

TEMA 15 TÉCNICAS CITOLÓGICAS.

1. INTRODUCCION.

La citología, permite examinar grupos celulares de diferentes partes del organismo, convirtiéndola en una herramienta diagnóstica muy importante para el clínico.

La colección de muestras citológicas es muy sencilla, económica y segura para el paciente.

En general existen 2 grandes métodos de preparación de muestras dependiendo de la cantidad de líquido que presenten, de esta manera tenemos:

- **Método directo:** se emplea cuando la muestra es rica en células, es decir, presenta muy poca cantidad de líquido por lo que el material colectado se coloca directamente sobre un portaobjetos para realizar el frotis, como ejemplos tenemos la punción aspiración con aguja fina, los raspados e improntas.
- **Método indirecto:** en caso de que las muestras obtenidas sean líquidas y para realizar el frotis habrá que concentrar la población celular mediante centrifugación, ejemplos son la orina y líquidos procedentes de lavado.

Los **estudios citológicos** pueden agruparse en 4 grandes categorías:

- Investigación de las células atípicas en las secreciones líquidas o derrames varios.
- Investigación de células atípicas después de un escobillado o raspado con instrumentos diversos de una mucosa o una lesión de piel.
- Citodiagnóstico después de una cito punción, es decir, después de una punción hecha con aguja fina para recoger líquido tisular recogiendo células en suspensión y no un fragmento del tejido.
- Citodiagnóstico de pieza operatoria no fijada por la técnica de los frotis o de las impresiones.

Los 2 primeros grupos forman parte de la citología de detección precoz o exfoliativa basada en la investigación de células anormales, a veces poco numerosas y muy alteradas que requieren del citólogo paciencia, atención y gran experiencia.

Los grupos 3 y 4 permiten en cambio el estudio de verdaderas poblaciones de células, con frecuencia numerosas y no alteradas, en las que se pueden observar las modificaciones morfológicas más o menos marcadas, la densidad, la cohesión, la diferenciación y la reacción celular del estroma avocando en numerosos casos a un verdadero citodiagnóstico inmediato y al establecimiento de un índice citológico de malignidad que puede intervenir en el pronóstico y las indicaciones terapéuticas de los tumores.

2. PREPARACION DE LA MUESTRA PARA EL ESTUDIO CITOLOGICO.

2. a. Tipos de muestras según su procedencia.

- Muestras procedentes de líquidos fisiológicos como por ejemplo sangre, orina líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido prostático, contenido gástrico
- Muestras procedentes de líquidos y fluidos patológicos, líquido de derrames, pleural, peritoneal, contenido de un quiste, expectoración bronquial, líquido procedente del lavado de esófago, estómago, colon. Y las procedentes de cito punciones como por ejemplo la punción de médula ósea, la punción hepática
- Muestras procedentes de frotis legrados como por ejemplo el frotis vaginal y el cepillado bronquial.
- Piezas operatorias.

2. b. Preparación general de la muestra.

La totalidad de las muestras que recibe el laboratorio de citología se puede separar en 3 grandes grupos:

- **Frotis fijados:** lo constituyen aquellos frotis que han sido extendidos y fijados por el clínico inmediatamente después de la obtención de la muestra. Deben llegar al laboratorio adecuadamente identificadas con el nombre del paciente y uniformemente extendidos, normalmente se fijan con cito spray, estos frotis que ya llegan al laboratorio fijados están listos para proceder a la tinción rutinaria que se suele realizar al de papanicolau, ejemplos son las secreciones de mama, las muestras procedentes de cepillados y otros tipos de muestras citológicas.
- **Frotis secados al aire:** son frotis extendidos por el clínico inmediatamente después de la obtención de la muestra y secados al aire, estos frotis no fijados van destinados a ser teñidos con la tinción de Romanowsky.
- **Muestras no fijadas ni secadas al aire:** este tercer grupo incluye las muestras frescas que llegan a laboratorio generalmente en forma de fluido líquido o semisólido, requiere mayor dedicación y habilidad.

El procesamiento de estas muestras puede ser por:

♦ **Extensión directa:** es la técnica más rudimentaria especialmente útil para muestras mucosas (esputo, líquido de aspecto mucoso, aspirado bronquial). Los pasos a seguir son:

- Identificar dos o más portas con el nombre o número de orden del enfermo.
- Observar la muestra y anotar su aspecto microscópico.
- Se seleccionan aquellas partes de la muestra que son representativas de la misma y ó las de apariencia patológica.
- Se deben colocar las partes seleccionadas sobre un porta y extenderlas con otro hasta conseguir frotis uniformes, también se puede hacer con el asa de platino previamente esterilizada.
- Los portas preparados pueden introducirse en la solución fijadora (caso de la tinción de Papanicolau) o se deja secar al aire (si se van a teñir con Romanowsky).

♦ Otra forma es mediante **centrifugación:** es una técnica útil para muestras seromucosas y grandes volúmenes de líquidos serosos (líquido quístico y procedentes de lavados).

El método consiste en:

- Anotar el aspecto mucoso de la muestra.
 - Agitar la muestra para después resuspender las células que contiene y verter igual cantidad en dos tubos de centrifuga.
 - Se centrifuga a una velocidad aproximada de 2000rpm, durante 5 minutos, una vez centrifugado se decanta el sobrenadante, mezclar el sedimento con unas gotas de sobrenadante para resuspender las células y depositar con una pipeta pasteur una gota de este sedimento sobre un porta previamente identificado.
 - Realizar una extensión directa con esta parte de la muestra o citocentrifugarla.
 - Fijar rápidamente con la solución fijadora.
- ♦ **Citocentrifugación:** esta técnica se hace con una centrifuga llamada citospyn. Pequeñas alícuotas (cantidades iguales) de muestra líquida se hacen girar lateralmente sobre un porta para formar una monocapa de células. Es una técnica de gran utilidad y rapidez para la preparación de muestras líquidas.
- ♦ **Filtros de membrana:** constituyen una técnica de concentración de células en muestras líquidas de baja densidad celular (orina) ya que rescatan mayor número de células que la citocentrifugación. Estos filtros son membranas porosas de plástico cuyos poros van de 10 – 8

micras. Los más utilizados son:

- ◊ Tipo millipore (de acetato de celulosa).
- ◊ Filtros nucleopore (de policarbonato).

Se realiza una filtración con la muestra y posteriormente se examina el filtro.

En citología se usan sobre todo los filtros SM, cuyos poros van de 1 – 2 a 5 micras, cada cm² de superficie contiene millones de poros capilares que ocupan más del 80 % del volumen total. Este filtrado no necesita ningún fraccionamiento del líquido y no hay que extraer el sedimento y colocarlo sobre el portaobjetos; ello permite una estimación cuantitativa de las células cancerosas en un volumen de líquido dado pero en cambio pueden haber superposiciones celulares molestas y la membrana filtrante experimentar una desecación rápida.

El líquido se filtra a la presión atmosférica o a una presión negativa de 25 mm de mercurio, una presión negativa más fuerte no es aconsejable ya que podría deformar las células.

La fijación debe hacerse únicamente con alcohol etílico de 95° pues el alcohol absoluto, el éter o la acetona provocarían la disolución del filtro.

El filtro con la muestra sujeto con una pinza se coloca sobre un portaobjetos y se tiñe.

2. c Ejemplos de preparación de algunas muestras.

ORINA

- Recoger aproximadamente 100 ml de orina en un recipiente estéril. Algunos prefieren la 1ª orina de la mañana pero otros aconsejan hacer practicar ejercicios al enfermo especialmente en caso de tumor vesical ya que la agitación de la orina contra la pared provoca una descamación importante.

Si se sospecha de un tumor de uréter, pelvis renal o riñón es preferible recoger la orina por cateterismo uretral.

- Centrifugar unos 10 ml a 1500 rpm durante 5 minutos, seguidamente se realiza un primer examen del sedimento con el fin de apreciar la cantidad de cristales, si hay muchos se eliminará ajustando el pH; si hay muchos hematíes hay que hemolizarlos con acético al 5%.
- Rechazar el líquido sobrante y se aspira el sedimento con una pipeta pasteur, si el sedimento es escaso hay que usar una técnica de concentración como la citocentrifugación.
- Extender el sedimento sobre un porta preferiblemente albuminado.
- Fijar inmediatamente durante 15 segundos.
- Proceder a la técnica de tinción.

SANGRE

Todos los métodos se basan en la eliminación de los hematíes por hemólisis, por sedimentación acelerada o por centrifugación fraccionada.

Se practica mucho la técnica de Seal, que se basa en la diferente densidad de las células cancerígenas y los linfocitos por una parte y los eritrocitos y PMN por otra.

Se usa como medio de separación una mezcla de diferentes siliconas de densidad 1,075 las células cancerosas y linfocitos se acumulan en la superficie de la silicona y los PMN y eritrocitos se acumulan por debajo de la silicona.

SECRECIONES PROSTÁTICAS.

Se obtienen por masaje de la próstata en el polo inferior ya que esta región es frecuentemente el lugar de predilección del desarrollo del cáncer.

Hay que hacer ligera presión con el dedo en el polo inferior y abstenerse de apretar las vesículas seminales a fin de evitar la descamación de células de este origen. Terminado el masaje se hará presión sobre la uretra hasta el orificio del meato uretral para conducir las secreciones.

Una vez recogidas se depositan sobre los portas previamente impregnados de albúmina de Mayer para asegurar la adhesión de las células. Cada gota es comprimida entre 2 portas que son separados por deslizamiento y fijados inmediatamente.

DERRAMES PLEIRALES ASCÍTICOS O PERICÁRDICOS.

Deben recogerse en frascos que contengan anticongelante, se centrifuga la muestra a 2000 rpm durante 10 minutos y se extiende el sedimento sobre dos portas, los cuales serán teñidos uno con la técnica de Papanicolau y otro con la técnica de May Grunwald Giemsa.

LIQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.

Es centrifugado y el sedimento es extendido y teñido.

• FIJACIÓN.

Su principal objetivo es conservar el detalle morfológico de las células en el estado lo más parecido posible a la célula en el tejido vivo. Esto se consigue con fijadores que deshidratan las células, inactivan los enzimas autolíticos, coagulan las proteínas y penetran en la membrana celular.

Es un paso indispensable si no queremos una extensión deteriorada u oxidada que no tome bien los colorantes y que no permita una correcta lectura cuando se estudia al microscopio.

La fijación debe realizarse de inmediato a la toma y la extensión del material citológico cuando la preparación esté todavía húmeda.

No existe el fijador perfecto, todos causan contracción celular y cada uno actúa con una velocidad diferente.

• Tipos de Fijadores.

- **Fijadores alcohólicos:** son la mayoría de los fijadores usados en citología, actúan deshidratando las células y coagulando las proteínas, su mayor ventaja es que son fijadores rápidos y su desventaja es que son volátiles e inflamables.

Los más usados son:

- ♦ Etanol 96 %: es el fijador de elección cuando la tinción posterior es la de Papanicolau. Produce resultados muy satisfactorios.

La extensión se pone en un baño de etanol al 96 % durante 15 – 20 minutos aunque puede conservarse indefinidamente siempre que el baño este tapado en el frigorífico.

Se le puede añadir ácido acético al 2'5 % con lo que se lisan los hematíes, por ello en las preparaciones en que se sospecha existencia de una buena solución para evitar la dificultad que representaría una existencia masiva

de hematíes recubriendo a los elementos celulares motivo de estudio. Esta mezcla no debe realizarse en casos en que se desee realizar una valoración citológica hormonal ya que se produce una falsa eosinofilia que puede llevar a confusión al realizar el recuento para el índice de eosinofilia.

- ◆ Metanol al 100 %.
- ◆ Propanol e isopropanol al 90 %.
- ◆ Mezcla de alcohol – éter a partes iguales: da unos excelentes resultados sobre todo tipo de materiales pero en la actualidad está en desuso por las peligrosas características físico – químicas del éter que es muy inflamable y volátil.

- **Líquido de Carnoy:** formado por etílico puro, cloroformo y ácido acético.
- **Citospray:** es un fijador en forma de aerosol. Es un producto comercial que contiene una mezcla de alcohol isopropílico y una materia plástica, el polietilglicol, protectora de la desecación.

Con este spray se pulveriza toda la superficie del porta de forma rápida y sencilla, se debe aplicar a 25 – 30 cm. de distancia de la muestra. Se aplica al material citológico inmediatamente después de su extensión en el porta.

Es muy usado por su simplicidad y buenos resultados, se recomienda sobre todo cuando las extensiones deben ser enviadas a otros laboratorios para su tinción (extensiones ginecológicas, cepillados orofaríngeos, esofágicos, bronquiales...). Por el contrario debe evitarse su uso en extendidos de materiales líquidos realizados en el propio laboratorio y en los hemáticos para no provocar agrupamientos de los hematíes.

Antes de teñir debe extraerse el citospray mediante pases sucesivos de 5 – 10 minutos cada uno por etanol al 96 %.

Alternativamente y dado que el líquido del aerosol es soluble en agua, al extensión puede ser teñida inmediatamente después de rociarla, con lo que se acorta el tiempo total del proceso.

El secado al aire sin fijar se emplea cuando se van a realizar ciertas tinciones como por ejemplo la de May Grunwald Giemsa, con esta tinción no se ve bien la cromatina nuclear y se usa en citologías hematológicas.

• ASPECTOS BÁSICOS SOBRE LA INTERPRETACIÓN DE EXTENSIONES EN CITOLOGÍA.

Para la adecuada interpretación se requiere:

- Puesta a punto del microscopio.
- Detenida lectura de los datos aportados en la hoja de petición.
- Identificar el origen de la muestra cuando esta no esté consignada.
- Examinar el porta detenidamente y en toda su extensión.
- Señalar los hallazgos de interés: aspecto general del extendido, incluyendo la sustancia de fondo y la disposición de las células (aisladas, agrupadas), el tamaño y forma celular, al coloración adquirida por la célula, estructuras, cantidad y relación núcleo – citoplasma y características del núcleo (número, forma, tamaño, membrana, situación y relación con el nucleolo).

• TÉCNICAS DE COLORACIÓN.

Los principales objetivos de la tinción citológica son:

- Visualización óptima de las células.
- Diferenciación de los constituyentes celulares.
- Destacar lo más posible la estructura nuclear y suavemente el citoplasma, solo para indicar si es

eosinófilo o basófilo.

Para ello se emplean distintos colorantes, si bien, los fundamentales son la Hematoxilina que tiñe bien los núcleos y Eosina para teñir citoplasmas. Pero hay muchos más colorantes como el Orange G, verde luz, Fucsina

Un colorante debe colorear las células, no decolorarse con los disolventes habitualmente empleados y decolorarse mínimamente tras largo tiempo de almacenamiento.

En citología es muy importante la calidad de la tinción del núcleo ya que la distinción entre células benignas y malignas se basa en la morfología nuclear.

La tinción del citoplasma proporciona información adicional respecto al origen y maduración de la célula.

Hay muchos métodos de tinción, el más recomendable y usado en citología exfoliativa es el de Papanicolau.

- **Tipos de tinciones.**

- **Tinción de Papanicolau:** está particularmente indicada para el estudio de la queratinización de las células memalpigianas patológicas. Fue introducida por Papanicolau en 1925, es una tinción diferencial o policroma.

Usa tres colorantes básicos (o mezclas), el colorante nuclear en la hematoxilina de Harris que produce una impregnación excelente de la estructura cromatinica y también usa mezclas de color citoplasmático como el naranja G, verde luz, pardo Brismark, eosina

La hematoxilina de Harris se usa sin acidificar con ácido acético y proporciona un color azul oscuro a los núcleos.

El naranja G junto con la solución eosina alcohólica (EA) constituye el colorante del citoplasma. Aunque la solución puede realizarse en el laboratorio se encuentra comercializada bajo el nombre de OG – G, tiñe de naranja los citoplasmas celulares que contienen queratina como por ejemplo las células del carcinoma epidermoide.

Las soluciones EA además de este colorante contiene verde luz y pardo Bismark.

Comercialmente se encuentran ya diluidos constituyendo las mezclas EA – 36, EA – SO y EA – &%, que si bien proporciona buenos resultados para cualquier muestra, en determinadas situaciones es recomendable el uso de alguna fórmula en particular. Este es el caso de algunas muestras ginecológicas con frecuencia gruesas donde es preferible emplear EA – 65 ya que al tener verde luz no colorea tan intensamente el fondo de la preparación, además el empleo de esta mezcla facilita la distinción entre adenocarcinoma de cerviz (citoplasma rosáceo) y adenocarcinoma endometrial (citoplasma azulado).

Procedimiento técnico en una fotocopia.

Un método alternativo mas adecuado para teñir extensiones urinarias y de lavados gástricos consiste en el empleo de agua destilada durante 10 inmersiones sucesivas rápidas y como colorante nuclear durante 45 segundos de Hematoxilina de Harris acidificada con acético y la omisión del lavado en solución clorhídrica.

Este procedimiento tiene la ventaja de que requiere menos tiempo y la desventaja de que la hematoxilina impregna algo mas estructuras basófilas no nucleares haciendo los citoplasmas menos transparentes.

- **Tinción de Shorr:**

Es una técnica de coloración de excelentes resultados en la evaluación hormonal de la citología vaginal. Permite distinguir con gran facilidad las células queratinizadas (color naranja brillante) de las no queratinizadas (intermedias y parabasales que se tiñen de color azul verdoso).

Los núcleos se tiñen de azul nunca tan claramente como la técnica de Papanicolau.

Otros componentes de la muestra como leucocitos hematíes, bacterias, espermatozoides se distinguen satisfactoriamente.

También puede utilizarse para detectar cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos que se tiñen de color rojo vivo.

- **Tinción de May – Grundwald Giemsa**

Esta coloración también denominada Pappenheim se realiza sobre material secado al aire en preparaciones de citología por punción aspiración.

Consiste en una combinación de dos coloraciones sucesivas, la de May – Grundwald y la de Giemsa que emplea diversas variantes de eosinato de azur o de metileno para producir una coloración policroma más brillante que la obtenida con cada uno.

Además presenta algunas ventajas sobre los métodos clásicos de Papanicolau y hematoxilina – eosina para la percepción de los finos detalles citológicos sobre el diagnóstico de malignidad.

Esta tinción resalta detalles del citoplasma como la presencia de vacuolas, gránulos o mucina y los distintos componentes del fondo como la matriz mixoide, el colágeno, la mucina o el coloide.

- **Coloraciones extemporáneas:**

Son coloraciones rápidas, el empleo de la citología para el diagnóstico peri operatorio necesita coloraciones rápidas, ejemplos:

- ♦ *Coloración de Azul de Unna:* en 15 segundos proporciona una coloración legible. Es monocroma pero muestra suficientemente la morfología celular: la anisonucleosis, las alteraciones nucleares para permitir un diagnóstico exacto.
- ♦ *Coloración de Giemsa:* utiliza la secuencia siguiente: alcohol metílico puro de 1 – 2 minutos y seguidamente colorante Giemsa 2 minutos.
- ♦ *Coloraciones vitales con rojo neutro al 1 / 1000 – 1/ 500.*
- ♦ *coloración vital con Azul de metileno al 1 %.*

- **Coloraciones especiales: Tinción con anaranjado de acridina.**

Las técnicas histoquímicas pueden ser aplicadas a la citología para investigación del glucógeno por el carmín de Best o el yodo, la coloración de mucopolisacáridos, las fosfatasas, las grasas, los ácidos desoxiribonucleicos y los ribonucleicos; aquí veremos la coloración que utiliza el anaranjado de acridina y la microscopia de fluorescencia.

Técnica de coloración con el anaranjado de acridina en fluorescencia:

Se basa en la fluorescencia roja que da el citoplasma de las células cancerosas a causa de su riqueza en ADN.

Puede practicarse sobre material fresco y fijado.

Procedimiento Técnico:

Se separa una solución madre de anaranjado de acridina al 0'1 % en agua destilada. Esta solución se conserva indefinidamente; para la coloración se diluye una parte de dicha solución en un tampón de fosfato 1/15 molar (M).

Es necesario producir una diferenciación de la fluorescencia del ARN, esto se realiza con una disolución acuosa de cloruro de Ca.

La fijación se debe realizar inmediatamente después de la extensión durante 5 – 10 minutos en alcohol o mezcla de alcohol – éter, debe evitarse la fijación con formol.

La secuencia de la tinción consiste en:

- Hidratación del frotis con pases de alcohol.
- Aplicación del colorante de anaranjado de acridina.
- Lavado con solución de tampón fosfato.
- diferenciación de los núcleos con la solución de cloruro cálcico hasta que los núcleos de los diversos tipos aparezcan de una coloración verde clara transparente.
- Las preparaciones son lavadas nuevamente con tampón fosfato y montadas en húmedo bajo un cubre.
- Observar al microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS:

Las células aparecen destacadas con formas claras y brillantes sobre un fondo oscuro.

Las tonalidades son distintas según la estructura celular, pasando desde verde por el amarillo, naranja y hasta el rojo dependiendo del contenido en ADN y ARN.

En general se puede decir que la **coloración roja** es indicadora de células atípicas malignas, en extensiones de células superficiales que son **verdosas** o intermedias que son amarillas o verdes.

Después del examen las preparaciones pueden ser decoloradas pasándolas durante unos minutos por alcohol de 50° y recoloreadas pasándolas por cualquier otro método como Papanicolau.

Después de la coloración pueden también conservarse indefinidamente en el fijador para recolorearlas más tarde.