

January 2005

Citología de impresión una técnica novedosa y sencilla para el diagnóstico de alteraciones de la superficie ocular

Martha Fabiola Rodríguez A.

Universidad de La Salle, Bogotá, martharodriguez@lasalle.edu.co

Patricia Hernández Rodríguez

Universidad de La Salle, Bogotá, phernandez@lasalle.edu.co

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/svo>



Part of the [Eye Diseases Commons](#), [Optometry Commons](#), [Other Analytical, Diagnostic and Therapeutic Techniques and Equipment Commons](#), and the [Vision Science Commons](#)

Citación recomendada

Rodríguez A. MF y Hernández Rodríguez P. Citología de impresión una técnica novedosa y sencilla para el diagnóstico de alteraciones de la superficie ocular. *Cienc Tecnol Salud Vis Ocul.* 2005;(5): 51-58. doi: <https://doi.org/10.19052/sv.1663>

This Artículo de Revisión is brought to you for free and open access by the Revistas científicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in *Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular* by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

ARTÍCULO DE REVISIÓN DE TEMA

Citología de impresión una técnica novedosa y sencilla para el diagnóstico de alteraciones de la superficie ocular

Martha Fabiola Rodríguez A.* / Patricia Hernández Rodríguez**

RESUMEN

El presente artículo es una revisión de la técnica de citología de impresión como herramienta diagnóstica para las alteraciones de la superficie ocular. Se han utilizado un amplio rango de técnicas adaptadas a la citología de impresión de conjuntiva y cornea, como son: diferentes coloraciones para observar las muestras en microscopio óptico, microscopía electrónica, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y citometría de flujo. Actualmente, esta técnica es muy utilizada como una alternativa no invasiva para obtener «biopsias» muy delgadas y células epiteliales de la superficie ocular, especialmente porque no presenta efectos colaterales o contraindicaciones. Ha sido demostrado que es una ayuda diagnóstica muy utilizada en optometría y oftalmología, en una gran variedad de procesos a nivel ocular. Durante la última década, su uso como herramienta de investigación y diagnóstico ha experimentado un enorme crecimiento y ha contribuido ampliamente en el conocimiento de las patologías de la superficie ocular.

Palabras claves: citología de impresión, ojo seco, PCR, inmunohistoquímica, infecciones virales.

* Bacterióloga, Magíster en Inmunología. Docente Investigador, Facultad de Optometría. Universidad de La Salle.
Correo electrónico: martharodriguez@lasalle.edu.co

** Bióloga, Epidemióloga, Magíster en Biología. Docente Investigador, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Optometría, Universidad de La Salle. Correo electrónico: phernandez@lasalle.edu.co

Fecha de recepción: octubre 24 de 2005.

Fecha de aprobación: noviembre 8 de 2005.

INTRODUCCIÓN

La citología de impresión es una técnica simple y no invasiva, sirve para obtener «biopsias» de la superficie ocular. Fue introducida por Egbert *et al.* en 1977, los autores encontraron que se podía obtener una impronta de las capas del endotelio, al ejercer presión sobre la conjuntiva con un papel de filtro de acetato de celulosa (Egbert, 1977).

FIGURA 1. CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN CON PAPEL FILTRO DE ACETATO DE CELULOSA.



Fuente; Aguilar, 1999.

La técnica se realiza con anestesia tópica de la cornea y/o conjuntiva y posteriormente con una pinza se toma una tira de papel de filtro de acetato de celulosa (Millipore HAW304), se coloca sobre la superficie ocular a estudiar haciendo presión suavemente por unos segundos con la parte plana de la pinza y se retira el papel. De esta manera quedan pegadas de una a tres capas de la conjuntiva y una sola de la cornea. Se pueden hacer varias tomas, en la conjuntiva bulbar superior, inferior, medial y lateral y de la cornea para obtener un mapeo completo de la superficie ocular. Las tiras se fijan

en etanol al 95% y se envían al laboratorio para colorear con ácido peryódico de Schif (PAS) y hematoxilina, se pasan por xilol para deshidratar y aclarar el papel, finalmente se fijan en una lámina. Las muestras se estudian en el microscopio de luz para determinar el número de células mucoscretantes y la relación núcleo-citoplasma (N:C) de las células epiteliales y así estimar el grado de metaplasia escamosa (Murube, 2002).

Recientemente, se describió el uso de una nueva membrana de Biopore (Millicell-CM 0.4) para el diagnóstico de infecciones virales a nivel ocular. Las membranas de Biopore vienen en estuches individuales estériles que facilitan la toma de la muestra (Thiel, 1997) (Ver Figura 2) y evita los inconvenientes del papel de acetato de nitrocelulosa, como cortar, esterilizar las tiras y conseguir recipientes individuales para fijar y enviar al laboratorio. Además estas membranas brindan una buena adhesión de las células, evitan el background con las coloraciones, son transparentes cuando se humedecen permitiendo una mejor observación de las muestras (Thiel, 1997).

FIGURA 2. CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN UTILIZANDO MEMBRANAS DE BIOPORE.



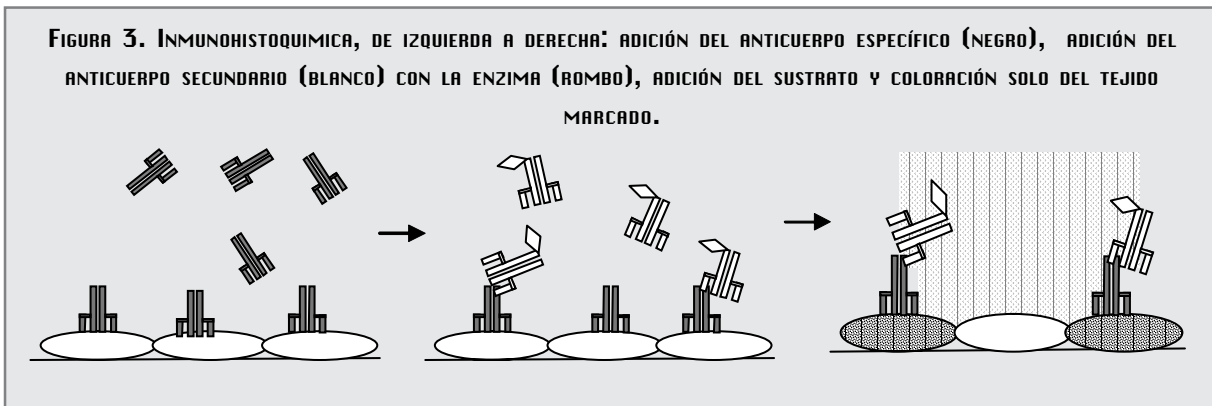
Fuente: Derek, 2001.

Desde su inicio, la citología de impresión ha sido utilizada para el estudio histológico mediante coloraciones, muchos investigadores han modificado la citología de impresión y la han utilizado en combinación con métodos inmunológicos y moleculares que son aplicados directamente sobre las membranas para la detección de antígenos de superficie, microbiológicos, ambientales, cancerígenos, inmunológicos entre otros (Thiel, 1997; Solomon, 2001). La aplicación de diversas técnicas sobre las membranas de Biopore pueden arrojar resultados entre 1 y 4 horas, de manera que podría llegar a ser una importante herramienta diagnóstica de rutina en la práctica optométrica y oftalmológica.

PRINCIPALES TÉCNICAS UTILIZADAS SOBRE LA CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN

INMUNOHISTOQUÍMICA

Esta técnica permite la visualización de antígenos mediante la aplicación secuencial de anticuerpos específicos dirigidos contra el tejido (anticuerpo primario), un anticuerpo secundario dirigido contra el primario y un complejo enzimático con un sustrato cromogénico, con pasos de lavados intercalados. La activación enzimática del cromógeno produce una reacción visible en el sitio donde esta presente el antígeno (véase Figura 3). Luego se puede contrateñir la muestra y cubrirla con un porta objeto. Los resultados se interpretan usando un microscopio óptico (Jonathan, 1994).



INMUNO FLUORESCENCIA

Al igual que la anterior, se utilizan anticuerpos monoclonales específicos frente al antígeno que se encuentra en una célula, tejido o impronta; la diferencia entre las dos radica en el sistema de revelado: en esta técnica la unión antígeno anticuerpo se visualiza con un colorante fluorescente o fluorocromo, los más utilizados son la fluoresceína y rodamina. Para visualizarlo es necesaria la lectura en un microscopio de fluorescencia (Kuby, 1997).

TÉCNICAS QUE UTILIZAN CÉLULAS COLECTADAS POR CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN

Las células recolectadas en las membranas o papel de filtro son aproximadamente 1×10^5 en total por cada membrana. Estas células pueden desprenderse del papel para ser utilizadas en otro tipo de técnicas como Citometría de Flujo, PCR, PCR reversa y otras.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Consiste en un sofisticado sistema que permite la separación, lectura y análisis de diferentes tipos celulares, organelos citoplasmáticos y cromosomas, cuya base y principio fundamental es la utilización de un adecuado fluorocromo.

El citometro de flujo permite separar grupos homogéneos de células de una población heterogénea; basándose en la cantidad de fluorocromo, las partículas con cierto grado de fluorescencia son desplazadas y separadas por el seleccionador de células. Este instrumento comprende una unidad que incluye el láser, detectores de emisión y un computador para el análisis de datos por graficas (Current protocols, 1992).

La citometría de flujo tiene una amplia gama de utilidades a nivel oftalmológico; permite el estudio de patologías de origen genético, inmunológico, hematológico y microbiológico entre otros.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica molecular de PCR, amplifica exponencialmente un fragmento específico de DNA extraído de las células, obtenidas de la superficie ocular, por citología de impresión. La reacción se realiza en un termociclador que denatura el DNA (95°C), permite la alineación del «*primer*» sobre la secuencia a estudiar (45°C - 55°C) y elonga la cadena durante el periodo de extensión (65°C - 72°C); este procedimiento se efectúa en forma repetitiva originando múltiples copias de la secuencia inicial. Esta técnica ofrece *sensibilidad* pues a partir de cantidades muy pequeñas de material genético se detecta la presencia de DNA viral, bacteriano, fúngico entre otros; *especificidad* debido a que, bajo

condiciones estrictas, se logra amplificar únicamente el DNA que se busca detectar; *velocidad* porque permite un procesamiento rápido si se compara con otras técnicas para detectar bacterias, hongos, parásitos y virus, que requieren la utilización de cultivos y finalmente se puede mencionar que ofrece *versatilidad*, ya que con el mismo fundamento, se permite el diagnóstico de diversas patologías. La PCR reversa tiene el mismo fundamento solo que se extrae RNA, se utiliza la enzima transcriptasa reversa y posteriormente se realiza la reacción en cadena de la polimerasa.

SÍNDROME DE OJO SECO

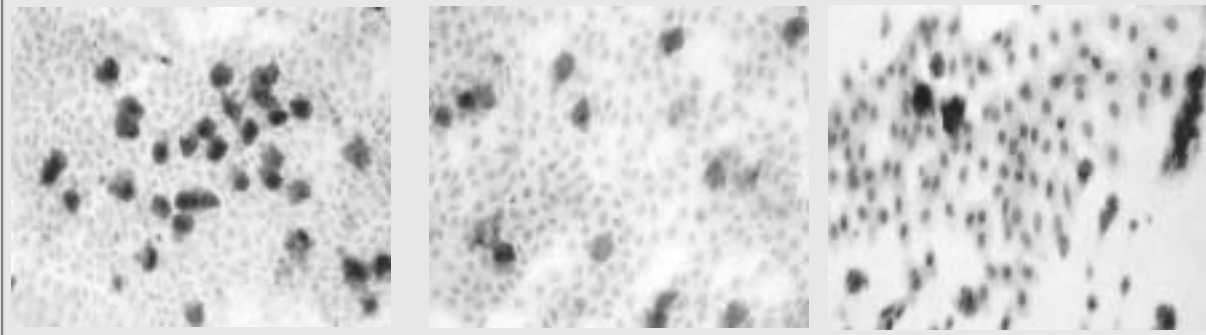
El síndrome de ojo seco es una de las enfermedades oculares más frecuentes todo el mundo (Albeitz, 2000); se le considera una condición multifactorial, caracterizada por la deficiencia en la cantidad o calidad de la película lagrimal y el daño en la superficie ocular por lo cual, también se le conoce como Keratoconjuntivitis Sica (KCS) (Albeitz, 2001).

Los síntomas más frecuentes de la enfermedad son: sensación de cuerpo extraño, es el síntoma patognomónico de la sequedad ocular, sequedad ocular: rara vez lo refiere el paciente, fluctuaciones de la visión o alteraciones esporádicas de la agudeza visual, visión de halos coloreados, ardor, prurito leve y fotofobia (Aguilar, 1999).

La deficiencia en cualquier componente de la película lagrimal es el factor que desencadena el daño en la superficie ocular. Esto produce metaplasia escamosa, que puede ser graduada por citología de impresión con coloración de PAS en 6° (véase Figura 4) que se correlacionan directamente con los grados de severidad clínica. Las características citológicas más importantes para la clasificación de metaplasia escamosa son las siguientes:

- ◆ **Grado 0.** El epitelio conjuntival es normal, con moderado o abundante número de células caliciformes dispuestas entre las células epiteliales no secretoras. El citoplasma es eosinófilo. La proporción núcleo/citoplasma es de 1/1.
- ◆ **Grado 1.** Disminución marcada y temprana de células caliciformes. Las células epiteliales no secretoras presentan un leve alargamiento. El citoplasma es eosinófilo. La relación núcleo/citoplasma es de 1/2 a 1/3. No existe queratinización.
- ◆ **Grado 2.** Pérdida total de células caliciformes. Las células epiteliales presentan un moderado alargamiento y aplastamiento. El citoplasma es eosinófilo-basófilo. La relación núcleo/citoplasma es de 1/4. No existe queratinización.
- ◆ **Grado 3.** Todas las células epiteliales presentan una pronta y leve queratinización; algunas células tienen visibles filamentos de queratina. El citoplasma sufre un moderado aplanamiento, y es metacromático. En este estado aparecen células con núcleos levemente picnóticos. La relación núcleo/citoplasma es de 1/6.
- ◆ **Grado 4.** Las células epiteliales son de gran tamaño, alargadas y presentan una moderada queratinización; muchas de ellas con densos paquetes de filamentos de queratina y núcleos picnóticos. El citoplasma es metacromático, tendiendo a ser basófilo. La relación núcleo/citoplasma es de 1/8.
- ◆ **Grado 5.** Las células epiteliales presentan una avanzada queratinización, con densos paquetes de filamentos de queratina y núcleos marcadamente picnóticos o ausentes. El citoplasma es basófilo (Murube, 2002).

FIGURA 4. CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN DE CONJUNTIVA EN SUJETOS NORMALES Y PACIENTES CON OJO SECO. DE IZQUIERDA A DERECHA: GRADO 0, GRADO 1 Y GRADO 2. SE OBSERVA LA PERDIDA GRADUAL DE LAS CÉLULAS CALICIFORMES (MÁS OSCURAS), EL AUMENTO DE TAMAÑO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES Y MAYOR SEPARACIÓN ENTRE ELLAS.



Fuente: Murube, 2002.

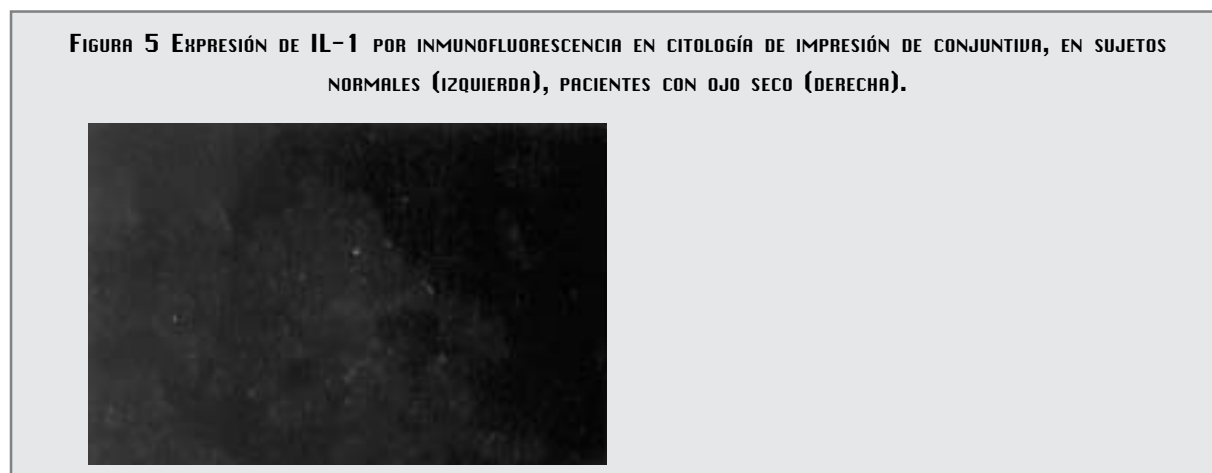
En los pacientes con ojo seco se han medido varios tipos de marcadores inmunológicos como complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, moléculas de adherencia, citoquinas y β -defensinas en citología de impresión para corroborar la

presencia del proceso inflamatorio en esta enfermedad (Solomon, 2001; Brignole, 2000).

La Interleukina 1 (IL-1) es un importante mediador inflamatorio que ha sido implicado en la patogénesis

de enfermedades inflamatorias, por modular la expresión de otras citocinas, moléculas de superficie y que conllevan a la migración de los leucocitos a la superficie ocular. En un estudio se determinó el incremento de IL-1 en lagrimas, biopsia y citología de impresión de conjuntiva

(véase Figura 5), demostrando que en los pacientes con ojo seco hay un marcado incremento en epitelio conjuntival (en biopsia y citología de impresión) sugiriendo que este puede ser el origen del aumento de esta citokina en lágrimas (Solomon, 2001).



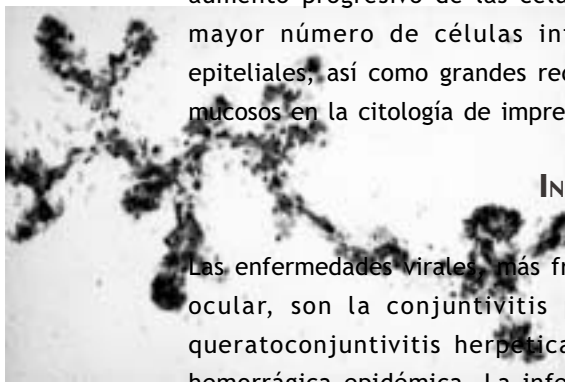
Fuente: Solomon, 2001.

La IL-1 aumenta la expresión de otras moléculas como las β -defensinas, estas proteínas son péptidos antimicrobianos que se expresan de forma basal siendo importantes porque reducen el riesgo de infecciones conjuntivales y corneales; por otra parte, regulan la producción de citoquinas, median quimiotaxis y estimulan la liberación de histamina por mastocitos. Srihari, N. *et al.*, 2003 realizaron un estudio en 9 pacientes con síndrome de ojo seco con el fin de determinar la expresión de β -defensinas en células obtenidas por citología de impresión y compararon la expresión de estas moléculas en 8 individuos sanos. Los autores hicieron énfasis en hBD-1 (expresadas constitutivamente en cornea y conjuntiva) hBD-2 y hBD-3 (inducidas por citoquinas proinflamatorias y por productos bacterianos), como en los pacientes con enfermedad de ojo seco se aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias, se

requería determinar si había una expresión diferencial de β -defensinas en comparación con personas sanas. Se observó que las β -defensinas no tienen el mismo espectro antibacteriano ni la misma expresión: hBD-1 y hBD-3 son protección base mientras que hBD-2 puede ampliar el espectro de protección. A partir de los resultados obtenidos en los pacientes y controles los autores determinan que como hBD-2 puede jugar un papel quiotáctico en la mediación del incremento de las subpoblaciones de células T observadas en los pacientes; al estimular la liberación de histamina para permitir la presencia de signos y síntomas de irritación ocular; se puede concluir que la hBD-2 tiene dos roles en los pacientes: 1) Brindar protección antimicrobiana (Positivo) y 2) Contribuir al daño de la superficie ocular (Negativo) (Srihari, *et al.*, 2003).

PENFIGO CICATRICIAL OCULAR

El penfigo cicatricial es una enfermedad autoinmune que se manifiesta mediante inflamación y la presencia de vesículas que forman ampollas en las distintas mucosas corporales, principalmente en la oral y ocular. El siguiente paso es la cicatrización de estas mucosas. En el penfigo cicatricial ocular, la cicatrización progresa hasta la queratinización total del epitelio córneo-conjuntival. A nivel ocular, la consecuencia más grave de esta enfermedad es la ceguera (Pepouse, 1996). En la mayoría de los pacientes pasa desapercibido el inicio de la enfermedad tanto para dermatólogos, como para oftalmólogos. El estudio histopatológico e inmunohistoquímico sobre citología de impresión ha mostrado contribuir al reconocimiento temprano de la enfermedad. Los pacientes con penfigo cicatricial ocular presentan una disminución progresiva de la densidad de células caliciformes, aumento progresivo de las células inflamatorias mayor número de células inflamatorias que epiteliales, así como grandes redes de filamentos mucosos en la citología de impresión (Sanz, 2001).



INFECCIONES VIRALES

Las enfermedades virales más frecuentes, a nivel ocular, son la conjuntivitis por adenovirus, queratoconjuntivitis herpética y conjuntivitis hemorrágica epidémica. La infección por herpes simple en cornea es reconocida clínicamente sin requerir confirmación del laboratorio; sin embargo, en algunos casos, el diagnóstico se hace difícil y es necesario diferenciarlo de lesiones no herpéticas, tales como pseudodendritas, causadas por varicella-zoster (Pepouse, 2000). En estas situaciones se requiere confirmar el diagnóstico por el laboratorio

mediante la detección de antígenos virales por inmunohistoquímica en biopsia o raspados de las lesiones; esta manipulación mecánica para la toma de la muestra, muchas veces ocasiona daño del tejido.

Algunos investigadores han comprobado el éxito de la detección de antígenos virales en infecciones oculares por medio de inmunohistoquímica en muestras tomadas con citología de impresión, demostrando que con este tipo de muestras se obtiene replicas exactas de la lesión corneal (Figura 6) sin daño del epitelio corneal y con una alta sensibilidad (Nakagawa, 1993; Thiel, 1997).

FIGURA 6: KERATITIS HERPÉTICA. CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN DE UNA LESIÓN DENDRÍTICA CORNEAL COLOREADA POR INMUNOHISTOQUÍMICA.

Fuente: Thiel, 1997.

Finalmente, la citología de impresión ha sido utilizada también en la investigación de alergias, neoplasias e inflamación de la superficie ocular. Esta técnica podría constituir una valiosa ayuda en el diagnóstico y por lo tanto en el tratamiento adecuado de los desordenes de la superficie ocular (Baudoinc, 1992, Dereck M, 2001).

BIBLIOGRAFÍA

- Albietz, J. «Prevalence of dry eye subtypes in clinical optometry practice». *Optometry Vis Sci*, (2000): 357-363.
- - -. «Dry eye an update on clinical diagnosis, management and promising new treatments». *Clinical and experimental optometry*, (2001): 4-18.
- Aguilar, A. *Ojo seco: Manual sobre fisiopatogenia, diagnóstico y tratamiento*. Buenos Aires: Ediciones Científicas Argentinas, 1999.
- Brignole, F. y Cols, «Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes». *Invest Ophthalmology Vis Sci*, (2000): 1356-1363.
- Jayat, C. y Ratinaud, M. *Cell cycle analysis by flow cytometry: Principles and Applications*. *Biology Cell* 82(4), 1993.
- Jonathan, M. y Kathryn, J. *Principles of Cellular and Molecular Immunology 2 Edición*, New York: Oxford University Press, 1994.
- Leerjonhson, R. «Flow cytometry. From research to clinical laboratory, applications». *Clinic Laboratory and Medic* 13, (1993): 831-852.
- Leonce, S. Burbribge, M. «Flow Cytometry: A useful technique in study of multidrug resistance». *Biology Cell*, 78, (1993): 63-68.
- Less, O. y Drouet, M. «Clinical applications of flow cytometry in hematology and immunology». *Biology Cell*, 78 (1993): 73-78.
- Lopez, J. «Cell surface receptor quantitation in ocular cells by and immunocytochemical flow cytometry technique». *Investigation ophthalmology vision science* 33, (1993): 2053-2062.
- Pepose, J.; Holland, G.; Wilhelms, K. *Ocular infection and immunity*. Mosby, 1996.
- Srihari, N.; Miller, W. y McDermott A. «Expression of human b-defensins in conjunctival epithelium: relevance to dry eye disease». *Investigative Ophthalmology and visual science* 44 (2003): 3795-3801.
- Solomon, A.; y Cols, «Pro and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry eye disease», *Invest Ophthjalmol Vis Sci*, (2001): 2283-2292.