

# TINCIÓN DUAL (P16/KI-67): TECNOLOGÍA DE PUNTA PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE CÁNCER DEL CUELLO UTERINO EN UN HOSPITAL PÚBLICO

## DUAL STAINING (P16/KI-67): CUTTING-EDGE TECHNOLOGY FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF CERVICAL CANCER IN A PUBLIC HOSPITAL

**AUTORES:** PÉREZ, MARIA S.\*; ARIEL, LAURA M.\*; GLIEMMO, CINTHIA\*; BASSI, JUAN P.\*\*; ; LONGO JUSTINA\*\*\*; SANTOMÉ, OSUNA ALBERTO V.\*\*\*\*

**LUGAR DE TRABAJO:** SERVICIO DE GINECOLOGÍA (PATOLOGÍA DEL TRACTO GENITAL INFERIOR) Y ANATOMÍA PATOLÓGICA - HOSPITAL DE AGUDOS CARLOS G. DURAND - AV. DIAZ VELEZ 5044 - C.P. 1405 - CABA, ARGENTINA.

\*MÉDICA DE PLANTA GINECOLOGÍA - PATOLOGÍA DEL TRACTO GENITAL INFERIOR

\*\*MÉDICO RESIDENTE TOCGINECOLOGÍA

\*\*\*MÉDICA DE PLANTA ANATOMÍA PATOLÓGICA- SECCIÓN CITOLOGÍA

\*\*\*\*JEFE DE PATOLOGÍA DEL TRACTO GENITAL INFERIOR

🏆 **TRABAJO GANADOR DEL PREMIO "ROTARY CLUB" EN LAS LIX JORNADAS ANUALES DEL HOSPITAL DURAND 2025**



### ABSTRACT:

**INTRODUCTION:** Background High-risk HPV is the primary risk factor for cervical cancer (CC). Dual Staining (DS), an immunocytochemical technique detecting p16INK4a and Ki-67, marks HPV transforming infection and identifies the increased risk of progression to CC.

**OBJECTIVE:** To describe the results of implementing DS in patients according to the Hospital Durand protocol, correlate them with HPV viral genotype, and demonstrate its importance as a triage method in HPV-positive patients.

**METHODS:** A descriptive, observational, prospective, cross-sectional study was conducted. Cervical samples for Dual Staining (CINtecR Plus) were collected from patients at the Lower Genital Tract clinic. Main inclusion criteria were: 1) HPV-positive patients aged 30-65; 2) ASCUS/LSIL in patients <30 or >65 years; 3) Negative cytology with abnormal colposcopy in patients <30 or >65 years; 4) Post-HSIL follow-up.

**RESULTS:** 106 patients were analyzed; 15% had positive DS. Among patients with a positive HPV test and normal cytology (triage population), 16.6% were DS-positive. In this subgroup, histology confirmed precancerous lesions in 50% of cases. These lesions were identified 6 months earlier than stipulated by the standard protocol. Prevalent genotypes were HPV-16 and other high-risk types.

**CONCLUSIONS:** DS is a valuable risk predictor for CC and its precursor lesions. Its implementation optimizes diagnosis and reduces over-treatment and under-treatment. This tool is especially relevant in the public system for vulnerable populations, such as those at our hospital (a reference center with a high migrant population with a high incidence of CC), allowing for earlier intervention.

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN** Introducción: El HPV de alto riesgo es el principal factor de riesgo para cáncer cérvico-uterino (CCU). La Tinción Dual (TD), técnica inmunocitoquímica detecta

p16INK4a y Ki-67, marca la infección transformante del HPV e identifica el riesgo aumentado de progresión a CCU.

**OBJETIVO:** Describir resultados de TD según protocolo del Hospital Durand, relacionarlos con el genotipo viral de HPV y demostrar su importancia como método de triaje en pacientes con test de HPV positivo.

**Material y Métodos:** Estudio descriptivo, observacional, prospectivo y transversal. Se tomaron muestras cervicales para Tinción Dual (CINtecR Plus) a pacientes del consultorio de Tracto Genital Inferior. Los criterios de inclusión: 1) Pacientes 30-65 años Test HPV+; 2) ASCUS/LSIL en <30 y >65 años; 3) Citología negativa, colposcopia anormal en <30 y >65 años; 4) Seguimiento post-HSIL.

**RESULTADOS:** 106 pacientes; 15% presentó TD positiva. De las pacientes con test HPV+ y citología normal (población de triaje), el 16,6% TD positiva. En este subgrupo, la histología confirmó lesión precancerosa en el 50%. Esta lesión fue identificada 6 meses antes de lo estipulado por el protocolo de triaje estándar. Los genotipos prevalentes fueron HPV-16 y otros de alto riesgo.

**CONCLUSIÓN:** La TD es un predictor de riesgo valioso para CCU y sus lesiones precursoras. Su implementación optimiza el diagnóstico y reduce tratamientos excesivos o insuficientes. Esta herramienta es especialmente relevante en el sistema público para poblaciones vulnerables, como las de nuestro hospital (centro de referencia con alta población migrante con elevada incidencia de CCU), permitiendo una intervención más temprana.

**KEYWORDS:** E6/E7 oncoproteins, immunocytochemistry, Dual staining, p16INK4a, Ki-67, HPV molecular test, cell cycle.

**PALABRAS CLAVE:** Oncoproteínas E6/E7, inmunohistoquímica, Tinción Dual, Proteína p16, Proteína KI67, Test molecular de HPV, ciclo celular.

## INTRODUCCIÓN

El Virus del Papiloma Humano (HPV) de alto riesgo oncogénico es considerado el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino (CCU) y de su lesión precursora, la lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIE) <sup>1-2</sup>. Durante el proceso de carcinogénesis, el ADN del HPV se integra al genoma celular y altera los mecanismos reguladores del crecimiento celular mediante la interacción de las oncoproteínas virales E6/E7 con las proteínas celulares supresoras de tumores: p53 y retinoblastoma (pRb). Esta interacción generaría un constante estado proliferativo que conduce a una inestabilidad genética celular<sup>2</sup>.

Actualmente se han desarrollado técnicas para detectar biomarcadores capaces de identificar células con ciclo celular alterado y proliferación descontrolada en muestras citológicas<sup>3</sup>. Entre ellas, contamos con la Tinción Dual (TD), técnica inmunocitoquímica que permite detectar en forma simultánea la presencia de la proteína supresora de tumores, p16INK4a y el marcador de proliferación, Ki-67 en una misma célula. Estas proteínas son marcadoras de infección por HPV, de proliferación celular y de integración del ADN viral a la célula, es decir, de una infección transformante<sup>4-5</sup>.

La TD es capaz de identificar riesgo aumentado para desarrollar una lesión clínicamente significativa y con riesgo de progresar a CCU. Presenta una elevada sensibilidad y especificidad, sobre todo en pacientes con citologías con cambios menores (ASCUS y LSIL) y en citologías con cambios mayores (ASC-H). Una TD positiva expresa una infección por el virus del HPV que está experimentando una transformación oncogénica<sup>6</sup>. Esta técnica es capaz de detectar el 100% de los casos CCU, el 73.9% de CIN2 y el 57.1% de lesiones de bajo grado, siendo negativa en metaplasia escamosa madura o inmadura, epitelio atrófico y con cambios reactivos<sup>3</sup>.

La interpretación de las TD no depende de las características morfológicas ni la intensidad de las células teñidas, lo que le confiere mayor objetividad y reproducibilidad con la consecuente disminución de variabilidad interobservador<sup>7</sup>. Sólo una célula teñida indica TD positiva: p16 mostrará tinción citoplasmática de color marrón y Ki-67

exhibirá coloración nuclear rojiza<sup>3</sup>. Es de suma utilidad en la estratificación de riesgo de pacientes con Test molecular de HPV positivo, dado que éste posee la ventaja de tener mayor sensibilidad frente a la citología, pero con una baja especificidad para lesiones intraepiteliales de alto grado, con el requerimiento posterior de realizar una segunda prueba de triage<sup>8</sup>. La utilización de TD en los Test molecular de HPV positivo con citología negativa reduce el riesgo de enfermedad en 2.9 veces con respecto al uso de citología convencional como único método de tamizaje<sup>9</sup>.

En la actualidad está aceptada en las guías de varios países europeos y algunos latinoamericanos como prueba de triage en Test de HPV positivo<sup>9</sup>.

La TD representa un avance prometedor para el diagnóstico de LIE y podría ofrecer una alternativa valiosa a los métodos de tamizaje actuales según el contexto clínico.

## OBJETIVOS

El objetivo de nuestro trabajo de investigación es compartir nuestra experiencia como único hospital público de Latinoamérica que cuenta con esta herramienta y describir los resultados obtenidos con la implementación de la Tinción Dual en pacientes con indicación según protocolo del Hospital público Carlos G. Durand de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA). Relacionar los resultados de TD p16/ Ki-67 en citología cervical con los genotipos virales de HPV y analizar resultados de TD en test de HPV positivo con citología negativa (NILM).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio descriptivo observacional prospectivo de corte transversal realizado a pacientes que fueron atendidas en el consultorio de Tracto Genital Inferior (TGI) del Hospital Público "Dr. Carlos G. Durand" de la Ciudad de Buenos Aires, a las que se les tomó material para Tinción Dual (CINtec<sup>R</sup> Plus) según criterios de un protocolo establecido previamente.

Las muestras cervicales (exo y endocervicales) fueron tomadas por médicos de la sección del Tracto Genital Inferior con espátula de Ayre y cepillo endocervical respectivamente; se extendió con cuidados especiales preestablecidos (frotis muy delgado, sin grumos, en una sola pasada) en

un portaobjetos electrocargado y se fijó inmediatamente en alcohol al 96%. Luego fueron enviados en recipientes individuales protegidos de la luz y analizados por el Servicio de Citopatología de nuestra institución donde se aplicó TD. Se confeccionó una base de datos en el consultorio de la sección Tracto Genital Inferior (Servicio Ginecología) a partir de historias clínicas digitalizadas y resultados de citopatología por un período de 18 meses comprendido entre Enero-2024 a Junio-2025.

**Criterios de inclusión:** Se dividieron a las pacientes para incluirlas en la utilización de la TD: 1) Pacientes de 30-65 años con Test molecular HPV con genotipificación positivo en contexto de tamizaje; 2) Citologías ASCUS y LSIL en pacientes menores de 30 años y mayores de 65 años; 3) Citologías negativas con presencia de imagen colposcópica en pacientes menores de 30 años y mayores de 65 años; 4) Paciente en seguimiento post tratamiento de HSIL (Indicado a los 6 meses y al año, este último junto con test de HPV). **Criterios exclusión:** aquellas pacientes en nuestra base de datos 1) 30 años a 65 años con test de HPV no detectable; 2) Menores de 30 años y mayores de 65 años con citología HSIL o CCU o NILM con colposcopia negativa; 3) Diagnóstico histológico de HSIL o cáncer de cuello uterino; 4) Embarazadas.

## RESULTADOS

Se realizaron un total de 212 muestras con TD en la citología de 106 pacientes que cumplían los criterios de inclusión. El promedio de edad fue de 42.1 años (la edad menor fue de 26 años y la máxima de 66 años).

Del total de las pacientes (N=106), el 15% (16/106) resultaron ser TD positivas y 85% (90/106) fueron negativas. (Gráfico 1).

Si analizamos nuestros criterios de inclusión, de las 106 pacientes a las que se les realizó TD: 58% (61/106) fueron incluidas por presentar Test de HPV positivo realizado como screening primario; 13% (14/106) cumplían criterio de citología ASCUS o LSIL en menores de 30 años y mayores de 65 años; 1% (1/106) fue indicada en pacientes con Papanicolaou negativo con colposcopia positiva en menores de 30 años; 28% (30/106) tuvieron indicación como seguimiento post tratamiento de HSIL. (Gráfico 2).

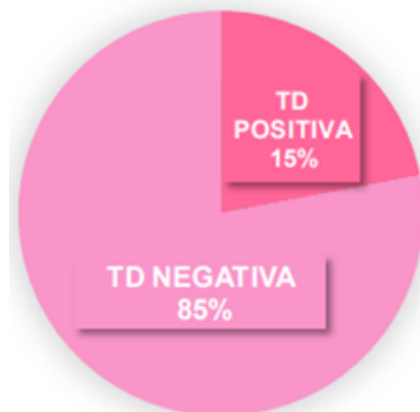


Gráfico 1. Positividad Tinción Dual. N=106

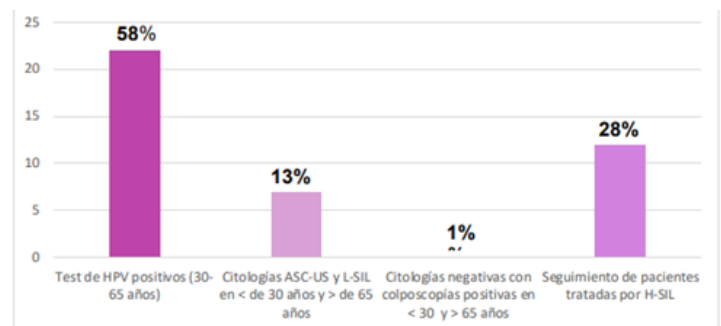


Gráfico 2. Tinción Dual según indicaciones del consultorio TGI. N=106

1) Tinción dual en pacientes de 30-65 años con Test molecular HPV positivo: De las 61 pacientes analizadas en este ítem, el 20% (12/61) resultaron ser Tinción Dual positiva y el restante porcentaje 80% (49/61) fue negativa (Gráfico 3). De las 12 pacientes con TD positiva, 41.7% (5/12) correspondieron al genotipo "HPV 16", 41.7% (5/12) al genotipo "OTROS" y 16.6% (2/12) a la combinación del genotipo "HPV 16 y otros". (Tabla 1) Del total de pacientes con test de HPV+ con citología negativa para lesión intraepitelial o malignidad (NILM) (N=36), 6 de ellas resultaron positivas para tinción dual lo que corresponde a un 16.6% de la muestra. De las 6 pacientes, el 50% (3/6) se biopsiaron por lesión colposcópica de alta sospecha de H-SIL de las cuales 2 confirmaron el H-SIL 66.6% (2/3), las otras 3 pacientes no fueron biopsiadas por no encontrarse lesiones G2. Las 2 pacientes biopsiadas presentaron lesión colposcópica de alta sospecha a los 6 meses (momento del control) de la realización de la tinción dual. Cabe destacar que la confirmación

del H-SIL se detectó 6 meses antes de lo que hubiese correspondido el seguimiento con triaje sólo con citología. (Tabla 2)

2) Tinción Dual en citologías ASCUS y LSIL en mujeres menores de 30 años y mayores de 65 años: De las 14 pacientes analizadas en este ítem, el 7.1% (1/14) resultaron ser Tinción Dual positiva y el restante porcentaje 92.9% (13/14) fue negativo.

3) Tinción Dual en citologías negativas y colposcopías positivas en pacientes menores de 30 años y mayores de 65 años: Obtuvimos 1 paciente en este ítem con TD positiva y colposcopia de alta sospecha (lesión acetoblanca G2). Se realizó histología que resultó ser una lesión intraepitelial de alto grado (H-SIL)

4) Tinción Dual como seguimiento de mujeres tratadas por HSIL: De las 30 pacientes solo el 6.6% (2/30) fueron positiva para TD y 90% (27/30) negativa. Promedio de control post tratamiento 10.3 meses. Las dos pacientes presentaron citología negativa, con test HPV positivo para genotipo 18 y OTROS sin imágenes colposcópicas que continúan con seguimiento estricto (cada 4-6 meses).

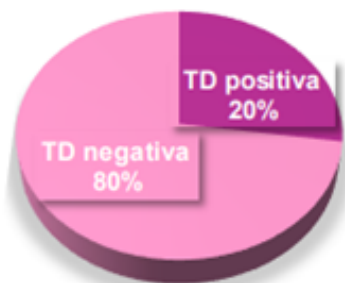


Gráfico 3. Test molecular HPV positivo 30-65 años. N=61

Genotipos virales en test de HPV positivos. N 61	Distribución según genotipo viral. N 61	TD positiva N 12
Genotipo 16	18% (11/61)	41.7% (5/12)
Genotipo 18	10% (6/61)	0%
Genotipo "OTROS"	59% (36/61)	41.7% (5/12)
Combinación 16 y otros	10% (6/61)	16.6% (2/12)
Combinación 18 y otros	0	0%
Combinación 16,18 y otros	1.5% (1/61)	0%
NO ESPECIFICADO	1.5% (1/61)	0%

Tabla 1. Genotipificación HPV en tinción dual positiva

Tinción Dual	N=36
Positivas	16,6% (6/36)
De las positivas (N=6) se biopsiaron por lesión colposcópica sospechosa	50% (3/6)
Confirmación histológica de H-SIL de las biopsiadas (N=3)	66,6% (2/6)

Tabla 2. Test de HPV +/citología NILM N=36

## DISCUSIÓN

La progresión a lesiones de alto grado - premalignas- y consecuentemente a cáncer está caracterizada por eventos moleculares que conllevan a una desregulación del ciclo celular y que pueden ser monitorizados con biomarcadores más efectivos como p16/ Ki-67. La tinción dual es útil en el diagnóstico diferencial entre LIE alto grado, lesiones de menor jerarquía y mimics.

El porcentaje de positividad de tinción dual obtenida en nuestro estudio fue del 15%, dato relevante por ser un tanto menor con otros trabajos nacionales de hospitales privados (17%), y que tendremos que observar con un número mayor de muestra hacia dónde virará este resultado dado que somos centro de referencia en el sistema público para derivación a nuestro equipo de trabajo y que las características de nuestra población son particulares (inmigración especialmente de países limítrofes con alta incidencia de CCU y precursores).<sup>10</sup>

Por otro lado, en pacientes con Test molecular HPV positivo realizado como tamizaje primario obtuvimos un 20% de TD positivas, cifra menor que la reportada en la bibliografía internacional que ronda el 36.5%.<sup>11</sup>

Es de importancia señalar que los genotipos virales de alto riesgo oncogénico prevalente resultó ser HPV-16 y "OTROS" en porcentajes equivalentes, a diferencia de bibliografía publicada en la cual prevalece el genotipo HPV 16 con mayor persistencia y causante del 70% de las lesiones intraepiteliales de alto grado, con un porcentaje menor para la combinación de "HPV-16 y Otros"<sup>12</sup>.

En pacientes con test de HPV+ con citología basal normal (N=36), 6 de ellas resultaron positivas para tinción dual, observando una positividad del 16,6% mayor que el encontrado en bibliografía nacional<sup>10</sup> que es de 12.3%; en estas pacientes la utilización de la tinción dual con resultado negativo reduce el riesgo de enfermedad de hasta 3 veces que utilizando sólo la citología como triaje detectando más del 70 % de las lesiones subyacentes CIN3+, resultando adecuada para el triaje de estas mujeres a colposcopia.

Respecto de las citologías ASCUS y LSIL en mujeres menores de 30 años y mayores de 65 años, 7.1% resultó positivo para TD siendo un valor menor en

comparación con los datos encontrados en otro trabajo<sup>11</sup>, pero entendemos que el porcentaje coincide con la probabilidad de progresión de estas lesiones de bajo grado a lesiones intraepiteliales de alto grado, por lo cual, estas pacientes serán pasibles de un seguimiento más estricto hasta encontrar la lesión mayor.

En los criterios de inclusión referidos en nuestro trabajo, tanto la citología negativa con colposcopia positiva en menores de 30 años y mayores de 65 años, como también, el seguimiento de pacientes tratadas por H-SIL no son de uso previsto en CINtec® plus cytology, por lo que, actualmente estamos realizando nuestra experiencia en una investigación paralela a la actual. En cuanto a citologías negativas con colposcopias positivas en menores de 30 años y mayores de 65 detectamos una paciente, en cuya colposcopia se encontró una lesión G2 y se confirmó por histología el H-SIL. En seguimiento de pacientes tratadas por H-SIL el porcentaje de positividad fue del 6.6% sin contar con bibliografía internacional ni nacional al tratarse de un ítem off label. La aplicación de la inmunotinción dual p16INK4a/Ki-67, como prueba complementaria específica en el triage de población con infección frecuente por HPV y citologías ASCUS/LSIL, es más específica que la detección molecular del ADN de los diferentes tipos de HPV, contribuyendo a la disminución del uso de procedimientos clínicos innecesarios, ya que, posee elevada sensibilidad y especificidad, así como valor predictivo positivo y negativo suficiente para detectar CIN2 o 3<sup>10</sup>.

En cuanto a las fortalezas de nuestro estudio, siendo el primer hospital público que permite un estudio tan específico frente a la detección de lesiones, podemos decir que la TD brinda una mejor estratificación de riesgo para mejorar la prevención del CCU. Las debilidades en nuestro trabajo es el número de las muestras analizadas que debemos profundizar para tener una conclusión categórica al respecto.

## CONCLUSIÓN

La TD es un predictor de riesgo valioso para el cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras, mejora la reproducibilidad y la exactitud diagnóstica. Consideramos que su implementación puede contribuir a optimizar los diagnósticos y

reducir tanto los tratamientos excesivos (permitiendo espaciar los controles) como los insuficientes. Esta tecnología representa una herramienta de vanguardia que acerca el futuro al presente y ofrece ventajas significativas, especialmente para las pacientes más vulnerables dentro del sistema público de salud. Cabe destacar que nuestro hospital constituye un centro de referencia dentro del sistema público, y que las características particulares de nuestra población con alto porcentaje de mujeres migrantes de países limítrofes con elevada incidencia de CCU y precusores, otorgan especial relevancia a la incorporación de esta tecnología en nuestro ámbito de trabajo.

Nuestro desafío como sistema de salud es continuar con este estudio en el tiempo para tener un mayor número de muestras que nos permita diseñar algoritmos de manejo clínico en nuestra población.

**Conflictos de Interés:** Los autores del artículo declaran que no hay ningún conflicto de interés al publicar el manuscrito en la Revista.

Recibido: 30/10/2025 - Aceptado: 21/11/2025

## BIBLIOGRAFÍA

- Carozzi F, Confortini M, Dalla P, Del MA, Gillio-Tos A, De ML, et al. Uso de la sobreexpresión de p16-INK4A para aumentar la especificidad de las pruebas del virus del papiloma humano: un subestudio anidado del ensayo controlado aleatorizado del NTCC. *Lancet Oncol.* 2008; 9:937-945.
- Doorbar J. Organización del ciclo vital del papilomavirus y selección de biomarcadores. *Dis Markers* 2007; 23: 297-315.
- Fishkel V, Bologna M, Caero R, Godoy M, Sanchez Marul R, Eiben M, Monge F. Capacidad diagnóstica de la Tinción Dual (p16/Ki-67) en citología convencional como triage en una población de mujeres HPV positivas y citología negativa o con cambios menores pertenecientes a un Hospital Privado de comunidad. *Colposcopia* 2024; 35 (2): 4-10.
- Kotov D, Katiyar S. p16INK4a and Ki-67 cual staining: A valuable tool for cervical cancer screening. *Journal of Cancer Reserarch and Clinical Oncology* 2022; 148 (6): 1377-1388.
- NIC. Para mujeres con infección por VPH, prueba puede guiar exámenes de seguimiento para detección del cáncer de cuello uterino 8 de noviembre de 2018, por Equipo del NCI
- Organización Mundial de la Salud. [www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab2](http://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab2).
- Pérez M, Gliemmo C, Lincuez M, Ariel L, Castañeda S, Gándara M, Santomé Osuna A. Ehallazgos imprevistos de genotipos virales y factores de riesgo en lesiones histológicas de H-SIL. XII Congreso Latinoamericano de Patología del Tracto Genital Inferior Y Colposcopia e XXVI Congreso Brasileiro de Patología do Trato Genital Inferior e Colposcopia. Recife Expo Center, Recife-PE, nos días 16 a 19 de Outubro de 2024.
- Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, et al. Infección cancerígena por el virus del papiloma humano. *Imprimaciones Nat Rev Dis.* 2016; 2:16086.
- Toziano, M; Maciel, A; Taucher, P; Seira, C. Manual de patología del tracto genital inferior y colposcopia. Sociedad Argentina de Patología del Tracto Genital Inferior y Colposcopia. Editorial Journal. Buenos Aires, Argentina 2023. *Histopatología del cáncer invasor de cuello uterino* 26; 201-211.
- Walboomers J, Jacobs M, Manos M, et al. El virus del papiloma humano es una causa necesaria de cáncer de cuello uterino invasivo en todo el mundo. *J Pathol.* 1999; 189:12-19.
- Wentzensen N., et al. Rendimiento de la inmunotinción p16/Ki-67 para detectar precusores del cáncer de cuello uterino en una población remitida a colposcopia. *Clin Cancer Res.* 1 de agosto de 2012; 18 (15): 4154-62.
- Wentzensen N, Fetterman B, Castle P, Schiffman M, Wood S, Stiemering E, Tokugawa D, Bodelon C, Poitras N, Lorey T, Kinney W. Citología de doble tinción p16/Ki-67 para la detección de precáncer cervical en mujeres con VPH positivo. *Instituto Nacional del cáncer.* 2015; 107 (12): djv 257