

CAPÍTULO 3

Tinción de preparados citológicos

María Alejandra Quiroga y Mariana Machuca

La observación a simple vista del preparado citológico antes de su tinción puede brindar algún dato en cuanto a la calidad y características de la muestra. Por ejemplo, frecuentemente el preparado obtenido luego de la aspiración de un lipoma permanece húmedo y evidencia pequeñas gotitas traslúcidas. En ocasiones se aprecia que algunas muestras exhiben un color rojo intenso indicando la presencia de abundante sangre o puede evaluarse que la distribución del material obtenido sobre el portaobjetos ha dado lugar a una capa irregular o gruesa. Independientemente de que podamos registrar algunas características previas, las muestras citológicas para su evaluación microscópica necesitan ser coloreadas.

Tinción de preparados: técnicas básicas en citología

Las tinciones se pueden clasificar como simples y diferenciales. En las tinciones simples se utiliza un único colorante que tiñe la muestra de un solo color. Las tinciones diferenciales se basan en el uso de dos o más colorantes o reactivos complementarios que facilitan la identificación de estructuras celulares diferentes y la diferenciación entre tipos celulares (González Cruz 2019).

Son varias las técnicas que se utilizan para teñir preparados citológicos. La mayoría de ellas corresponden a dos tipos de tinciones: 1- **coloraciones tipo Papanicolaou** y 2- **coloraciones tipo Romanowsky** (Wright, May Grünwald/Giemsa, Diff-Quick, Hemacolor®, Tinción 15®, Color Fast®) (Meinkoth 2020).

Coloraciones tipo Papanicolaou

Este método fue publicado por el Dr. George N. Papanicolaou, considerado el padre de la citopatología, en 1942 y es una tinción citológica rutinariamente utilizada en citopatología humana, principalmente para la evaluación de frotis cervicales, pero también útil para muestras no ginecológicas obtenidas por citología exfoliativa de superficies epiteliales del cuerpo (Dey 2018). Se trata de una tinción policromática que pone en evidencia variaciones en la morfología celular,

permitiendo evaluar el grado de madurez celular y de actividad metabólica. El uso de la tinción de Papanicolaou da como resultado una excelente coloración nuclear (Dey 2018).

No obstante, no colorea muchos microorganismos, y no tiñe bien el citoplasma celular. Por otro lado, es una tinción que cuenta con numerosos pasos, insume un tiempo considerable y los reactivos son difíciles de preparar y conservar. Además, requiere fijación previa de los preparados antes de que el material se seque (fijados húmedos). 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. Dadas estas características es un método de coloración que prácticamente no se utiliza en citología veterinaria (Meinkoth 2020)

Coloraciones tipo Romanowsky

Las tinciones de tipo Romanowsky son muy utilizadas en el laboratorio de hematología para la coloración de frotis sanguíneo. Se basan en el uso de azul de metileno y sus productos de oxidación (azul B) y de eosina Y (Díaz Méndez 2013).

En las tinciones de Romanowsky las estructuras celulares de carácter básico fijan los colorantes ácidos (eosina) y las de carácter ácido fijan los colorantes básicos (azul de metileno). De este modo, los componentes basófilos presentes en el núcleo o en el citoplasma se colorean de azul, mientras que otros componentes acidófilos, se observan de color rosado (González Cruz 2019).

Estas coloraciones son sencillas de preparar, conservar y utilizar. Además, son económicas y fáciles de conseguir. Existen en el mercado numerosos equipos comerciales de tinción, ya preparados y listos para usar. Con estos colorantes se tiñen muy bien el citoplasma celular y los microorganismos. Si bien los detalles de núcleos y nucléolos no se perciben tan claramente como con las técnicas tipo Papanicolaou, resultan suficientes para diferenciar células inflamatorias de aquellas neoplásicas. Además, permite evaluar, en las células neoplásicas, el potencial de malignidad (criterios de malignidad). Por otro lado, son coloraciones permanentes, por lo que los preparados pueden almacenarse a fin de revisarlos posteriormente o buscar otra opinión de considerarse necesario.

Para la aplicación de estas técnicas los preparados deben secarse al aire. No se utilizan soluciones fijadoras. Mediante el secado al aire, las células se adhieren al portaobjetos, evitándose su arrastre por los colorantes y logrando una correcta preservación de su estructura.

Las tinciones de Romanowsky pueden ser de base acuosa o alcohólica (metanol). Las coloraciones de Wright y Giemsa son de base metanol y colorean muy bien los gránulos de las células cebadas. Mientras que algunas de las tinciones rápidas (por ejemplo, Diff Quick) son de base acuosa y no colorean los gránulos de los mastocitos pudiendo llevar a errores en el diagnóstico de una neoplasia tan frecuente como es el mastocitoma.

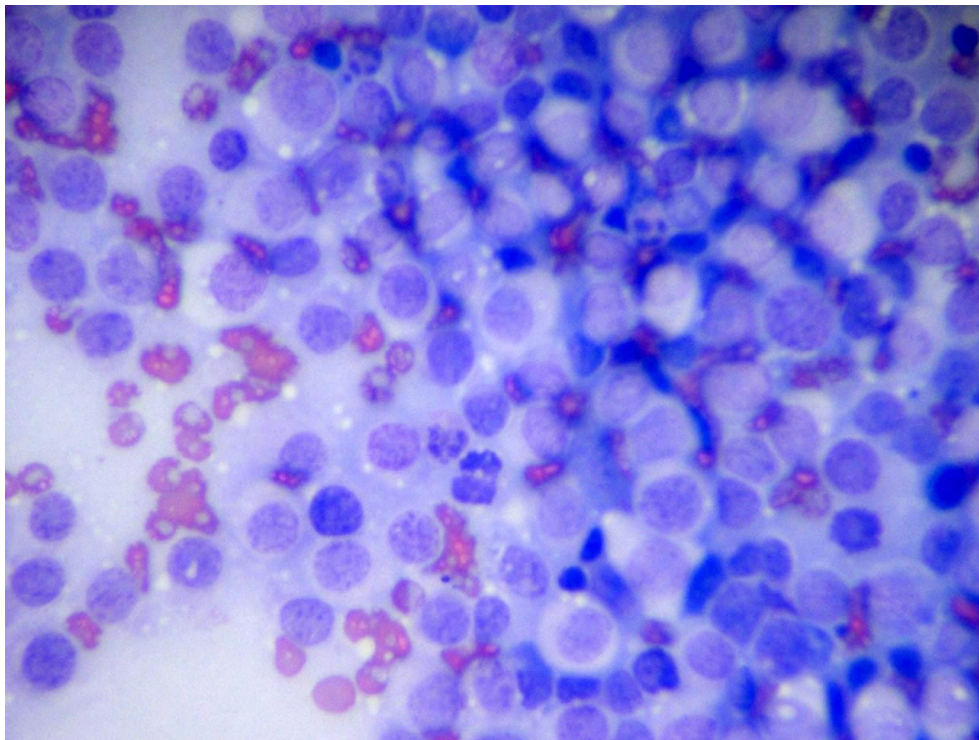
Cada técnica requiere su propio procedimiento y éste debe modificarse (sobre todo en los tiempos de contacto con las soluciones colorantes) teniendo en cuenta el tipo y el espesor del preparado, así como la concentración de proteínas en los preparados elaborados a partir de muestras fluidas. En general, los preparados más gruesos requieren de mayor tiempo de exposición a los distintos colorantes. (Meinkoth 2020, Meyer 2010, Radin 1998).

Tinción de Wright

Se trata de una tinción panóptica diferencial que se realiza en un solo paso (Figura 3.1). Requiere un tiempo de incubación con la solución colorante de alrededor de 15 minutos. El colorante está compuesto de azul de metileno y eosina disueltos en metanol, por lo que no es necesario el paso previo de fijación.

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 (Díaz Méndez 2013).

Figura 3.1. Tinción de Wright.



Células redondas con núcleo con patrón de cromatina reticular y moderado citoplasma de bordes netos, celeste pálido y en ocasiones con vacuolas traslúcidas. Nótese que los eritrocitos se observan coloreados. Tumor venéreo transmisible en canino. Obj. 40X.

Tinción de May Grünwald/Giemsa

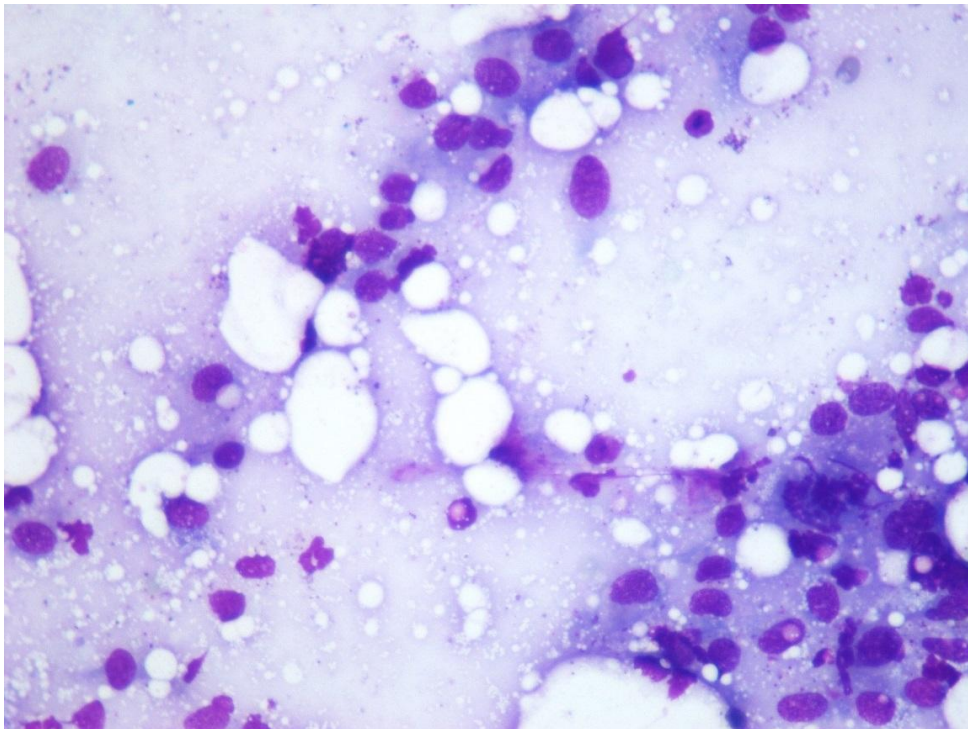
Se trata de soluciones preparadas a base de colorantes de acentuado poder policromatófilo y metacromático. Se utiliza para tinciones citológicas y hematológicas. Requiere un tiempo de

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 (Figura 3.2).

Preparación: solución de May Grünwald (MG): viene lista para usar. La solución de Giemsa (G) se prepara mezclando la solución stock comercial con agua desmineralizada o solución salina tamponada pH 7,2. 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 (**) (Biopack, Dey 2018)

Figura 3.2. Tinción de May Grünwald/Giemsa.



Células de límites citoplasmáticos imprecisos con vacuolas y núcleo redondo a oval, basófilo violeta/púrpura. Grandes gotas de lípidos libres en el fondo del preparado. Liposarcoma en canino. Obj. 20X.

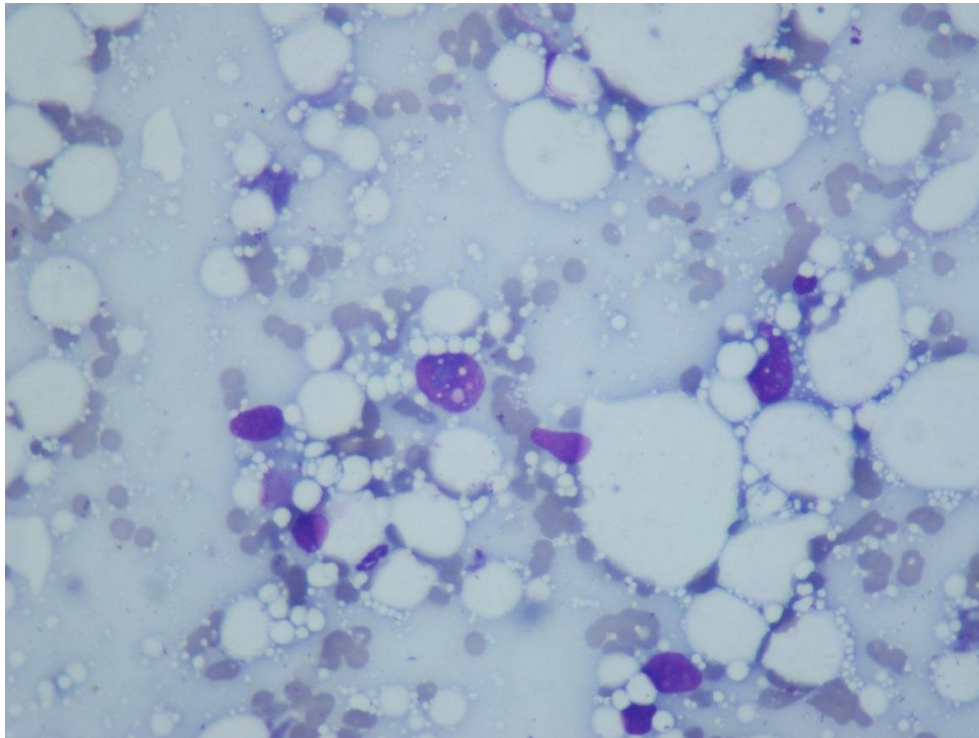
Tinción de Giemsa

La tinción de Giemsa emplea como colorante fundamental, una mezcla de tiacínicos catódicos, como el azul A, B y azul de metileno, que colorean el núcleo; mientras que la eosina se utiliza para teñir el citoplasma (Figura 3.3). Estos compuestos se encuentran disueltos en alcohol metílico.

En este caso se trabaja solo con la solución de Giemsa comercial que debe prepararse al 10% en agua desmineralizada o solución tamponada de fosfatos a pH 7,2 inmediatamente antes de usar.

Procedimiento: se cubre la muestra con solución de Giemsa al 10% durante 20 minutos. Luego se lavan los preparados con la solución buffer y se deja secar al aire (Biopack, Díaz Méndez 2013).

Figura 3.3. Tinción de Giemsa.



Células de límites citoplasmáticos imprecisos con abundantes vacuolas y núcleo redondo a oval basófilo. Grandes gotas de lípidos libres en el fondo del preparado. Liposarcoma en canino. Obj. 20X.

A partir de la tinción de Wright surgieron variantes que llevaron al desarrollo de técnicas de coloración rápida. Es así que distintas firmas comerciales ofrecen equipos de coloración de muy fácil uso y que no requieren de contar con reactivos o soluciones accesorias.

Diff Quick™

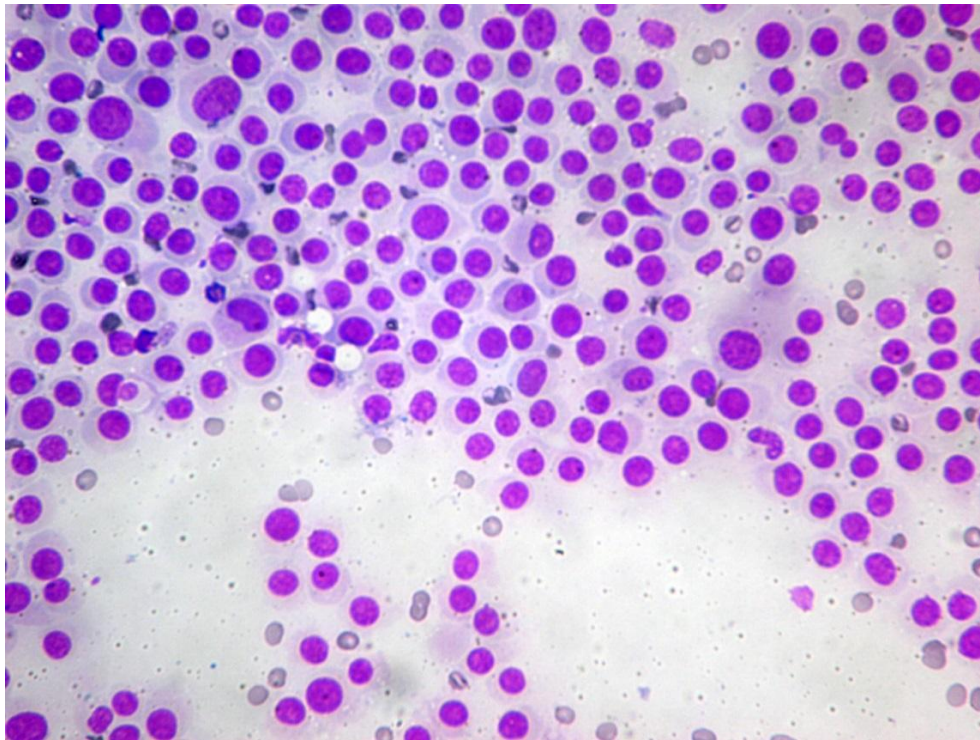
Es una variante modificada de la tinción de Wright que consta de tres pasos: fijación en metanol, tinción con eosina y, por último, tinción con azul de metileno. Luego, los preparados se secan al aire o cerca de una llama. El procedimiento es muy rápido, tomando menos de 20 segundos para su realización, 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 reinmer-

sión 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 (Medion Diagnostics).

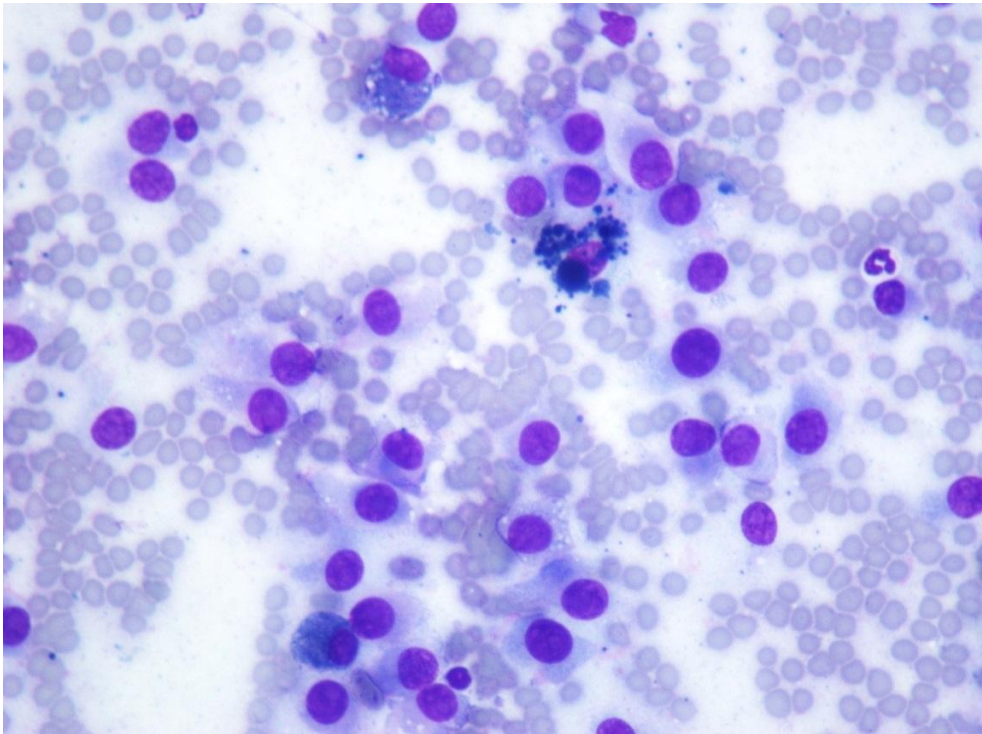
Tinción 15® (Biopur), Color Fast® (Biopack)

Se trata de reactivos comerciales para coloración de extendidos. Cada equipo de tinción está compuesto por 3 soluciones: solución de fijación y dos soluciones colorantes: solución colorante ácida (solución xanténica - roja) y solución colorante básica (solución tiazínica - azul). La aplicación de esta técnica insume unos 15 segundos y consiste en inmersiones sucesivas que se realizan con movimientos suaves ascendentes y descendentes, en cada uno de los reactivos. Entre una y otra solución se escurre el exceso sobre papel absorbente para terminar con un lavado final en agua destilada o corriente. 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 (Biopur, Biopack) (Figuras 3.4 y 3.5).

Figura 3.4. Tinción 15®.



Células redondas con núcleo con patrón de cromatina reticular y moderado citoplasma de bordes netos, basófilo suave. Tumor venéreo transmisible en canino. Obj. 20X.

Figura 3.5. Color Fast ®.

Células redondas con núcleo con patrón de cromatina grueso y escaso a moderado citoplasma de bordes poco definidos basófilo suave. Destaca una célula con abundantes gránulos gruesos negros intracitoplasmáticos (melanina). Melanoma en canino. Obj. 40X.

Otras coloraciones

Nuevo azul de metileno (Fisher Scientific)

Para complementar las coloraciones tipo Romanowsky 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 lo que facilita la observación de los lípidos asociados a lipomas o a quistes infundibulares foliculares. Por otro lado, como los eritrocitos 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 *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella 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 conservar refrigerada. Para su uso se separa un pequeño volumen en un frasco gotero, previamente filtrado (Meyer 2010, Radin 1998).

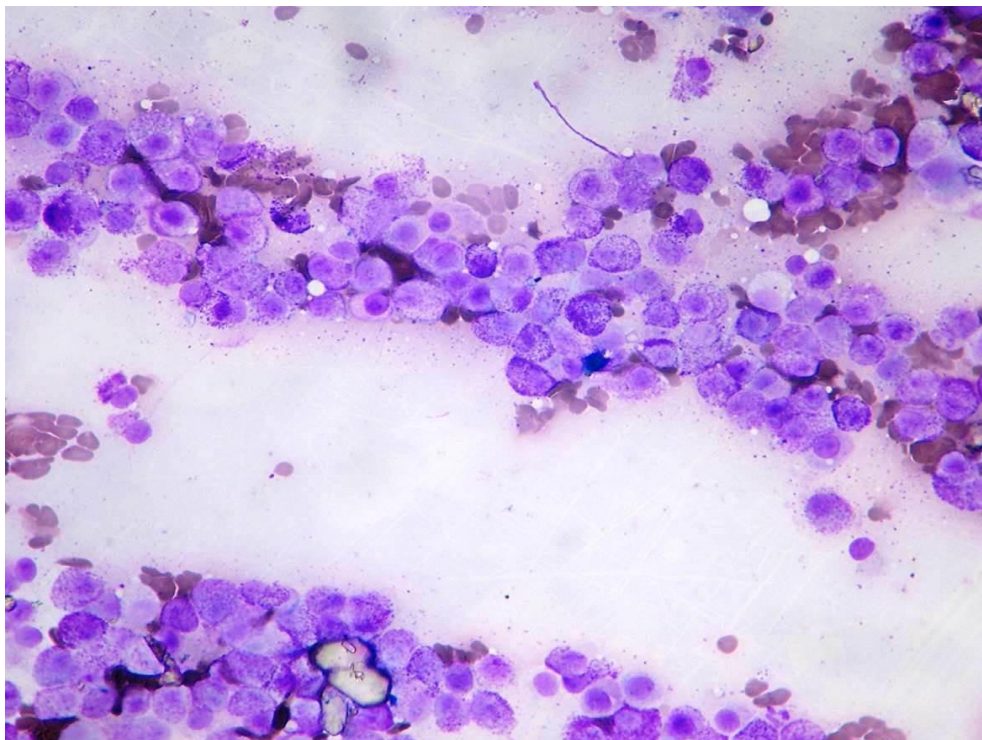
Azul de toluidina

Coloración de un solo paso que permite resaltar los gránulos de las células cebadas (Figura 3.6).

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.

Figura 3.6. *Azul de toluidina.*



Células redondas de límites bien definidos con moderada cantidad de gránulos finos intracitoplasmáticos púrpura. Mastocitoma en canino. Obj. 20X

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 los agentes infecciosos (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

- 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 montar 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. En la tabla 3.1 se presentan los problemas más frecuentes que pueden ocurrir con las tinciones tipo Romanowsky y sus posibles soluciones.

Tabla 3.1. Soluciones posibles a problemas con las tinciones tipo Romanowsky.

Problema y causas potenciales	Solución
Excesiva coloración azul	
-Prolongado contacto con el colorante -Lavado con poca cantidad de agua -Preparado muy grueso -Alcalinidad del colorante, diluyente, buffer o agua -Fijación húmeda en etanol o formol -Fijación tardía -Exposición a vapores de formalina -Superficie alcalina del portaobjetos	-Reducir el tiempo de tinción -Prolongar los tiempos de lavado -Realizar preparados más finos -Controlar y corregir el pH de las soluciones -Secar los preparados al aire antes de su fijación -Fijar los preparados lo más pronto posible -Evitar el contacto de las muestras con los frascos que contienen muestras en formol -Utilizar portaobjetos limpios
Excesiva coloración rosada	
-Excesivo tiempo de inmersión en la solución roja -Inadecuado tiempo en la solución azul -Lavado excesivo -Colorante o diluyente demasiado ácidos -Montaje del preparado antes del completo secado	-Reducir el tiempo de inmersión -Prolongar el tiempo de inmersión -Reducir el tiempo de lavado -Controlar y corregir el pH -Dar tiempo a que el preparado esté completamente seco previo a su montaje
Tinción débil	
-Insuficiente contacto con alguna de las soluciones colorantes -Soluciones envejecidas -Otro portaobjetos cubriendo la muestra durante la tinción	-Aumentar el tiempo de tinción -Cambiar las soluciones colorantes -Colorear los preparados por separado
Tinción desapareja	
-Variaciones del pH en diferentes áreas del portaobjetos (portaobjetos mal lavados o manipulados inadecuadamente) -Preparados con restos de agua después de la tinción y del lavado	-Utilizar portaobjetos limpios y evitar tocar su superficie -Colocar los portaobjetos en posición vertical para el secado o secarlos con un ventilador
Presencia de precipitados	
-Inadecuada filtración de los colorantes -Inadecuado lavado de los preparados después de teñidos -Portaobjetos sucios -Secado del colorante durante el proceso de tinción	-Filtrar o cambiar las soluciones -Lavar bien los portaobjetos después de teñidos -Utilizar portaobjetos limpios -Utilizar suficiente colorante y evitar un contacto muy prolongado con las soluciones
Otros problemas	
-Preparados teñidos en exceso -Artefactos refráctiles sobre los eritrocitos (usualmente debido a fijador hidratado)	-Destañir con metanol 95% y volver a teñir -Cambiar la solución fijadora

Nota: adaptado de: Same possible solutions to problems seen with commin Romanowsky-type stains, Meinkoth, J.H. y col. 2020, Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat.

Referencias

- Biopack. Color Fast®. Especificaciones técnicas. Recuperado de: https://www.biopack.com.ar/ficha-especificaciones_116_color-fast-kit-solucion#
- Biopack. Solución Giemsa. Especificaciones técnicas, Sistemas Analíticos SA. Recuperado de: https://www.biopack.com.ar/ficha-especificaciones_297_giemsa-solucion#
- Biopur. Tinción 15®. Especificaciones técnicas. Recuperado de: <http://www.biopur.com.ar/ht15sp.htm>
- Dey P (2018). Routine Staining in Cytology Laboratory. En: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. (133-138). Springer Nature Singapore Pte Ltd. Recuperado de: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_14
- Díaz Méndez XC, Magzul Tucux WP, Pérez López WJ (2013). Colección de referencia en hematología (Seminario de Investigación para optar al título de Química Biológica). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de: <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QB1069.pdf>
- González Cruz E. de J, Díaz Contreras A, Gómez Aburto DH, Rivera Rosado FE, de la Cruz Nicolás MA (2019). Manual de Tinciones Citoquímicas Especiales en Hematología. Centro Estatal De Cancerología “Dr. Miguel Dorantes Mesa”. Xalapa, Veracruz, México. Recuperado de: <https://www.ifcc.org/media/478752/manual-de-tinciones-citoquimicas-especiales.pdf>
- Medion Diagnostics. Diff Quik™. Especificaciones técnicas. Recuperado de: <https://ehslegacy.unr.edu/msdsfiles/32754.pdf>
- Meinkoth JH, Cowell RL, Tyler RD, Morton RJ (2020). Sample Collection and Preparation En Valenciano AC y Cowell RL, *Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* (1-17). Fifth edition. St. Louis, USA: Elsevier.
- Meyer DJ, Connolly SL, Heng HG (2010). The Acquisition and Management of Cytology Specimens. En: Raskin RE y Meyer DJ, *Canine and Feline Cytology. A Color Atlas and Interpretation Guide* (1-14). Second edition. St. Louis, USA: Ed. Saunders Elsevier.
- Papanicolau GN (1942). A New Procedure for Staining Vaginal Smears. *Science*, 95 (2469): 438-439
- Radin MJ, Wellman ML (1998). Recolección y preparación de muestras. En *Interpretación de la Citología Canina y Felina* (11-14). St. Louis, USA: Nestlé Purina PetCare Company. 63188. Recuperado de: http://190.186.110.75/sistemabibliotecario/doc_libros/Interpretaci%C3%B3n%20de%20la%20Citolog%C3%ADa%20Canina%20y%20Felina-1-20100903-094610.pdf