

Metodología para la evaluación automatizada de la expresión del receptor de vitamina D mediante técnica inmunocitoquímica

Methodology of automated Vitamin D receptor immunocytochemical expression analysis

Pablo Zoroquiain ¹, Javiera Meza ¹, Antonia Vieira ², Arturo Grau ²

Resumen

Introducción: la citología permite examinar células de un tejido de manera mínimamente invasiva, sin embargo, la capacidad de realizar técnicas complementarias como la inmunocitoquímica (ICQ) no está exenta de dificultades. Es el objetivo de nuestro trabajo presentar una metodología que permita la utilización de ICQ automatizada asociada a un análisis automatizado mediante técnica de patología digital.

Métodos: se incluyeron 5 sujetos sanos y se obtuvieron muestras de superficie ocular utilizando un citocepillo. La muestra fue procesada de manera automatizada mediante citología en fase líquida. Posteriormente se realizó ICQ automatizada para detectar la positividad nuclear del receptor de vitamina D. Para la evaluación, se utilizaron dos métodos: cuantificación directa bajo microscopio de luz y análisis automatizado usando analizador de imágenes en las diapositivas digitales obtenidas con un Scanner. El porcentaje de positividad encontrado con ambos métodos fueron comparados utilizando la prueba de Kappa. Resultados: todas las muestras presentaron una celularidad adecuada. En todos los casos fue posible realizar ICQ automatizada, más aún, todas las muestras presentaron una calidad óptima. Al comparar ambos métodos (manual versus automatizado) se observó un nivel de acuerdo sustancial (Kappa=0,69). **Conclusiones:** la metodología presentada en este manuscrito permite la evaluación automatizada de marcadores inmunohistoquímicos de la superficie ocular de manera mínimamente invasiva, siendo similar al conteo manual, pero más objetivo y reproducible. Esta técnica podría ser útil para el estudio proteómico en patologías como la enfermedad por ojo seco.

Palabras clave: inmunocitoquímica; patología digital; citología; receptor de vitamina D; enfermedad por ojo seco.

Abstract

Introduction: Cytology tests use small amounts of tissue samples for diagnosis as a minimally invasive technique; however, the ability to perform complementary methods such as immunocytochemistry (ICC) is not without difficulties. The aim of our work is to present a method that allows the use of automated ICC associated with an automated image analysis using digital pathology. **Methods:** Five healthy subjects were included, and ocular surface samples were obtained using a cytobrush. The sample was processed as liquid-based cytology. Automated ICC was subsequently performed to detect vitamin D receptor nuclear positivity. Two methods were used for evaluation: manual counting under a light microscope and automated analysis using an image analyzer on digitized slides. The percentage of positivity found in both methods was compared using the Kappa test. **Results:** All samples presented adequate cellularity. In all cases, it was possible to perform automated ICC; moreover, all samples presented optimal quality. When comparing both methods (manual versus automated), a substantial level of agreement was seen (Kappa=0.69). **Conclusions.** The method presented in this manuscript allows the minimally invasive automated evaluation of ocular surface ICC markers, being like manual counting but more objective and reproducible. This technique could be useful for proteomic study in pathologies such as dry eye disease.

Keywords: cytology; immunocytochemistry; digital pathology; image analysis; vitamin D receptor; dry eye disease.

Fecha de envío: 2022-08-22 - Fecha de aceptación: 2022-12-23

Introducción

La citopatología es una rama de la patología que permite estudiar el nivel celular de las enfermedades. A diferencia del estudio

histopatológico esta es una técnica no invasiva o mínimamente invasiva. Las muestras citológicas pueden ser obtenidas a través

(1) Departamento de Anatomía Patológica, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile
(2) Departamento de Oftalmología, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile
Autor correspondencia: zoroquiain@gmail.com



de la exfoliación de células utilizando utensilios como cepillos o espátulas. También pueden ser utilizadas agujas para obtener muestras celulares más profundas. (Al-Abbadi, 2011)

El uso de la citología de impresión como herramienta diagnóstica en la patología de ojo seco fue difundida por el Doctor J.D. Nelson y ha sido ampliamente utilizada con el fin de estudiar la morfología de la superficie ocular y detectar la presencia de metaplasia escamosa en ésta (Nelson, 1988). Esta técnica ha sido modificada por otros autores, permitiendo el estudio de proteínas mediante inmunocitoquímica y características ultraestructurales utilizando microscopía electrónica. (Singh, 2005). La inmunocitoquímica podría permitir el estudio de proteínas como el receptor de vitamina D (RVD). Éste ha sido asociado no sólo al metabolismo óseo sino también a procesos inflamatorios y degenerativos. La enfermedad por ojo seco (EOS) es una patología multifactorial frecuente que lleva a un serio deterioro en la calidad de vida. Estudios han mostrado una asociación de EOS con déficit de vitamina D (VD) (Yoon, 2016).

La base de la técnica propuesta por Nelson se basa en la exfoliación celular utilizando un filtro de acetato donde las células quedan adheridas a éste. Esta técnica permite una adecuada evaluación observando directamente con un microscopio óptico. Dado que las células quedan adheridas al filtro es necesario "despegarlas" para un estudio de microscopía electrónica (Cennamo *et al.*, 2013) y la presencia del filtro mismo otorga serias dificultades para el análisis inmunocitoquímico (Poli *et al.*, 2011). Las principales desventajas son el acentuado fondo y que la técnica inmunocitoquímica misma debe realizarse de manera manual, lo que agrega variabilidad en la tinción de las muestras y por ende posibles resultados imprecisos.

En los últimos años nuevas técnicas de evaluación citológica han sido desarrolladas. Un hito lo ha presentado la citología en base líquida (CBL), permitiendo el análisis de muestras hipocelulares, con características mucoides. (Zeppa, 2014) Esta técnica consiste en que las células son depositadas en un fijador líquido y luego son capturadas en un filtro en una monocapa, para finalmente ser transferidas a una lámina cargada. Para producir resultados reproducibles existen procesadores automatizados entre los que destacan Thinprep (Hologic, Estados Unidos) y Surepath (Becton, Dickinson and Company, Estados Unidos). La citología en fase líquida, además, permite el estudio de la inmunocitoquímica y el estudio de genómica. Sin embargo, no existen de acuerdo con lo revisado, el uso de herramientas automatizadas comercialmente disponibles que permitan la evaluación de marcadores inmunocitoquímicos en superficie ocular utilizando patología digital. El presente estudio muestra un flujo de trabajo que permitiría la

toma de muestras de superficie ocular de manera no invasiva, la realización de la técnica inmunocitoquímica automatizada y finalmente el análisis automatizado y reproducible mediante patología digital.

Metodología

En total 5 individuos sanos, sin sintomatología de ojo seco fueron enrolados. En todos los participantes se obtuvo una muestra de conjuntiva palpebral utilizando un cito cepillo de acuerdo con el siguiente protocolo: Al participante se le explicó el procedimiento y firmó un consentimiento informado. Posteriormente el paciente se sentó en la silla oftalmológica y se le colocó clorhidrato de proparacaína 0,5%, dos gotas 2 minutos antes de la toma de muestra. La muestra se obtuvo utilizando un cito cepillo mediante la rotación de éste en su propio eje con el fin que las cerdas exfolien el epitelio, en base a lo descrito previamente (figura 1) (Kobayashi *et al.*, 1997).



Figura 1: Obtención de muestra citológica usando el citocepillo. Se observa que el citocepillo se coloca en la conjuntiva palpebral inferior. Posteriormente realizando un movimiento rotatorio en su propio eje se produce la exfoliación celular.

El cepillo fue posteriormente inmerso y agitado levemente en la solución fijadora preservcyt (Hologic, Estados Unidos) con el fin de depositar las células en la solución para su fijación. La muestra fue posteriormente procesada usando el modo 1, que es un protocolo que viene incorporado en el equipo, optimizado para muestras obtenidas por un cepillo, y que permitiría optimizar el montaje de las células en el portaobjetos, en el equipo T2000 (Hologic, Estados Unidos), de acuerdo con lo establecido por el fabricante. En resumen, el frasco es colocado en el área de procesamiento y se coloca un filtro non-gyn (Hologic) y una lámina cargada Thinprep en las zonas correspondientes. El equipo finalmente aspira todo el contenido del líquido y lo filtra. Las células quedan en éste formando una monocapa. Finalmente, las células son montadas en el portaobjetos.

Una vez obtenidas las láminas con las células conjuntivales, se realizó estudio inmunocitoquímico automatizado en el equipo Benchmarck Ultra (Roche, AZ, USA) de acuerdo con lo descrito por el fabricante. En resumen, las láminas con las células son bañadas en solución de pretratamiento y posteriormente el anticuerpo primario anti receptor de vitamina D (SAB4503071; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, U.S.A.), en una dilución 1:120 fue incorporado. La detección se realizó con el ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche) y se contratiñó con Hematoxilina y Blueing Reagent (Roche).

La calidad de la técnica inmunocitoquímica fue evaluada con los siguientes patrones, de acuerdo con Maxwell *et al.* (2000)

- 1.- Especificidad de la tinción: 0 ausente; 1 parcial; 2 presente,
- 2.- Ausencia de tinción de fondo: 0 ausente; 1 focal; 2 presente)
- 3.- Contra tinción: 0 inadecuada; 1 subóptima; 2 óptima. Un puntaje entre 0-2 fue considerado inaceptable, 2-4 borderline y 6-8 óptimo.

La expresión inmunocitoquímica fue evaluada de manera manual por 2 observadores (JM y PZ) analizando 5 campos de aumento mayor (400x) y contando el número de células con positividad nuclear. Por ende, en el caso de no haber reacción de DAB los núcleos se verán de color azul y de tener reacción se verán de color café de manera similar a lo realizado previamente (Robertson *et al.*, 2018). Esta medición se hizo en triplicado lo que entrega. Además, las mismas láminas fueron escaneadas utilizando el scanner de láminas AT2 (Leica, Alemania) y posteriormente fueron analizadas utilizando el algoritmo llamado "positive cell detection" del software Qupath (University of Edinburgh).

El resultado de las muestras fue expresado en porcentaje de expresión nuclear del receptor de vitamina D y agrupado en deciles de porcentajes y la concordancia de la expresión nuclear fue medida utilizando el coeficiente Kappa de Cohen utilizando Graphpad. El presente estudio fue aprobado por el comité de ética de la Pontificia Universidad Católica de Chile (N°200409020)

Resultados

Se obtuvo material citológico evaluable en todos los pacientes analizados. Más aún, se observó expresión inmunocitoquímica del RVD en los 5 sujetos estudiados. El resultado de la calidad de la tinción inmunocitoquímica está descrita en la tabla 1 y fue considerada de acuerdo con lo establecido como óptima en todos los casos. Ejemplos de imágenes de grupos celulares con una visión estándar se puede observar en la figura 2. El resultado pre y post analizador

de imágenes, donde se observa la capacidad de diferenciar núcleos positivos de negativos se observan en la figura 3A y figura 3B. Los resultados del análisis de la expresión del receptor de vitamina D de forma manual y automatizada están descritos en la tabla 1. Se observó un acuerdo sustancial entre los resultados obtenidos por la evaluación manual y automatizada (Kappa 0,688; SE de Kappa =0,271 y con un IC95% de 0,156 a 1,000)

Tabla 1: Calidad de la inmunocitoquímica y positividad para el RVD utilizando un análisis manual con microscopio óptico y con un análisis automatizado mediante software analizador de imágenes en los sujetos estudiados. RVD: Receptor de vitamina D. SD = desviación estándar. La positividad manual fue obtenida calculando el promedio de las mediciones por cada uno de los observadores.

Sujeto	Calidad ICQ	Positividad promedio de RVD manual (%±SD)	Positividad de RVD automatizado (%)	concordancia
1	8	28,2 ±6	20,1	Si
2	8	35,4±8	31,6	Si
3	8	23,6±12	35,3	No
4	8	36,8±4	32,8	Si
5	8	22,3±5	25,2	Si

RVD: Receptor de vitamina D. SD = desviación estándar. La positividad manual fue obtenida calculando el promedio de las mediciones por cada uno de los observadores

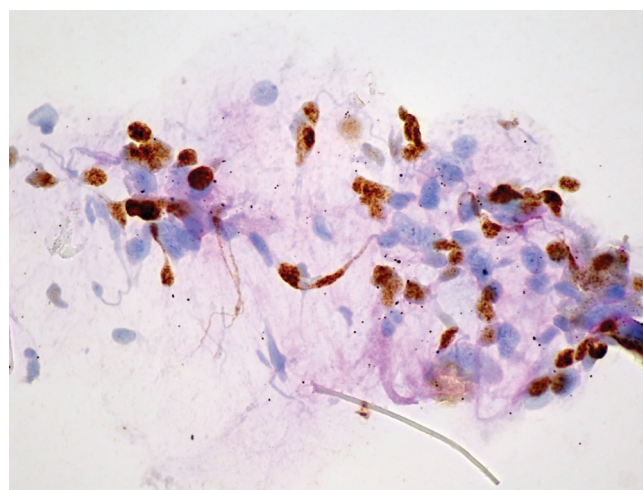


Figura 2: Características morfológicas de una muestra obtenida de un paciente con citocepillo en la cual se realizó inmunocitoquímica para RVD.

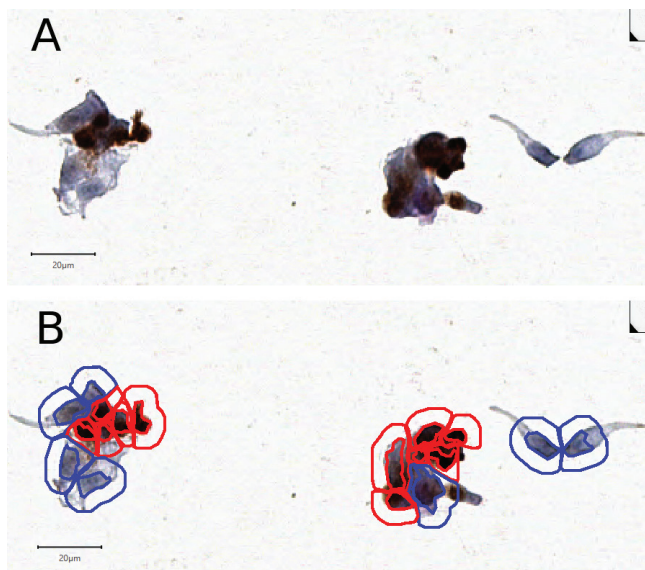


Figura 3: Caracterización de la positividad para el RVD utilizando un software analizador de imágenes. A: Imagen digitalizada de un sujeto, se observa tinción nuclear color café positiva para receptor de vitamina D (DAB, 40x). B imagen obtenida luego del análisis de imagen, mismo campo de A. En azul se puede observar el reconocimiento que realiza el software de células negativas para RVD y con rojo se realzan aquellas positivas (Figura 2B).

Discusión

En el presente estudio se describe una técnica para evaluar la expresión de antígenos por inmunocitoquímica en células de la superficie ocular de manera objetiva y reproducible utilizando herramientas comercialmente disponibles. Para lograrlo se utilizaron sincrónicamente técnicas como la CBL y la patología digital.

La CBL es un método que permite recuperar muestras de baja celularidad ya que permite la recuperación de células en una suspensión, por pocas que sean, en la lámina en forma de monocapa. Estudios en cuello uterino han mostrado que esta técnica disminuye el número de muestras inadecuadas en comparación con las técnicas de citología convencional. (Singh *et al.*, 2015). La CBL ya ha sido utilizada previamente en patología ocular donde ha permitido el análisis mediante estudios inmunocitoquímicos de procesos neoplásicos y degenerativos de la superficie ocular sin la necesidad de obtener muestras de biopsia (Hagan, 2017; Konstantopoulou *et al.*, 2018).

El ojo seco es definido en el informe TFOS DEWS II como una enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular que provoca síntomas y molestias, alteración visual e inestabilidad de la película lagrimal con daños potenciales en la superficie ocular. Va acompañada de un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular. (Craig *et al.*, 2017). Esta definición pone de manifiesto la importancia de la superficie ocular

en la estabilidad de la lágrima. Hasta ahora muchos de los trabajos se han basado en el uso de la citología de impresión ocular, la cual pese a entregar una excelente información morfológica, no permite el análisis inmunohistoquímico automatizado (Singh *et al.*, 2005) lo que aumenta la variabilidad de los resultados (Biesterfeld *et al.*, 2003). Por otro lado, la posibilidad de obtener muestras de tejido es muy escasa dado que una biopsia puede llevar a la cicatrización conjuntival y con ello aumentar las molestias del paciente. La posibilidad de poder evaluar la expresión de antígenos de la superficie ocular con una metodología que sea reproducible y objetiva permitiría estudiar el rol de diferentes factores a un relativo bajo costo. En el presente artículo hemos demostrado la posibilidad de realizar inmunocitoquímica automatizada en muestras de superficie ocular utilizando estuches comerciales disponibles lo que hace que estas técnicas puedan ser fácilmente incorporadas por otros investigadores. En particular, el presente estudio se presenta como un estudio piloto para demostrar la posibilidad de evaluar el receptor de VD en la superficie ocular, el cual cumple importantes funciones en procesos inflamatorios y degenerativos. Futuros estudios permitirán analizar la expresión del receptor de vitamina D en pacientes con EOS severo.

Tras obtener una muestra citológica con una marcación inmunocitoquímica procesada con un método automatizado, la evaluación de ésta también está sujeta a un análisis subjetivo. Con el fin de obtener un resultado final objetivo y reproducible, se recurrió a la patología digital. Esta técnica consiste en convertir una lámina citológica en un archivo computacional de imagen, el que permite trabajar con aumentos como si se estuviera trabajando con un microscopio (Zoroquiain *et al.*, 2015). Una de las grandes ventajas de la patología digital es que se puede utilizar softwares de análisis de imágenes. En la presente serie utilizamos un analizador que detecta la positividad inmunocitoquímica de un marcador nuclear. La ventaja de realizar estudios automatizados recae en la reproducibilidad y objetividad de los resultados (Biesterfeld *et al.*, 2003; Arihiro *et al.*, 2007). En el presente estudio la digitalización de láminas con el Scanner Aperio con análisis mediante el Software Qupath mostró resultados similares al conteo manual, sin embargo, se encontró un leve mayor porcentaje de células positivas. Sin embargo, esto no trajo mayormente cambios en los deciles analizados. Esto se podría deber a que, en los análisis de muestras citológicas, a diferencia de los cortes histológicos que tienen un espesor constante de 4µm, las células se montan en el portaobjetos enteras y es común ver que las células quedan sobrepuestas, creando varios planos en el eje Z. Esto es muy frecuente en preparaciones convencionales lo que dificulta mucho la digitalización ya que la mayoría de los *scanners* solo digitaliza en un plano del eje Z, generando imágenes borrosas. Con el fin

de eliminar la sobreposición es que existen técnicas como la CBL que genera teóricamente una monocapa. En la práctica, vemos que la sobreposición existe, pero minimizada. En este trabajo nos hemos percatado que cuando hay sobreposición el software no es capaz de detectar grupos sobrepuestos como células diferentes y no las cuantifica. Al no haber un sesgo de selección, el porcentaje de células positivas no cambia.

En el presente estudio observamos ciertas dificultades que no fueron medidas. Se observó que la digitalización fue muy difícil ya que como la celularidad es relativamente baja el equipo presentaba muchas dificultades para realizar el enfoque y por ende arrojaba un error de digitalización. Esto es una característica que se ha observado previamente en extendidos citológicos, donde el scanner no puede identificar el plano dentro del eje Z donde se encuentra la muestra, generando imágenes desenfocadas o anulación del proceso de digitalización (Marletta *et al.*, 2021).

En conclusión, el flujo de trabajo aquí presentado demuestra una manera objetiva y reproducible de analizar la expresión de antígenos de las enfermedades de la superficie ocular sin necesidad de obtener una biopsia de tejido. Esto favorecería el estudio de patologías como la enfermedad por ojo seco, sin producir alteraciones en la superficie ocular que por su condición ya está dañada.

Contribuciones y reconocimientos

Pablo Zoroquiain realizó las labores de redacción del documento, evaluación estadística, revisión y edición del documento, elaboración del proyecto. Javiera Meza efectuó las funciones de recolección de datos, revisión del documento, revisión de la literatura. Antonia Vieira efectuó tareas de recolección de datos y revisión del documento. Arturo Grau estuvo encargado del trabajo de recolección de datos, revisión, edición del manuscrito y elaboración del proyecto. Por otra parte, los autores no tienen ningún conflicto de interés.

Al equipo del Núcleo de Investigación en Histopatología queremos reconocerlos por su ayuda en las técnicas inmunocitoquímicas. El presente trabajo fue financiado con el proyecto de becados UC2020.

Referencias

Al-Abbadi MA. (2011). Basics of cytology. *Avicenna journal of medicine* **1**, 18–28.

Arihiro K, Umemura S, Kurosumi M, Moriya T, Oyama T, Yamashita H. & Akiyama F. (2007). Comparison of Evaluations for Hormone Receptors in Breast Carcinoma Using Two Manual and Three Automated Immunohistochemical Assays. *American Journal of Clinical Pathology*, **127**, 356–365.

Biesterfeld S, Kraus HL, Reineke T, Muys L, Mihalcea AM. & Rudlowski C. (2003). Analysis of the reliability of manual and automated immunohistochemical staining procedures. A pilot study. *Analytical and quantitative cytology and histology* **25**, 90–6.

Cennamo G, Forte R, del Prete S. & Cardone D. (2013). Scanning electron microscopy applied to impression cytology for conjunctival damage from glaucoma therapy. *Cornea* **32**, 1227–31.

Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS., Joo CK. & Stapleton F. (2017). TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *The ocular surface* **15**, 276–283.

Hagan S. (2017). Biomarkers of ocular surface disease using impression cytology. *Biomarkers in medicine* **11**, 1135–1147.

Kobayashi TK, Ueda M, Nishino T, Ishida Y, Takamura E. & Tsubota K. (1997). Cytologic evaluation of conjunctival epithelium using Cytobrush-S: value of slide preparation by ThinPrep technique. *Cytopathology: official journal of the British Society for Clinical Cytology*, **8**, 381–7.

Konstantopoulou K, Tsiambas E, Baliou E, Lazaris AC, Kavantzias N, Karameris A, et al. (2018). Deregulation of p53/survivin apoptotic markers correlated to PTEN expression in pterygium neoplastic cells. *Journal of BUON: official journal of the Balkan Union of Oncology* **23**, 826–831.

Marletta S, Treanor D, Eccher A. & Pantanowitz L. (2021). Whole-slide imaging in cytopathology: state of the art and future directions. *Diagnostic Histopathology* **27**, 425–430.

Maxwell P. & McCluggage WG. (2000). Audit and internal quality control in immunohistochemistry. *Journal of clinical pathology* **53**, 929–32.

Nelson JD. (1988). Impression cytology. *Cornea* **7**, 71–81.

Poli M, Ne Janin H, Justin V, Auxenfans C, Burillon C. & Damour, O. (2011). Keratin 13 immunostaining in corneal Impression cytology for the diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **9**,52:9411-5.

Robertson S, Stålhammar G, Darai-Ramqvist, E, Rantalainen M, Tobin NP, Bergh J. & Hartman J. (2018). Prognostic value of Ki67 analysed by cytology or histology in primary breast cancer. *J Clin Pathol*. **71**, 787–794.

Singh R, Joseph A. & Umopathy T. (2005). Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol*, **89**, 1655–1659.

Singh VB, Gupta N, Nijhawan, R, Srinivasan R, Suri V. & Rajwanshi, A. (2015). Liquid-based cytology versus conventional cytology for evaluation of cervical Pap smears: experience from the first 1000 split samples. *Indian journal of pathology & microbiology* **58**, 17–21.

Yoon SY, Bae SH, Shin YJ, Park SG, Hwang S. H, Hyon JY. & Wee WR. (2016). Low serum 25-hydroxyvitamin D levels are associated with dry eye syndrome. *PLoS ONE* **11**.

Zeppa P. (2014). Liquid-based cytology: a 25-year bridge between the pap smear and molecular cytopathology. *Acta cytologica* **58**, 519–21.

Zoroquiain P, Logan P, Bravo-Filho V, Vila N, Jabbour S, Orellana ME. & Burnier MN. (2015). Diagnosing Pathological Prognostic Factors in Retinoblastoma: Correlation between Traditional Microscopy and Digital Slides. *Ocular oncology and pathology* **1**, 259–65.