

TINCIÓN DE PREPARADOS CITOLÓGICOS

Quiroga, María Alejandra
Profesora Titular
Cátedra de Patología Especial
Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP

Los materiales destinados a estudios citológicos pueden presentar distintas características y, por lo tanto, requieren un procesamiento adecuado según las circunstancias.

Básicamente, las muestras provienen de lesiones sólidas o pueden obtenerse a partir de colectas líquidas y fluidos corporales.

En el primer caso (lesiones sólidas), las características del preparado dependerán de la técnica utilizada. De este modo, a partir del aspirado de masas sólidas, hisopados o raspados, se pueden realizar extendidos (según la técnica del frotis sanguíneo o de compresión) e impresiones (improntas).

Tinción de preparados: técnicas básicas en citología

Son varias las técnicas que se utilizan para los preparados citológicos. Los métodos de tinción más comunes son dos:

- a) coloraciones tipo Romanovsky (Diff-Quick®, Hemacolor®, Tinción 15®, Wright, May Grünwald/Giemsa)
- b) coloraciones tipo Papanicolaou y sus derivados (tinción tricrómica de Sano).

a) Coloraciones tipo Romanovsky

Estas coloraciones son sencillas de preparar, conservar y utilizar. Además, son económicas y fáciles de conseguir. Existen en el mercado numerosos equipos comerciales de reactivos ya preparados y listos para usar. Con estos colorantes se tiñen muy bien el citoplasma celular y microorganismos. Si bien los detalles de núcleos y nucleolos no se perciben tan claramente como con las técnicas tipo Papanicolaou, resultan suficientes para diferenciar células inflamatorias de aquellas neoplásicas. Además, permiten la evaluación citológica del potencial de malignidad celular.

Para la aplicación de estas técnicas los preparados deben secarse al aire. De este modo, las células se adhieren al portaobjetos, evitándose su arrastre por los colorantes y lográndose una correcta preservación de su estructura.

Cada técnica requiere su propio procedimiento y éste debe modificarse (sobre todo en los tiempos de contacto con las soluciones colorantes) teniendo en cuenta el tipo y el espesor del preparado, así como la concentración de proteínas en los preparados elaborados a partir de muestras fluidas.

□ *Diff Quick*®: es una variante modificada de la tinción de Wright que consta de tres pasos: fijación en metanol, tinción con eosina y, por último,

tinción con azul de metileno. Luego, los preparados se secan al aire o cerca de una llama. El procedimiento es muy rápido, tomando menos de 20 segundos para su realización, si bien los tiempos pueden variar en función del espesor de la muestra. Raramente las muestras pueden resultar exageradamente teñidas y en el caso que, por el contrario, el preparado quede débilmente coloreado, se puede solucionar por reinmersión en el azul de metileno. Si bien esta técnica se desarrolló originariamente para la evaluación de frotis sanguíneos, resulta útil en el diagnóstico citológico rápido. Coloración duradera.

□ *Hemacolor*®: tinción con base de eosina y tionina. Tiene la ventaja de su rápida aplicación (15 segundos) y brinda una excelente calidad de tinción. Si se desea prolongar la duración de los colorantes y retardar el crecimiento bacteriano se puede agregar una gota de formol neutro a las soluciones colorantes. Coloración duradera.

□ *Tinción 15*®: se trata de reactivos comerciales para coloración de extendidos. El equipo de tinción está compuesto por 3 soluciones: solución de fijación y dos soluciones colorantes. La aplicación de esta técnica insume unos 15 segundos y consiste en inmersiones sucesivas en cada uno de los reactivos. Luego, los preparados se secan al aire o cerca de una llama. Si se prefieren tinciones con tendencia eosinofílica o basofílica se aumenta el número de inmersiones en una u otra solución colorante. Coloración duradera.

□ *Coloración de Wright*: se trata de una tinción panóptica diferencial que se realiza en un solo paso. Requiere un tiempo de incubación con la solución colorante de alrededor de 15 minutos.

Preparación: solución colorante ya preparada. Procedimiento: cubrir el preparado (*) con 30 gotas de la solución, durante 1 minuto. Sin volcar, agregar igual cantidad de gotas de agua destilada. Dejar actuar durante 10 a 15 minutos. Lavar por agitación en un pequeño recipiente con agua destilada o bajo chorro de agua corriente. Secar al aire o cerca de una llama. Si se desea, se puede montar con bálsamo (**). Coloración duradera.

□ *Coloración de May Grünwald/Giemsa*: se trata de soluciones preparadas a base de colorantes de acentuado poder policromatófilo y metacromático. Se utiliza para tinciones citológicas y hematológicas. Requiere un tiempo de realización de alrededor de 20 minutos, debiendo adaptarse el tiempo de incubación con la solución de Giemsa según la intensidad de coloración deseada. Con estos colorantes los núcleos celulares se observan de color rojo púrpura. El color del citoplasma varía con el tipo celular: rojo púrpura intenso para el neutrófilo, naranja parduzco para el eosinófilo, rojo negruzco para el basófilo, azul grisáceo para el monocito, azul para los linfocitos, pardo anaranjado para los eritrocitos y rojo púrpura para los gránulos.

Preparación: solución de May Grünwald (MG): viene lista para usar. La solución de Giemsa (G) se prepara mezclando la solución "stock" y el "buffer" pH 7. Se mezclan en la siguiente relación: 1 gota de G por cada ml

de buffer. Se prepara inmediatamente antes de usar. Procedimiento: se coloca el preparado (*) sobre una grilla y se cubre con solución de MG durante 3 minutos. Sin volcar el MG se agregan 25 gotas de buffer y se dejan actuar durante 2 minutos. Se vuelca y se cubre el preparado con solución de G. Se deja actuar durante 25 minutos. Se lava por agitación con agua destilada o buffer. Se seca al aire o cerca de una llama. Coloración de duración limitada si no se monta (**).

b) Coloraciones tipo Papanicolaou

Este tipo de coloraciones requiere de numerosos pasos e insume un tiempo considerable. Además, los reactivos son difíciles de preparar y conservar. Estas técnicas brindan excelentes detalles del núcleo y nucleolo y, si bien el citoplasma no se tiñe tan intensamente como con las coloraciones tipo Romanovsky, también permiten distinguir algunos otros detalles celulares. En comparación con estas últimas, no resulta una técnica útil para la demostración de microorganismos.

A diferencia del grupo de técnicas anteriores, los preparados deben ser fijados húmedos, antes de que el material se seque. Usualmente se utilizan fijadores citológicos en aerosol o se sumergen los portaobjetos en etanol 95%, metanol o isopropanol, inmediatamente después de la obtención de la muestra. En este último caso, es conveniente cubrir los portaobjetos (previo a su uso) con una película de albúmina para facilitar la adherencia del material.

Otras coloraciones

□ *Nuevo azul de metileno*: Para complementar las coloraciones tipo Romanovsky se suele utilizar la tinción nuevo azul de metileno. Se trata de una solución soluble en agua que se puede aplicar directamente sobre preparados citológicos secados al aire, fijados (*) o húmedos, luego de lo cual se aplica un cubreobjetos y se observa inmediatamente al microscopio. La coloración no es duradera y desaparece en horas. Si bien tiñe débilmente el citoplasma, brinda excelentes detalles nucleares, permitiendo una adecuada evaluación de los cambios asociados a procesos neoplásicos. En el caso de las células cebadas, su reconocimiento se ve facilitado por el color púrpura oscuro que toman los gránulos. Por tratarse de una tinción de base acuosa no disuelve las grasas. Por otro lado, como los eritrocitos, en general, no se tiñen con esta técnica, puede utilizarse en preparados donde los glóbulos rojos enmascaran las células nucleadas. No sólo es una coloración útil para la observación de células nucleadas sino también para la detección de bacterias (que se colorean de azul oscuro), hongos y levaduras. Además, si la solución es correctamente filtrada, es ideal para la detección de *Hemobartonella sp*, cuya silueta se ve resaltada frente a la "invisibilidad" de los eritrocitos.

Preparación: nuevo azul de metileno: 500 mg; agua destilada: 100 ml; formol puro: 1 ml. Esta solución "stock" se debe mantener refrigerada. Para su uso se separa un pequeño volumen en un frasco gotero, previo filtrado.

□ *Azul de toluidina*: coloración de un solo paso que permite resaltar los gránulos de las células cebadas.

Preparación: 1 g de azul de toluidina en 100 ml de agua destilada.

Procedimiento: cubrir el preparado (*) con la solución durante 1 minuto.

Lavar por agitación en un pequeño recipiente con agua destilada y luego dejar secar (**). La coloración es duradera, al igual que la solución.

□ *Coloraciones de Gram, PAS, Ziehl-Neelsen y Warthin-Starry*: estas técnicas habitualmente utilizadas en estudios histológicos y/o microbiológicos, pueden aplicarse sobre preparados citológicos. En estos casos es posible obtener una clasificación general de posibles agentes patógenos (por ej.: bacterias u hongos) y, en determinadas circunstancias, permite la identificación del microorganismo presente (por ej: *Helicobacter pylori*, *Cryptococcus neoformans*). No obstante, para una clasificación definitiva se requiere de estudios microbiológicos.

-Lavado de portaobjetos: utilizar detergente al 1%, aproximadamente, en agua corriente. Sumergir los vidrios por unos pocos minutos. Lavar luego con abundante agua corriente circulante algunos minutos más. Colocar en un recipiente con tapa conteniendo una mezcla de alcohol 96% y éter sulfúrico, en partes iguales. En el momento de usar retirar los que se necesitan y secar con papel.

-Buffer (solución de buffer fosfato, pH 7,2-7,4)

-Fosfato dibásico anhidro 11,4 g 10

-Fosfato monobásico dihidro 3,3 g (si se trabaja con fosfato monobásico anhidro utilizar 2, 54 g)

-Agua destilada 1000 ml

Nota: en cualquiera de las coloraciones consignadas puede reemplazarse el buffer por agua destilada.

(*) Los preparados son previamente secados al aire. Pueden fijarse con calor (no a la llama directa) o mediante inmersión en alcohol metílico (metanol) durante aproximadamente 5 segundos.

(**) Los preparados pueden montarse con bálsamo, previo pasaje rápido por alcohol 96%, alcohol 100% y xilol.

Problemas de tinción

La mayoría de los problemas que conducen a una pobre calidad de tinción pueden evitarse trabajando con portaobjetos nuevos, soluciones "buffer" y de tinción frescas y, según se requiera, bien filtradas. Por otro lado, es importante colorear los preparados lo más pronto posible después de su obtención y secado, cuidando de no tocar la superficie del vidrio.