

Introducción

La citología es una pieza muy importante para el diagnóstico precoz de diversas patologías y también es un método de estudio que conlleva muy poca invasión para el paciente; esto hace que sea un método de estudio muy atractivo y muy utilizado en distintos servicios dentro de un mismo hospital o clínica (ginecología, urología, neurología, etc.). La citología consiste en el estudio de células aisladas, descamadas de superficies epiteliales o extraídas de regiones u órganos mediante diversas técnicas clínicas para poder interpretar lesiones existentes en ellos.

1.- Materiales y Equipos Básicos para el Procesamiento Citológico.

- Citocentrífugas de diferentes tamaños y velocidades
- Teñidor.
- Montador.
- Campana extractora de seguridad.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Cubetas de cristal y plástico, diferentes tamaños con tapa Eppendorf (para citobloque).
- Pinzas sin dientes y tijeras.
- Material volumétrico.
- Pipetas Pasteur de diferentes medidas.
- Moldes para citocentrífuga o citoprocesadores.
- Etanol diferentes graduaciones (50°, 70°, 96° y absoluto)
- Metanol.
- Hematoxilina Harris. Orange G.
- Eosina alcohólica (EA-50).
- Reactivos 1 (naranja) y 2 (azul) para técnica de Diff-Quick.
- Acetona.
- Tinciones citoquímicas.
- Casetes (para citobloque).
- Citogel (para citobloque).
- Formol (para citobloque).

2.- Procesado General del Material Citológico.

Dependiendo del tipo de muestra y de la finalidad diagnóstica que se busque de ella, es posible agrupar los procesos en tres grandes grupos.

2.1.- Citología exfoliativa corporal.

La citología exfoliativa tiene como objeto identificar las células del cuerpo humano desprendidas de la epidermis, los epitelios que revisten estructuras orgánicas abiertas al exterior y el mesotelio que tapiza las cavidades corporales. En este grupo se engloban todas las muestras extraídas de forma no invasiva. De forma genérica las células pueden obtenerse:

.- Por exfoliación forzada mediante frotamiento o raspado con cepillos, torundas u otros dispositivos que obtengan células descamadas naturalmente en la epidermis y los epitelios que son continuación de la misma (citologías cérvico-vaginales, de vulva, de endometrio, cepillado de mucosa oral, de mucosa bronquial); también las muestras obtenidas de secreciones naturales del cuerpo (secreciones de pezón, de otros orificios naturales o no naturales corporales).

.- Aprovechando líquidos que transportan elementos descamados de forma espontánea (esputos, orina...).

.- Mediante instrumentos de exploración o punción, que extraen el componente líquido con células en suspensión procedente de zonas orgánicas (tracto respiratorio, gastrointestinal, cavidades serosas). Las muestras obtenidas mediante PAAF (punción aspiración con aguja fina) también se procesan con los mismos procedimientos. El material obtenido mediante PAAF puede provenir de cualquier zona del cuerpo susceptible de ser pinchada sin mayor contraindicación médica. Las muestras superficiales se hacen mediante la vista y el tacto, las PAAF de órganos profundos han de hacerse mediante control ecográfico y manos muy experimentadas.

Las muestras se reciben en anatomía patológica extendidas sobre un portaobjetos que puede estar seco al aire, conservado con fijadores (citoespray) o conservado sumergido en alcohol de 96°. La manera de procesar estas muestras dependerá de cómo se reciban en el laboratorio y de la tinción que se vaya a hacer. Hay que recordar que es necesario que nos comuniquen si las muestras recibidas en portaobjetos están secas al aire o conservadas en fijador, a simple vista es muy difícil saberlo y podemos tener problemas en su procesado.

2.2.- Líquidos corporales y orina.

Los líquidos corporales más estudiados en el laboratorio de citología son líquido pleural, líquido peritoneal o ascítico, líquido pericárdico, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido sinovial y orina. Aunque estos son los más estudiados, se puede estudiar cualquier líquido del cuerpo del que se necesiten estudiar sus células.

El método de estudio de estas muestras es el centrifugado. Dependiendo de la muestra, se elegirá el tipo de centrífuga y su programa más adecuado.

Las centrífugas más utilizadas son las tres siguientes:

.- **Centrífuga de decantación:** es un aparato de gran tamaño que se utiliza para concentrar las células de muestras líquidas con grandes volúmenes mediante la fuerza centrífuga y así poder separarlas del medio líquido. Esta máquina se utiliza como paso previo, ya que sirve para preparar estas muestras para su procesado. Dependiendo de la cantidad de material obtenido después de la decantación se seguirá un procedimiento u otro; si se observa que el material obtenido es denso y rico en celularidad se procederá a hacer un citobloque; si por el contrario se obtiene un material más líquido, se extraerá y se diluirá en 1 ml de PBS para centrifugarlo de nuevo en una centrífuga tipo *Cytospin*.

.- **Citocentrífuga:** es un aparato de menor tamaño que la centrífuga de decantación y que se utiliza para aglutinar las células de un líquido, con un volumen no superior a 2 ml, sobre un portaobjetos. Este tipo de centrífuga emplea unos recipientes especiales (llamados "citocámaras") en los cuales se coloca un portaobjetos. Estas citocámaras poseen una apertura por donde se introduce el líquido. Acto seguido se coloca el molde cerrado con el portaobjetos y la muestra líquida en el aparato y se centrifuga; así se obtendrá un portaobjetos con una muestra de las células que porta el líquido adheridas a él. El material sobrante y las citocámaras se desechan.

.- **Citología en medio líquido:** es un proceso de mayor calidad que los anteriores. Consiste en la absorción de una muestra a través de un filtro que retiene las células hasta que se satura y las deposita sobre un portaobjetos tratado específicamente para tal fin. Así se obtiene una muestra con una mayor calidad y limpieza. Es un procedimiento que cada vez se utiliza más por sus ventajas frente a la citología convencional, pero que no se ha llegado a implantar completamente debido a su alto coste.

Este tipo de procesado de muestras se puede utilizar para todo tipo de líquidos, aunque requiere un procesamiento previo. Este procesamiento previo dependerá de las especificaciones técnicas del aparato y de los productos. El portaobjetos con material que se obtiene después de la centrifugación ha de sumergirse en alcohol de 96° durante al menos 15 minutos para que se produzca la fijación de las células sobre el cristal y que estas no se desprendan durante el proceso de tinción.

Es importante recordar que la velocidad y el tiempo de centrifugado del líquido dependen de la viscosidad y de su celularidad, y que en ningún caso deben ser elevadas para que no se produzca la lisis celular.

2.3.- Vías respiratorias.

La citología de vías respiratorias es un tipo de citología exfoliativa. Se puede obtener de varias maneras, dependiendo del tipo de patología que se quiera estudiar.

.- **Espujo:** consiste en material obtenido mediante expectoración del paciente (tanto espontánea como inducida). Este tipo de muestra se recibe en fresco. Para su procesado se toma una pequeña muestra, se deposita sobre un portaobjetos y se realiza una extensión (lo más fina posible) con ayuda de otro portaobjetos. Esta operación se repite hasta obtener un número significativo de cristales que represente la totalidad de la muestra. Una vez realizada la extensión hay que sumergir el cristal un mínimo de 15 minutos para la fijación de la muestra en alcohol de 96° antes de la tinción. Las muestras de esputo siempre han de ser manipuladas en un medio seguro ya que pueden contener patógenos respiratorios transmisibles al personal que está procesando la muestra (p. ej., tuberculosis). Han de realizarse siempre bajo campana extractora.

.- **Lavado broncoalveolar (BAL):** el lavado broncoalveolar o bronquial es una técnica que consiste en la inyección de una cantidad variable de suero salino que "lava" el segmento pulmonar y que posteriormente se recoge por medio de aspiración. Esta muestra está constituida por material mucho menos denso que el esputo. Su procesamiento consiste en la centrifugación del material obtenido en la centrífuga de decantación, se desecha el material sobrenadante y se diluye el material restante en 1 ml de PBS. La dilución obtenida se centrifuga en la centrífuga tipo *Cytospin* a 500 rpm durante 10 minutos, obteniendo así un portaobjetos con las células adheridas a él, que se debe sumergir en alcohol de 96° durante 15 minutos como mínimo antes de la tinción.

.- **Aspirado broncoalveolar (BAS):** al mismo tiempo que se realiza una broncoscopia se aspira material directamente del árbol bronquial. Este material es espeso y denso y su procesamiento es igual que el del esputo. En caso de que el material no sea de una consistencia tan densa y espesa el procedimiento para su proceso es igual que el de lavado bronquial.

3.- Fundamento, Reactivos y Protocolos de las diferentes Técnicas de Tinción.

El procesamiento de la muestra consiste en tres fases sucesivas: extensión, fijación y tinción.

3.1.- Técnicas rutinarias.

Las técnicas más utilizadas para la tinción de citologías en el laboratorio son las siguientes:

.- **Papanicolaou:** es una de las técnicas más utilizadas, ya que permite ver una gran cantidad de detalles citológicos sobre los que se basa el diagnóstico. Es una tinción diferencial y policroma. Utiliza la Hematoxilina como colorante nuclear y diversas mezclas de colorantes citoplasmáticos como el naranja G, la eosina, el verde luz SF y el pardo Bismark. Esta técnica se utiliza para teñir cualquier tipo de muestra citológica. Los colorantes utilizados son:

.- **Hematoxilina:** se utiliza como colorante nuclear proporcionando un color azul oscuro a las estructuras nucleares. La más utilizada es la hematoxilina de Harris. La coloración rosada, rojiza o anaranjada que obtienen los nucleolos no se debe a la hematoxilina, sino a la eosina utilizada como colorante citoplasmático.

.- **Orange G:** junto a la EA, constituye el tándem de reactivos que más se utilizan para la tinción del citoplasma. Este compuesto tiñe de color naranja los citoplasmas de las células que contienen queratina (como las células de los carcinomas epidermoides).

.- **Soluciones de Eosina Alcohólica (EA):** Es, junto al Orange G, el responsable de la tinción del citoplasma celular. Además de eosina, contienen cantidades variables de verde luz y pardo Bismark. Comercialmente se encuentran ya diluidas constituyendo las mezclas EA-36, EA-50 y EA-65 que proporcionan buenos resultados para cualquier muestra. En determinadas muestras es recomendable elegir una de esas mezclas, así es preferible usar EA-65 para muestras ginecológicas ya que al contener la mitad de verde claro que las otras fórmulas, no colorea tan intensamente el fondo de la preparación. Además, el empleo de esta mezcla facilita la distinción entre adenocarcinoma de cérvix (citoplasmas rosados) y adenocarcinoma endometrial (citoplasmas azulados). La EA-50 es la solución de eosina alcohólica más utilizada.

Las preparaciones previamente fijadas pasan a:

- Agua corriente: 3 min
- Hematoxilina de Harris: 3 min
- Agua corriente: Lavar durante 2 min
- Alcohol 96°: 1 min
- Orange G: 1 min
- Alcohol 70°: 15 inmersiones sucesivas (X 2)
- Alcohol 96°: 15 inmersiones sucesivas
- EA-50: 5 min
- Alcohol 96°: 15 inmersiones sucesivas (X 3)
- Alcohol absoluto: 15 inmersiones sucesivas (X 2)
- Xilol: 15 inmersiones sucesivas (X 2)
- Montaje

Para que los reactivos se mantengan limpios más tiempo se puede escurrir sobre papel de filtro las extensiones antes de pasarlas al siguiente reactivo. No hay que olvidar renovar una

vez por semana todas las soluciones de la batería de tinción para que la coloración celular sea óptima. Los Resultados que se obtienen con esta tinción son:

- Núcleos: azul
- Citoplasmas de células queratinizadas: rojo-anaranjado
- Citoplasmas de células secretoras o epitelio monoestratificado: verde suave
- Citoplasmas de epitelio poliestratificado: de verde suave a rosa

.- May-Grunwald-Giemsa: La utilizan la mayor parte de los citólogos que estudian preparaciones de citología por punción-aspiración (PAAF). Consiste en la combinación de dos coloraciones sucesivas, la de May-Grünwald y la de Giemsa. Esta técnica presenta algunas ventajas con respecto a los métodos clásicos de PAP y Hematoxilina-eosina para la percepción de los finos detalles citológicos sobre los que se sustentan el diagnóstico de algunas patologías (Esta tinción resalta detalles del citoplasma como la mucina y los distintos componentes del fondo, como el colágeno). Los Resultados que se obtienen con esta tinción son:

- Gránulos neutrófilos: rosa
- Gránulos eosinófilos : Marrón rojizo
- Gránulos basófilos: púrpura
- Nucleolos: rosas
- Eritrocitos maduros: naranja, rosado
- Núcleos celulares: azul violáceo
- Citoplasma: azul claro a rosa.

.- Diff-Quick: esta técnica se realiza sobre extensiones secadas al aire. La técnica consiste en la combinación de dos coloraciones sucesivas. Esta tinción resalta detalles celulares y los distintos componentes del fondo como el colágeno, la mucina o el coloide. En la actualidad se utilizan dos colorantes comerciales: colorante I (naranja) y colorante II (azul) que nos proporcionan las mismas tonalidades cromáticas que con la técnica de May-Grünwald-Giemsa.

Las muestras, una vez secas completamente, pasan a:

- Metanol: 15 segundos
- Reactivo I (naranja): 30 segundos
- Reactivo II (azul): 45 segundos
- Agua corriente: Lavar con abundante agua Si la coloración no es satisfactoria, la tinción puede volver a repetirse sin necesidad de decolorarla muestra, sumergiríamos el cristal de nuevo en el reactivo I o II y continuaríamos el proceso
- Secar al aire: el tiempo que sea necesario
- Xilol: 15 inmersiones sucesivas

- Montaje

Para que los reactivos se mantengan limpios más tiempo se puede escurrir sobre papel de filtro las extensiones antes de pasarlas al siguiente reactivo. Después de realizar esta técnica sobre una citología sería posible realizar la técnica de Papanicolaou sobre esta sin necesidad de decolorarla previamente.

.- Hematoxilina-eosina: esta técnica es muy utilizada no solo en citología, sino también en histología (llegando a ser la tinción más utilizada para esta última). Consta de dos partes: la tinción celular y la tinción citoplasmática. Existen múltiples variantes, según el tipo de hematoxilina que se utilice.

Hematoxilina: existen varios tipos; las más utilizadas son la de Harris (se utiliza si la muestra se seca al aire) y la de Carazzi (si la muestra se fija en alcohol de 96°). Colorea el núcleo celular confiriéndole un color azul-azul oscuro.

Eosina: es el colorante de contraste. Colorea el citoplasma celular en tonos rosáceos o anaranjados.

Si la muestra se recibe secada al aire:

- Hematoxilina de Harris: 1 min
- Agua corriente: Lavar en abundante agua
- Eosina: 10 inmersiones sucesivas
- Alcohol 96°: 15 inmersiones sucesivas (X 2)
- Alcohol absoluto: 15 inmersiones sucesivas (X 2)
- Xilol :15 inmersiones sucesivas (X 2)
- Montaje

Si la muestra se recibe fijada en alcohol de 96°:

- Agua corriente: Lavar en abundante agua
- Hematoxilina de Carazzi: 15 min
- Agua corriente: 15 min
- Eosina: 10 inmersiones sucesivas
- Alcohol 96° 15 inmersiones sucesivas (X 2)
- Alcohol absoluto 15 inmersiones sucesivas (X 2)
- Xilol 15 inmersiones sucesivas (X 2)
- Montaje

Para que los reactivos se mantengan limpios más tiempo se puede escurrir sobre papel de filtro las extensiones antes de pasarlas al siguiente reactivo.

3.2.- Técnicas citoquímicas para determinadas patologías.

Además de las técnicas de rutina, existe una variedad enorme de técnicas complementarias para las distintas patologías. Las más utilizadas son PAS, plata metenamina, Ziehl-Neelsen, etc., y sus procedimientos son los mismos que para histología, con la excepción de que no es necesario desparafinar e hidratar la muestra.

4.- Control de Calidad de la Preparación, Conservación y Archivado.

A la hora de recibir la muestra hay que asegurarse de que viene identificada (si fuera posible una pegatina identificativa del centro sería lo óptimo) y, en el caso de que la muestra fuera múltiple, los botes o cristales también han de venir identificados para saber el orden (por ejemplo, si se recibe una orina de varios días debe figurar cuál es la de cada día). También ha de venir en perfectas condiciones; esto significa que el cristal debe venir fijado o en alcohol o con citoespray, o bien completamente seco; si es un líquido o una muestra de esputo debe venir en un bote especial para dicho fin, cerrado y refrigerado, ya que una muestra en fresco puede permanecer a temperatura ambiente menos de 12 horas, y de 12 a 24 horas en nevera a 4 °C; para más de 24 horas, con un máximo de 2 semanas, hay que diluir la muestra en un volumen de alcohol de 50° o de 70° igual que el volumen de la muestra. Una vez superado este tiempo la muestra se degeneraría y no sería válida para el diagnóstico; y, por tanto, no debe ser aceptada, ya que podría acarrear problemas futuros. Una vez recibida la muestra se procede a su identificación dentro del laboratorio y a su procesado.

En la medida de lo posible, hay que estudiar la muestra cuanto antes ya que, a pesar de los conservantes, la muestra poco a poco se va deteriorando. Sobre todo, en tipos de muestra como el LCR ya que si no se degenerarían las células y no sería válido para diagnóstico. Sin embargo, la orina, con el método de conservación adecuado, podría realizarse su procesamiento posteriormente.

Después del procesado hay que asegurarse de que la muestra está en perfectas condiciones para el diagnóstico: es importante mirar la muestra al microscopio para asegurarse de que la coloración es correcta, de que las células no han sufrido ningún proceso de degeneración, no por patologías sino por un fallo en la conservación/procesado de la muestra, y de que no existen artefactos que dificulten el diagnóstico, como por ejemplo filamentos exógenos a la muestra, gotas resultado de la mezcla de xilol y agua, polvo dorado marronáceo que indica desecación durante el procesado antes del medio de montaje o cristales azulados, que son el resultado de una mala filtración de la hematoxilina.

A la hora de archivar las muestras se debe tener en cuenta que, pasados los tiempos de conservación, las muestras no son válidas para su estudio y deben ser desechadas. Los portaobjetos, ya procesados y cuyo estudio hayan finalizado, se deben

almacenar en cajones adecuados. Para ello y hay que asegurarse de que el cristal está en perfectas condiciones para su almacenamiento, es decir, el medio de montaje ha de estar perfectamente seco (2 o 3 días). Si se guarda sin ser así podría desbordarse y pegarse al resto de cristales; y el cubreobjetos debe estar perfectamente adherido al portaobjetos sin dejar bolsas de aire ni burbujas en su interior (para que el material al aire no se degrade y sirva para un estudio futuro).

Durante este archivado de muestras hay que ser consciente de que es una tarea de vital importancia, ya que en numerosas ocasiones las muestras serán únicas, y en caso de producirse un estudio futuro debemos disponer de este material de referencia para ver la evolución del diagnóstico.

5.- BLOQUES CELULARES. CONCEPTO, FUNDAMENTO y PREPARACIÓN.

Los bloques celulares o citobloques se obtienen de muestras citológicas que son demasiado celulares para poder realizar un estudio citológico normal o de rutina; así, se podría decir que son acumulaciones celulares que finalizan su proceso como una biopsia. Existen diferentes procesos para realizar un citobloque:

.- **Coágulo:** en distintas ocasiones, al recibir las muestras líquidas en el laboratorio de citología, por causa natural o inducida, podemos encontrarnos coágulos de diferentes compuestos (sangre, moco, etc.). La mejor manera de estudiarlos es realizar un citobloque con este material. Es el más fácil de los procesos: se coge el coágulo y se envuelve en papel de arroz (papel de fumar, para mechas), que es un medio que permitirá manipular la muestra. El coágulo envuelto en papel de arroz se introduce en un casete y se inicia el proceso como si de una biopsia se tratase.

.- **Eppendorf:** si al recibir la muestra observamos que el material es muy denso o celular se procederá a hacer un citobloque. No se puede emplear el proceso anterior, ya que las células no forman un grupo cohesionado.

Se procederá de la siguiente manera:

- Centrifugar todo el material en la centrífuga de decantación durante 10 min a 2.000 rpm.
- Decantar y traspasar todo el material a uno o varios Eppendorf.
- Añadir 1 ml de formol en cada tubo Eppendorf que utilicemos.
- Centrifugar en la centrifugadora de Eppendorf durante 20 min a 4.000 rpm.
- Desechar el sobrenadante y extraer el material.
- Envolver el material en papel de arroz.
- Meterlo en un casete y procesar como una biopsia.

.- **Citogel:** el proceso es similar al proceso mediante Eppendorf:

- Centrifugar todo el material en la centrífuga de decantación durante 10 min a 2.000 rpm.
- Decantar.
- Añadir 10 ml de etanol.
- Centrifugar en la centrífuga de decantación 10 min a 2.000 rpm.
- Decantar el sobrenadante.
- Añadir sobre la muestra el citogel previamente calentado para que esté líquido.

- Meter el tubo con la muestra al congelador unos minutos para que el citogel se solidifique.
- Extraer del tubo la muestra.
- Envolver la muestra en papel de arroz.
- Meterlo en un casete y procesar como una biopsia.

Hay que recordar que la realización de un citobloque facilita determinados estudios, como los de inmunohistoquímica, ya que en ocasiones estos estudios obligan a realizar una cantidad elevada de cortes o muestras.

.- Máquina: en la actualidad comienzan a aparecer aparatos que realizan todo el proceso automáticamente, desde la muestra líquida hasta la muestra incluida en parafina.