del INEN

En nuestro laboratorio, en el año 2017 de los 915 casos para Inmunohistoquímica se les realizó solo ICQ a 222 casos por qué no se contó con bloque celular, ni coágulo. Por la misma razón, en el año 2018 de 909 casos se realizó únicamente ICQ a 82 casos (Tabla 2). En estos casos específicos hemos procedido a evaluar la eficacia de esta técnica de ICQ para obtener el diagnóstico preciso en citología en el INEN.

### **1.3. Objetivos**

#### ***1.3.1. Objetivo general***

Evaluar la eficacia de la utilización de la inmunocitoquímica sobre frotices citológicos ya teñidos previamente con sospecha de malignidad, para descartar neoplasias.

#### ***1.3.2. Objetivos específicos***

Aplicar técnicas de detección altamente específicas sobre frotices citológicos escasos para poder obtener el diagnóstico preciso de la neoplasia en pacientes del INEN.

Determinar la estirpe celular mediante la tipificación de las células a través de la inmunocitoquímica en pacientes del INEN.

## **1.4. Justificación**

La técnica de ICQ permite aprovechar los frotices procesados para citología convencional, a pesar de la escasa cantidad de células, para obtener un diagnóstico preciso de la enfermedad a pesar de no contar con bloque celular y/o coágulo. Asimismo, hallar el diagnóstico y la posible tipificación de la enfermedad neoplásica a través de una técnica tan específica y sensible como la inmunocitoquímica en los frotices citológicos utilizando paneles específicos de anticuerpos.

El empleo de ICQ permite realizar el diagnóstico diferencial de la muestra en casos de células atípicas con sospecha de neoplasia, por ejemplo: células mesoteliales reactivas versus neoplasia maligna, neoplasias indiferenciadas, linfomas versus carcinoma de células pequeñas, etc., además, la obtención del frotis citológico y el procesamiento son rápidos y eficaces comparado con un procesamiento histológico con parafinización. De esta manera, su realización es de mayor costo-beneficio para el paciente y la institución, evitando en muchos casos realizar procedimientos invasivos para la obtención de un diagnóstico preciso. Finalmente se debe resaltar su importancia en la búsqueda de este diagnóstico preciso y confiable para el paciente, cuya utilidad clínica radica en un tratamiento adecuado y pronóstico claro del transcurso de la enfermedad.

## **1.5. Impactos esperados del proyecto**

### ***1.5.1. Impacto económico***

Es la primera toma de material citológico que se realiza al paciente, que servirá para realizar los métodos citológicos y moleculares que permitan la obtención del diagnóstico adecuado de la enfermedad.

### ***1.5.2. Impacto metodológico***

El frotis citológico convencional teñido con la técnica de coloración Hematoxilina Eosina o la técnica de coloración Papanicolaou es decolorado y sometido a la técnica de inmunocitoquímica, que permite identificar el antígeno específico para la tipificación de la neoplasia, es decir su estirpe celular.

### ***1.5.3. Impacto social***

Las técnicas citológicas se realizan masivamente, al no ser invasivas no requieran la implementación de equipos o ambientes diferentes reduciendo el costo en comparación con técnicas histológicas, lo que permite que una gran cantidad de pacientes de bajos recursos puedan acceder a diagnósticos precisos en menor tiempo y ser tratados adecuadamente.

## II. METODOLOGÍA

### 2.1. Género y edad del paciente en estudio

Fueron 217 (71.4%) pacientes mujeres y 87 (28.6%) pacientes hombres (Tabla 3 y Figura 2), con edades entre 3 y 86 años en el 2017 y entre 2 a 99 años en el 2018 (Tabla 4 y Figura 3).

**Tabla 3**

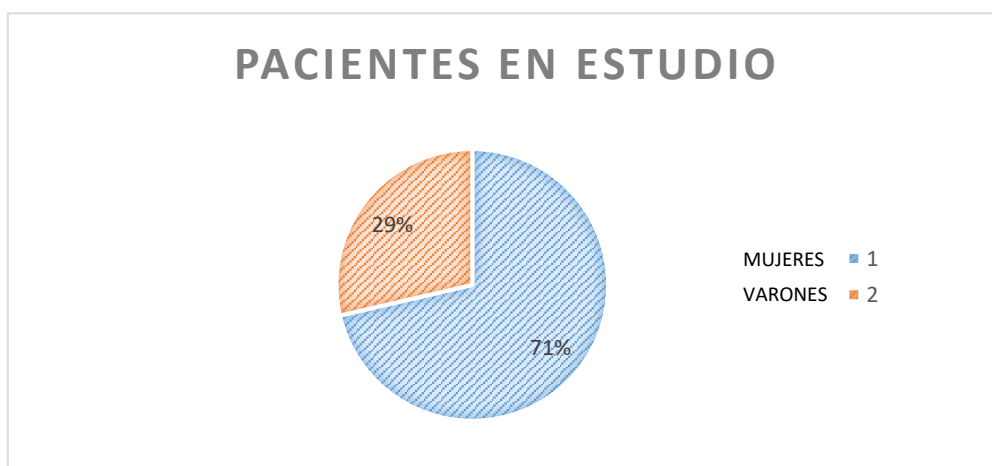
*Género de los pacientes en estudio*

Pacientes en estudio	2017	2018	2017 - 2018
Mujeres	156	61	217
Hombres	66	21	87
<b>Total</b>	<b>222</b>	<b>82</b>	<b>304</b>

*Nota.* Tomado de: Unidad Funcional de Citopatología del INEN

**Figura 2**

*Porcentaje según género de los pacientes en estudio*



*Nota.* Tomado de: Unidad Funcional de Citopatología del INEN.



Se analizó la data elaborada en la Unidad Funcional de Citopatología del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de los años 2017 – 2018 de pacientes ingresados al Departamento de Patología, Laboratorio de Citopatología.

**Tabla 4**

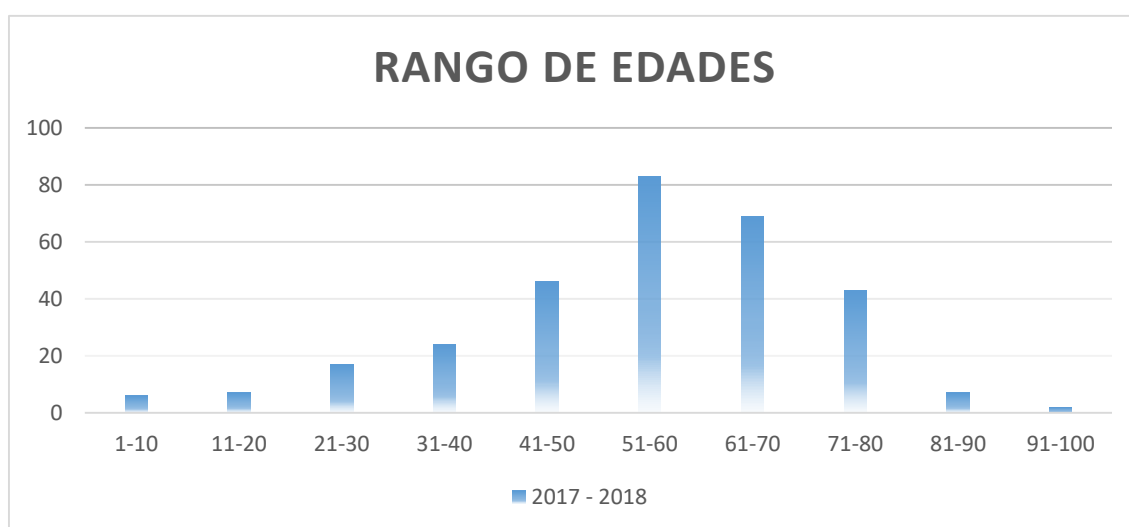
*Rango de edades de los pacientes en estudio*

<b>Edades (Años)</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2017 - 2018</b>
<b>1-10</b>	4	2	6
<b>11-20</b>	6	1	7
<b>21-30</b>	12	5	17
<b>31-40</b>	17	7	24
<b>41-50</b>	33	13	46
<b>51-60</b>	56	27	83
<b>61-70</b>	51	18	69
<b>71-80</b>	38	5	43
<b>81-90</b>	5	2	7
<b>91-100</b>	0	2	2
<b>Total</b>	<b>222</b>	<b>82</b>	<b>304</b>

*Nota.* Tomado de: Unidad Funcional de Citopatología del INEN.

**Figura 3**

*Rango de edades de los pacientes en estudio*



*Nota.* Imagen tomada de Unidad Funcional de Citopatología del INEN.

## 2.2. Tipo de material citológico

El material citológico que llegó a la Unidad Funcional de Citopatología durante los años 2017 y 2018 fueron muy variadas y se muestran en la Tabla 1. Se realizó inmunohistoquímica e inmunocitoquímica a 1824 casos (Tabla 2) de las cuales 304 son el objetivo de nuestro trabajo.

Estos 304 casos fueron provenientes de pacientes que acudieron a los consultorios de Cabeza y Cuello, Senos Huesos y Tumores Mixtos, Radiología, Ginecología, Abdomen del INEN, entre otros, y se les tomaron frotices citológicos mediante BAAF o métodos radiológicos (Tabla 5).

**Tabla 5**

*Tipos de citología en estudio*

<b>Citología en estudio</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2017 - 2018</b>
<b>Citología no cérvico-vaginal y líquidos</b>	69	12	81
<b>BAAF</b>	137	70	207
<b>Informe de lámina (IL)</b>	15	0	15
<b>Cervix (IL)</b>	1	0	1
<b>Total</b>	<b>222</b>	<b>82</b>	<b>304</b>

*Nota.* Tomado de: Unidad Funcional de Citopatología del INEN

De distintas partes del cuerpo: ganglios cervicales, tiroides, hígado, pulmón, retroperitoneo, mediastino, parótida, axila, mama, páncreas, ovario, vesícula biliar, riñón, cérvix, bazo, colédoco, duodeno, etc., material citológico de líquidos corporales como líquidos peritoneales, ascíticos, pleurales, secreciones corporales como aspirados y cepillados bronquiales etc. e informes de láminas de casos realizados en otros nosocomios. (Tabla 6, Figura 4)

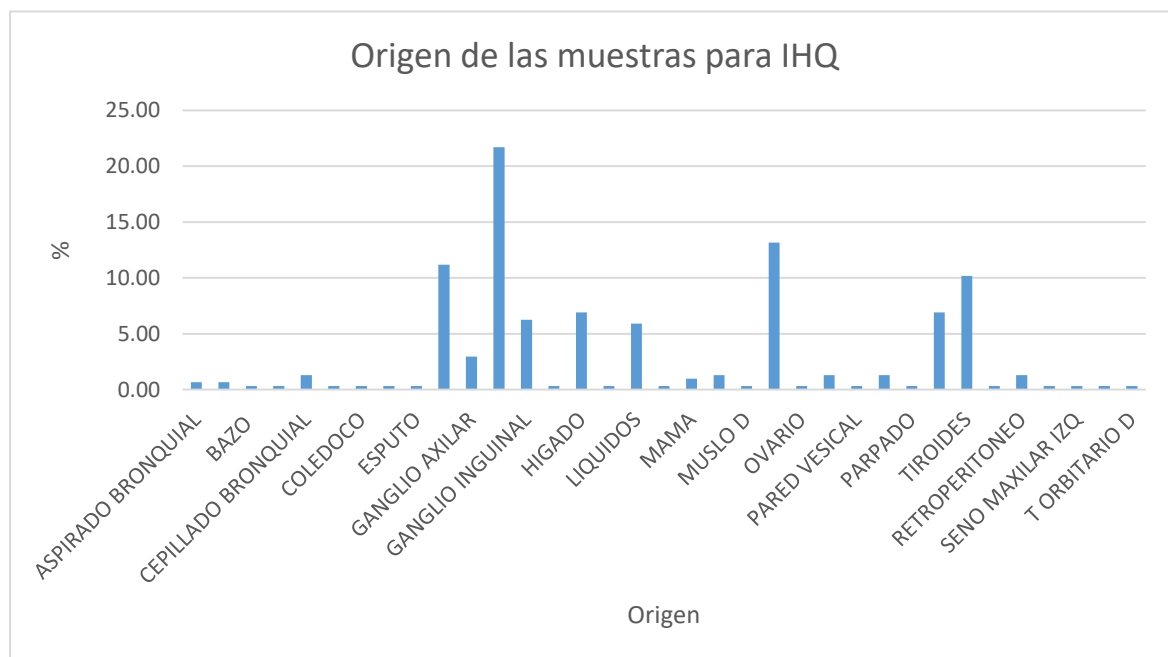
**Tabla 6***Porcentaje de los tipos de material citológico*

<b>Tipo de material citológico</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2017-2018</b>	<b>%</b>
<b>ASPIRADO BRONQUIAL</b>	2	0	2	0.66
<b>AXILA</b>	2	0	2	0.66
<b>BAZO</b>	1	0	1	0.33
<b>BRAZO</b>	0	1	1	0.33
<b>CEPILLADO BRONQUIAL</b>	4	0	4	1.32
<b>CERVIX</b>	1	0	1	0.33
<b>COLEDOCO</b>	1	0	1	0.33
<b>DUODENO</b>	1	0	1	0.33
<b>ESPUTO</b>	1	0	1	0.33
<b>GANGLIO</b>	23	11	34	11.18
<b>GANGLIO AXILAR</b>	6	3	9	2.96
<b>GANGLIO CERVICAL</b>	45	21	66	21.71
<b>GANGLIO INGUINAL</b>	13	6	19	6.25
<b>GLUTEO</b>	0	1	1	0.33
<b>HIGADO</b>	18	3	21	6.91
<b>LARINGE</b>	1	0	1	0.33
<b>LIQUIDOS</b>	13	5	18	5.92
<b>MALAR DER</b>	0	1	1	0.33
<b>MAMA</b>	3	0	3	0.99
<b>MEDIASTINO</b>	4	0	4	1.32
<b>MUSLO D</b>	0	1	1	0.33
<b>NODULOS</b>	33	7	40	13.16
<b>OVARIO</b>	1	0	1	0.33
<b>PANCREAS</b>	3	1	4	1.32
<b>PARED VESICAL</b>	1	0	1	0.33
<b>PAROTIDA</b>	3	1	4	1.32
<b>PARPADO</b>	0	1	1	0.33
<b>PULMON</b>	17	4	21	6.91
<b>TIROIDES</b>	19	12	31	10.20
<b>VESIC BILIAR</b>	1	0	1	0.33
<b>RETROPERITONEO</b>	4	0	4	1.32
<b>RIÑON IZQ</b>	1	0	1	0.33
<b>SENO MAXILAR IZQ</b>	0	1	1	0.33
<b>T CAV ORAL</b>	0	1	1	0.33
<b>T ORBITARIO D</b>	0	1	1	0.33
<b>Total</b>	<b>222</b>	<b>82</b>	<b>304</b>	<b>100.00</b>

*Nota.* Tomado de: Unidad Funcional de Citopatología del INEN

## Figura 4

*Origen del material citológico para inmunocitoquímica de estudio*

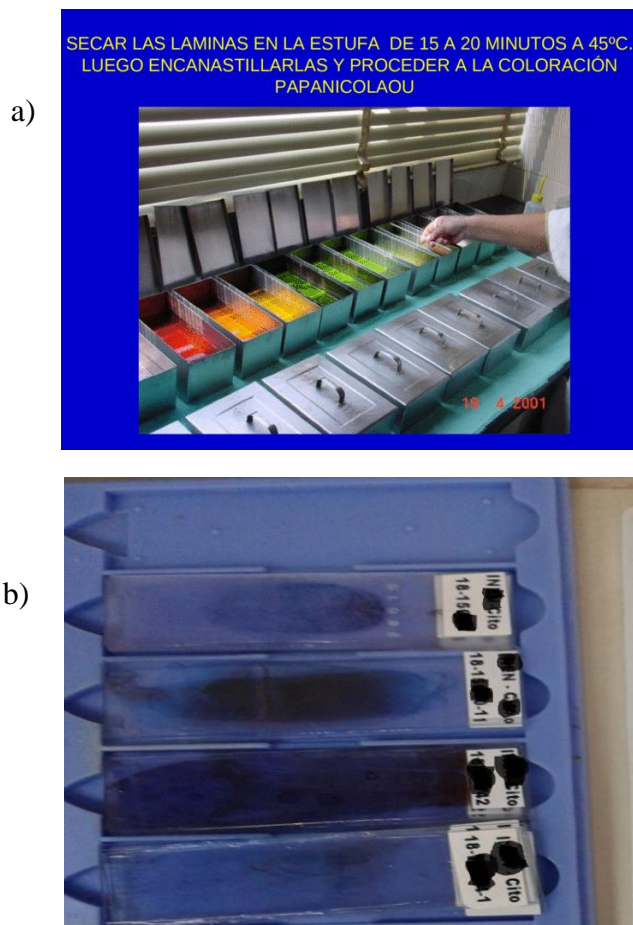


### 2.3. Preparación citológica

Todos los frotices celulares que fueron obtenidos de la toma de material citológico, se procesaron con tinción convencional (Figura 5 a y b) de Hematoxilina-Eosina (Anexo A) y/o Papanicolaou (Anexo B) y en algunas muestras salieron bloques celulares o coágulos, a los cuales se les realizó la parafinización para su posterior corte histológico (lamentablemente fueron insuficientes y/o necróticas).

## Figura 5

### *Tinción convencional*



*Nota.* Tomado de la Unidad Funcional de Citopatología del INEN

Estos procedimientos se llevaron a cabo en la Unidad Funcional de Citopatología, Departamento de Patología del INEN.

Los frotices celulares fueron revisados primeramente por los citólogos y las células sospechosas de malignidad fueron marcadas con plumón indeleble. Posteriormente fueron diagnosticadas por los citopatólogos como sospechosas de malignidad (Figura 6 a y b).

**Figura 6**

*Revisión microscópica y marcación de los frotices celulares en las láminas portaobjetos.*

a)



b)



*Nota.* Tomado de: Unidad Funcional de Citopatología del INEN

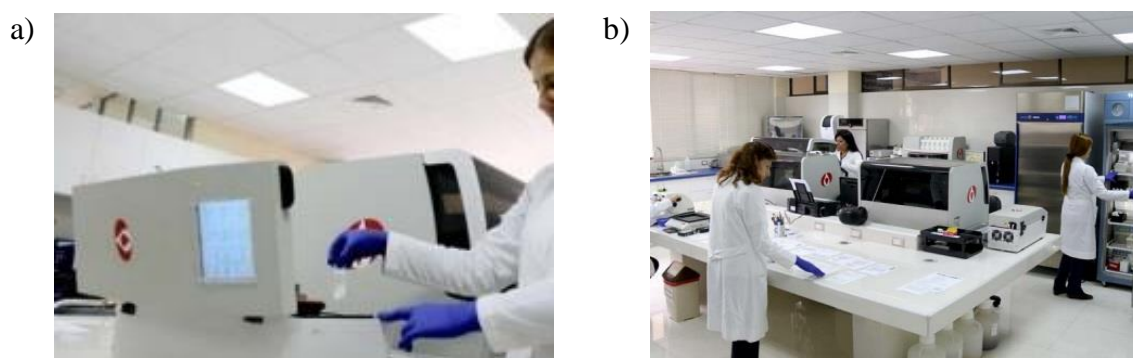
**2.4. Inmunocitoquímica**

Antes de realizar la inmunocitoquímica se procedió a marcar la lámina frotis con un lápiz punta diamante, las áreas en las que se encontraban las células sospechosas de neoplasia revisadas citológicamente, luego se decoloran las células mediante la técnica de retroprocesamiento citológico que consiste en retroceder los pasos de coloración desde el xilol hasta antes de la hematoxilina.

Para la inmunocitoquímica se utilizó el sistema de visualización EnVision™ FLEX mini Kit, High pH (Dako Omnis) que está indicado para su uso en inmunohistoquímica junto con los instrumentos Dako Omnis. Este sistema detecta anticuerpos primarios de ratón y conejo que hacen reacción con los antígenos y la reacción se visualiza mediante el EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen. (Folleto Dako P04120ES\_001\_GV800/2015.05 p. 3/12).

## Figura 7

### *Procesamiento inmunocitoquímico*



*Nota.* Tomado de: Departamento de Patología del INEN

Este sistema de visualización EnVision™ FLEX se utiliza con el sistema Dako Omnis (Fig. 7 a y b) porque el protocolo EnVision™ FLEX está programado previamente en el software de Dako Omnis en combinación con los anticuerpos primarios Dako.

Es un procedimiento automatizado de Dako Omnis donde el procesamiento al material citológico se inicia con la recuperación del epítipo inducida por calor (block cell y/o coágulos, frotices citológicos no amerita), seguido de la tinción inmunocitoquímica (Anexo C) y la contratinción posterior con hematoxilina en la lámina. Los pasos del protocolo para los procedimientos automatizados se realizan basados en la Guía del usuario avanzado y el Manual básico del usuario de Dako Omnis (Dako Folleto, 2015) (Anexo D). El procedimiento previo al tratamiento y el protocolo de tinción depende del anticuerpo. Los citopatólogos indican el panel de anticuerpos a procesar para cada caso.

Estos fueron los anticuerpos utilizados en Inmunocitoquímica en el INEN para los casos presentados en este trabajo (Tabla 7)

**Tabla 7**

*Patrones de tinción*

<b>ANTICUERPO</b>	<b>PATRON DE TINCION</b>	<b>BLANCO</b>
<b>CD45 (ACL)</b>	Membrana	Amígdala, cerebro, médula ósea
<b>ACTINA</b>	Citoplasma	Apéndice/Colon, Bazo, Lengua
<b>Alfa Feto Proteína</b>	Citoplasma	Hígado fetal, carcinoma embrionario
<b>CA125</b>	Membrana y citoplasma	Trompa de Falopio
<b>CALCITONINA</b>	Calcitonina	Tiroides
<b>CALRETININA</b>	Núcleo y Citoplasma	Apéndice/ colon
<b>CD10</b>	Membrana	Amígdala, hígado
<b>CD117</b>	Citoplasma	leucemia mielógena crónica
<b>CD138</b>	Membrana	Amígdala, apéndice/ colón
<b>CD15</b>	Membrana y citoplasma	Amígdala, hígado, ganglio linfático/ linfoma de Hodking
<b>CD1a</b>	Membrana y citoplasma	Amígdala, piel y timo
<b>CD20</b>	Membrana	Amígdala
<b>CD3</b>	Membrana y citoplasma	Amígdala
<b>CD30</b>	Membrana y citoplasma	Célula Reed Sternberg, linfomas
<b>CD68</b>	Citoplasma	Amígdala, cerebro
<b>CD7</b>	Membrana	Amígdala, apéndice/ colon
<b>CD79</b>	Membrana y citoplasma	Amígdala
<b>CD99 (MIC2)</b>	Membrana y citoplasma	Páncreas, amígdala, timo
<b>CDX-2</b>	Núcleo	Apéndice y páncreas
<b>Antígeno carcinoembrionario (CEA)</b>	Membrana y citoplasma	Hígado y páncreas
<b>CERB-2</b>	Núcleo y citoplasma	Cáncer de mama
<b>CITOKERATINA 34BE12</b>	Citoplasma	Amígdala, próstata
<b>CK20</b>	Citoplasma	Apéndice/ colon
<b>CK7</b>	Citoplasma	Páncreas
<b>CROMOGRANINA A</b>	Citoplasma	Apéndice/ colon, cerebro
<b>CYCLIN D1</b>	Núcleo	Amígdala
<b>DESMINA</b>	Citoplasma	Apéndice/ colon, músculo estriado
<b>EBV (LMP-1)</b>	Membrana y citoplasma	Linfoma de Hodking, virus Epstein Barr, linfoma de Burkitt/Leucemia
<b>GCDFP-15</b>	Citoplasma	Hiperplasia de mama, piel
<b>GLYPICAN 3</b>	Membrana	Carcinoma de hígado
<b>HCG</b>	Membrana	Tumor de células germinales
<b>HMB45 (Melanosoma)</b>	Citoplasma	Melanoma, nevus
<b>K:AE1/AE3</b>	Citoplasma	Colon, piel, hígado
<b>Ki67</b>	Núcleo y perinúcleo	Amígdala, esófago
<b>MAMOGLOBINA</b>	Citoplasma	Piel, hiperplasia de mama



<b>MELAN-A</b>	Citoplasma	Piel, glándula adrenal
<b>MYOD1</b>	Nuclear	Musculo
<b>p53</b>	Núcleo	Adenoca. de colon, colon, esófago
<b>PLAP (placental Alkaline Phosphatase)</b>	Membrana y citoplasma	Placenta
<b>PSA</b>	Citoplasma	Hiperplasia prostática benigna
<b>RECEPTOR DE PROGESTERONA</b>	Núcleo	Cérvix, mama
<b>RECEPTOR ESTROGENICO</b>	Núcleo	Cérvix, carcinoma de mama
<b>s100</b>	Núcleo y citoplasma	Apéndice/Colon, piel
<b>SINAPTOFISINA</b>	Citoplasma	Apéndice/ colon
<b>TIROGLOBULINA</b>	Citoplasma	Tiroides
<b>TTF-1</b>	Núcleo	Tiroides, pulmón
<b>VIMENTINA</b>	Citoplasma	Amígdala, hígado, apéndice/colon
<b>WT-1 (Willms Tumor 1)</b>	Núcleo	Trompa de Fallopio

*Nota.* Información parcial tomada de: Manual de Calidad de Inmunohistoquímica en Anatomía Patológica. (Vaquero M., 2007).

## 2.5. Cuantificación del resultado inmunohistoquímico

Según el protocolo standard se siguió la siguiente pauta general, aunque hay casos específicos en los que los porcentajes y su significado pueden variar (Vaquero M., 2007):

### 2.5.1. *Negativo* (-)

Total negatividad o menos del 50% de las células “sospechosas” con menor intensidad que el control.

### 2.5.2. *Positividad débil* (+/-)

Más del 50% de las células “sospechosas” con menor intensidad que el control.

### 2.5.3. *Positivo* (+)

Más del 50% de las células “sospechosas” con igual o mayor intensidad que el control.

El límite de intensidades entre negativo y positividad débil o positivo se hace por comparación con un control interno existente u otro externo ad hoc.

### III. RESULTADOS

Se realizó el estudio inmunocitoquímico de 304 casos (Tabla 2) de pacientes provenientes de los diferentes consultorios clínicos del INEN, entre enero de 2017 y diciembre 2018. Estas fueron muestras de distintas partes del cuerpo tomadas por BAAF o métodos radiológicos en ganglios cervicales, tiroides, hígado, pulmón, retroperitoneo, mediastino, parótida, axila, mama, páncreas, ovario, vesícula biliar, riñón, cérvix, bazo, colédoco, duodeno, etc., y muestras de líquidos corporales como líquidos peritoneales, ascíticos, pleurales y secreciones corporales como aspirados y cepillados bronquiales etc.

El diagnóstico de cada caso fue dado de acuerdo a los resultados de los paneles inmunocitoquímicos realizados en los 304 casos estudiados. (Tabla 8)

**Tabla 8**

*Diagnóstico por Inmunocitoquímica*

<b>Diagnóstico por inmunocitoquímica</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2017-2018</b>	<b>%</b>
<b>Citología positiva con estirpe celular</b>				
Citología de carcinoma	78	37	115	37.83
Citología de Adenocarcinoma	19	9	28	9.21
Citología de Linfoma	15	1	16	5.26
Citología de Metástasis	35	2	37	12.17
<b>Citología positiva sin estirpe celular</b>				
Citología positiva para células neoplásicas	33	15	48	15.79
<b>Citología sospechosa</b>				
Citología sospechosa de malignidad	10	9	19	6.25
Citología Atípica	8	3	11	3.62
<b>Citología negativa</b>				
Citología de tipo inflamatoria	11	3	14	4.61
Citología negativa para células malignas	13	3	16	5.26
<b>TOTAL</b>	<b>222</b>	<b>82</b>	<b>304</b>	<b>100</b>

*Nota.* Tomado de: Unidad Funcional de Citopatología del INEN

De los 304 casos sospechosos de malignidad (Tabla 8) tuvimos casos que dieron ICQ positiva para diferentes estirpes celulares: 115 (37.83%) carcinomas, 28 (9.21%)

adenocarcinomas, 16 (5.26%), linfomas y 37 (12.17%) citologías de metástasis de acuerdo a su estirpe celular primaria.

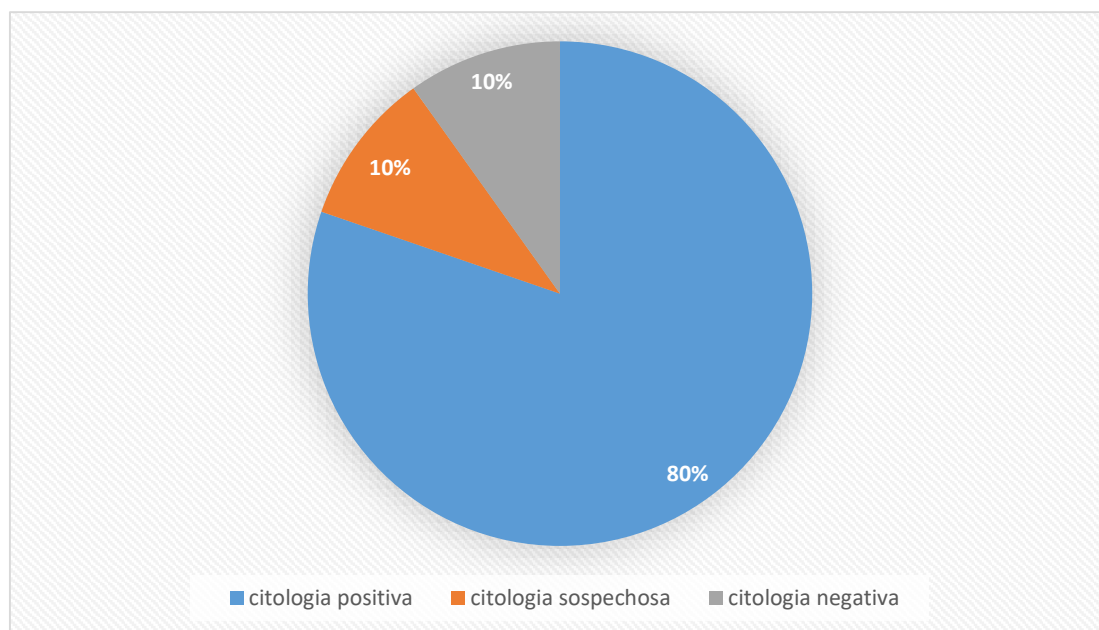
También se obtuvo diagnóstico de 48 casos (15.79%) como citologías positivas para células neoplásicas sin especificar su estirpe celular.

En cuanto a citología que no pudieron confirmar positividad, 19 casos (6.25%) se quedaron como sospechosas de malignidad y 11 casos (3.63) como citología atípica.

Y por último se descartó la malignidad a 30 casos de los cuales 14 casos (4.61%) salieron como citología inflamatoria y 16 casos (5.26%) como citología negativa para células malignas.

### Figura 8

*Tipos de diagnóstico de acuerdo a la citología*



## IV. CONCLUSIONES

- 4.1 Por lo presentado en este estudio retrospectivo de 304 casos con sospecha de malignidad, pudimos demostrar la eficacia de la Inmunocitoquímica en los frotices citológicos, porque se pudo establecer la positividad en 244 casos (80.26%), la negatividad en 30 casos (9.87%) y 30 casos (9.87%) quedaron como sospechosos de malignidad. (Figura 8)
- 4.2 Esto demuestra la alta especificidad y sensibilidad de la técnica de ICQ en el diagnóstico diferencial en aquellos frotices citológicos únicos, fijados y decolorados previamente.
- 4.3 Asimismo, la importancia de la aplicación de esta técnica en este tipo de material citológico es muy relevante para la ayuda clínica al paciente, ya que en muchos casos de ello depende su diagnóstico y tratamiento posterior.
- 4.4 Otra conclusión también importante es que la citología con diagnóstico inmunocitoquímico también ayuda a los pacientes en otros aspectos: en costo beneficio, en no tener que pasar nuevamente por procesos de exámenes para toma de material citológico muchas veces traumáticos para ellos, y de obtener resultados de diagnóstico precisos en los casos donde la obtención del material citológico es de difícil acceso en el paciente.

## V. RECOMENDACIONES

- 5.1 Para la utilización de los frotices citológicos ya teñidas previamente es necesario que hayan estado bien fijadas en alcohol de 75%, ya que se ha encontrado gran dificultad en la inmunocitoquímica para la reacción de los anticuerpos con los antígenos de superficie de membrana en frotices fijados al aire o con alcohol de baja concentración.
- 5.2 Al hacer los frotices en las láminas, tratar de hacerlos en monocapa, ya que se puede tener una buena cantidad de células, pero si están muy agrupadas no permitirá una mejor visualización de la marcación inmunocitoquímica a nivel celular.
- 5.3 Asimismo, el frotis homogéneo a lo largo de la extensión de la lámina permite que se puedan marcar varias áreas para la tinción con ICQ de diferentes marcadores tumorales en la misma lámina porta objetos.
- 5.4 Si se tiene en cuenta la calidad del frotis celular, es necesario que el paciente en lo posible no presente cuadros de infección, por la citología inflamatoria que pueda derivar de ello y que no permite la mejor visualización de las células atípicas o sospechosas de malignidad.

## VI. REFERENCIAS

- Alwahaibi, N., Alghallabi, A., Alsinawi, S. y Aldairi, N. (2018). Cytological Smear and Cell Block Versus Tissue Biopsies in the Diagnosis of Malignant Tumours in Non-Gynaecologic Specimens. *Ethiopian journal of health sciences*, 28(5), pp. 583–588. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v28i5.9>
- Arias-Stella, C., Huamanciza, O., León, R. y Arias-Stella, J. (2003). Importancia de la citoquímica como ayuda diagnóstica. *Patología*, 41(2), pp. 71-88.
- Bibbo, M. (1996). *Comprehensive Cytopathology. Cytopreparatory Techniques*. Saunders: Philadelphia. Edit. Saunders (W.B) Co LTD.
- Brahmi, U., Rajwanshi, A., Joshi, K., Ganguly, N., Vohra, H., Gupta, S. y et al. (2001). Role of Immunocytochemistry and DNA flow cytometry in the fine-needle aspiration diagnosis of malignant small round-cell tumors. *Diagn Cytopathol*, 24(4), pp. 233-239. <https://doi.org/10.1002/dc.1050>
- Dako (2015). *EnVision™ FLEX, High pH (Dako Omnis)*. <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/128708001.PDF>
- Dalquen, P., Sauter, G., Epper, R., Kleiber, B., Feichter, G. y Gudat, F. (1993). Immunocytochemistry in diagnostic cytology. *Recent Results Cancer Res*, 133(7), pp. 47-80. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-84951-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-84951-0_6)
- Dupré, M. y Courtade-Saidi, M. (2012). Immunocytochemistry as an adjunct to diagnostic cytology. *Ann Pathol*, 32(6), pp. 433-7. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2012.09.205>
- Jain, D., Nambirajan, A., Borczuk, A., Chen, G., Minami, Y., Moreira, A. L., Motoi, N., Papotti, M., Rekhtman, N., Russell, P. A., Savic Prince, S., Yatabe, Y., Bubendorf, L.,

- y IASLC Pathology Committee (2019). Immunocytochemistry for predictive biomarker testing in lung cancer cytology. *Cancer cytopathology*, 127(5), pp. 325–339. <https://doi.org/10.1002/cncy.22137>
- Koss, L. G. (1988). Aspiration biopsy: A tool in surgical pathology. *Am J Surg Pathol*, 12 (1), pp. 43-53. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3281484/>
- Mandal, P. K., Mondal, S. K., Roy, S., Adhikari, A., Basu, N. y Sinha, K. S. (2013). Immunocytochemistry: It's role in diagnosis of undifferentiated neoplasms by fine needle aspiration cytology. *J Cytol*, 30(2), pp. 121–124. <https://www.jcytol.org/article.asp?issn=0970-9371;year=2013;volume=30;issue=2;spage=121;epage=124;aui=Mandal>
- MINSA (2017). *Programa Presupuestal 2017, 0024 Prevención y Control del Cáncer. Ministerio de Salud, 017.* [https://www.minsa.gob.pe/presupuestales2017/archivos\\_apelacion/anexo2/anexo2-PREVENCIÓN%20Y%20CONTROL%20DEL%20CÁNCER.pdf](https://www.minsa.gob.pe/presupuestales2017/archivos_apelacion/anexo2/anexo2-PREVENCIÓN%20Y%20CONTROL%20DEL%20CÁNCER.pdf)
- Orell, S. R., Sterrett, G. F., Walters, M., y Whitaker, D. (1992). *A Manual and Atlas of fine needle aspiration cytology*. Churchill Livingstone.
- Papanicolau, G. N. (1960). New procedure for staining vaginal smears. *Science*, 95(1), pp. 438-39. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.95.2469.438>
- Risberg, B. (1999). *FNAC: an old method with new perspectives. I Taller Internacional de Citopatología, Francia – Noruega - Cuba. (Handout).* <http://www.conganat.org/6congreso/index-24.htm>

Roy-Chowdhuri, S. (2020). Immunocytochemistry of cytology specimens for predictive biomarkers in lung cancer. *Translational lung cancer research*, 9(3), pp. 898–905. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2019.12.31>

Skoog, L. y Tani, E. (2011). Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology*, 22(4), pp. 215-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2011.00887.x>

Vaquero, M. (2007). *Manual de Calidad de Inmunohistoquímica en Anatomía Patológica, Hospital Donostia*. Editorial Osakidetza.



## VII. ANEXOS

### Anexo A. Coloración Hematoxilina-Eosina aplicado en el INEN.

1. Alcohol 70	2 minutos
2. Agua	2 minutos
3. Hematoxilina de Harris	1 minuto
4. Lavado en agua	2 minutos
5. Alcohol 70%	2 minutos
6. Alcohol 70%	2 minutos
7. Eosina	2 segundos
8. Alcohol 70%	2 minutos
9. Alcohol 70%	2 minutos
10. Alcohol 100%	1 minuto
11. Alcohol 100%	1 minuto
12. Xilol	1 minuto
13. Xilol	1 minuto

*Nota.* Los tiempos puestos arriba son propios del laboratorio y dependen de varios factores: Tipo de material citológico, tiempo de preparación de los reactivos, marca del reactivo etc. Este método está basado en la técnica de preparación de Hematoxilina Eosina de Bibbo,1996.

**Anexo B. Coloración Papanicolaou aplicado en el INEN.**

1. Alcohol 50%	2 minutos
2. Lavado en agua	1 minuto
3. Hematoxilina de Harris	2 – 3 minutos aprox.
4. Lavado en agua	2 minutos
5. Agua ácida 0.5%	10 a 20 segundos
6. Lavado en agua	2 minutos
7. Agua amoniacal	1 minuto
8. Lavado en agua	2 minutos
9. Alcohol 70%	2 minutos
10. Alcohol 70%	2 minutos
11. Alcohol 70%	2 minutos
12. Alcohol 100%	1 minuto
13. Alcohol 100%	1 minuto
14. Alcohol 100%	1 minuto
15. Xilol	1 minuto
16. Xilol	1 minuto
17. Xilol	1 minuto

*Nota.* Los tiempos puestos arriba son propios del laboratorio y dependen de varios factores: Tipo de material citológico, tiempo de preparación de los reactivos, marca del reactivo etc. Este método está basado en la técnica de preparación de Papanicolaou de Bibbo, 1996.

## **Anexo C. Protocolo de Inmunocitoquímica aplicado en el INEN**

### **Tipos de muestra:**

- Bloques celulares (pellet celular o coágulos celulares incluidos en parafina)
- Frotis celulares (en láminas para procesamiento)

### **Metodología:**

- Equipo: Autostainer Link 48
- Cortes de muestras: 3 micras (bloque celular o coágulo)

### **Protocolo de inmunotinción:**

- 1.- Estufado de láminas: 1 hora a 60°C
  - sólo para cortes de muestras embebidas en parafina
  - frotis celulares no requieren estufado.
- 2.- Hidratación de las láminas en batería de alcoholes: sólo para los extendidos celulares
- 3.- Recuperación antigénica: 10 min. a 92°C (extendidos celulares)
  - 20 min. a 92°C (block cells, muestras embebidas en parafina)
- 4.- Bloqueo de peroxidasa endógena: 5min a t° ambiente
- 5.- Lavado con buffer Tris (Tris-Buffered Saline, ph7.6): 3 lavados de 3min. c/u
- 6.- Incubar con el anticuerpo primario: 20min t° ambiente
- 7.- Lavado con buffer Tris (Tris-Buffered Saline, ph7.6): 3 lavados de 3min. c/u t° ambiente
- 8.- Incubar con linker: 20min t° ambiente (sólo a los anticuerpos que así lo requieran) \*
- 9.- Lavado con buffer Tris (Tris-Buffered Saline, ph7.6): 3 lavados de 3min. c/u t° ambiente
- 10.- Incubar con Ac 2dario unido a Polímero de dextrano conjugado con HRP: 20min t° ambiente
- 11.- Lavado con buffer Tris (Tris-Buffered Saline, ph7.6): 3 lavados de 3min. c/u
- 12.- Incubar con DAB (Diaminobencidina concentrada) cromógeno: 10min t° ambiente
- 13.- Lavado con buffer Tris (Tris-Buffered Saline, ph7.6): 3 lavados de 3min. c/u t° ambiente

14.- Contraste con Hematoxilina: 10 seg. t° ambiente

15.- Lavado con agua corriente: 1 min. t° ambiente

16.- Deshidratar láminas (batería de alcoholes: 90°, 95°, 95°, 100°, 100°, sust. xilol, sust. xilol)

17.- Montaje de láminas con medio de montaje a elección.

\* (cd138, cd 1<sup>a</sup>, receptor de progesterona, ttf-1, wt-1)

## Anexo D. Manual de Instrucciones DAKO

Estos procedimientos utilizados en el Laboratorio están basados en el Manual de Instrucciones DAKO (Folleto Dako, 2015), que utiliza EnVision FLEX +, Mouse, High pH que es un sistema de visualización de muy alta sensibilidad diseñado para su uso en inmunohistoquímica con el Autostainer Link Instruments.

Fase	Paso	Reagent	Plantilla de protocolo de tinción		
			FLEX	FLEX+ Mouse	FLEX+ Rabbit
Desecado	Desecado	Clarify Clearing Agent	Sí	Sí	Sí
	Recuperación diana	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH o EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH o reactivo personalizado	97±2 °C* 30 min*	97±2 °C* 30 min*	97±2 °C* 30 min*
Tinción	<i>Lavado</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavado	Lavado	Lavado
	Anticuerpo primario	20 min*	20 min*	20 min*	20 min*
	<i>Lavado</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavado	Lavado	Lavado
	Endogenous Enzyme Block	EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min	3 min	3 min
	<i>Lavado</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavado	Lavado	Lavado
	Reactivo secundario	EnVision™ FLEX+ Mouse o Rabbit LINKER	-	Mouse LINKER 10 min	Rabbit LINKER 10 min
	<i>Lavado</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	-	Lavado	Lavado
	Polímero marcado	EnVision™ FLEX/HRP	20 min*	20 min*	20 min*
	<i>Lavado</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavado	Lavado	Lavado
	<i>Lavado</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavado	Lavado	Lavado
	Cromógeno sustrato	EnVision™ FLEX Substrate Working Solution	5 min	5 min	5 min
<i>Lavado</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavado	Lavado	Lavado	
Contratinción	Contratinción	Hematoxylin (Dako Omnis)*	3 min*	3 min*	3 min*
	<i>Lavado</i>	Agua desionizada	Lavado	Lavado	Lavado
	<i>Lavado</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavado	Lavado	Lavado

\* Posibilidad de personalización.

Nota. DAKO (Folleto Dako, 2015): P04120ES\_001\_GV800/2015.05 p. 10/12)