

Collana di Cito-Istopatologia
Diretta e Coordinata da Gian Luigi Taddei
Dipartimento di Patologia Umana e Oncologia, Firenze

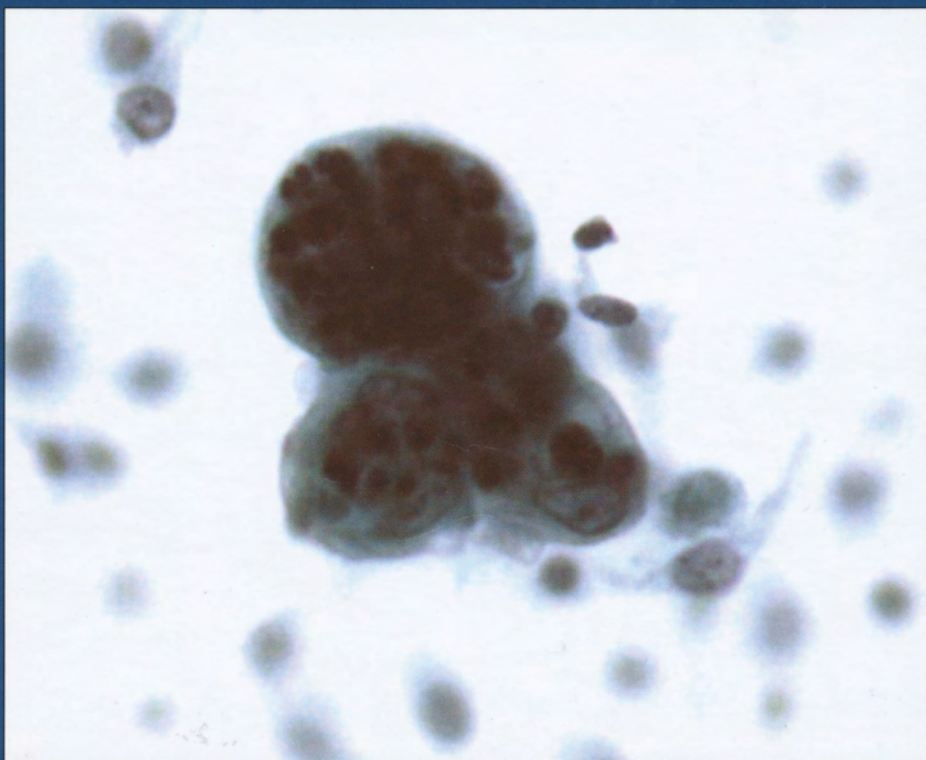


Gian Luigi Taddei

Anna Maria Buccoliero

ATLANTE DI CITOLOGIA ENDOMETRIALE

*L'endometrio normale, iperplastico e
neoplastico nella citologia in fase liquida*



SEE - FIRENZE

L'ESAME CITOLOGICO ENDOMETRIALE

L'esame citologico endometriale può essere effettuato su prelievo cervico-vaginale o su prelievo endometriale diretto.

Prelievo endometriale diretto

Il prelievo endometriale diretto è da preferirsi. È noto infatti, che anche in presenza di patologia endometriale può mancare il passaggio significativo di cellule endometriali naturalmente desquamate a livello cervico-vaginale. Inoltre, i fenomeni degenerativi cui vanno incontro le cellule naturalmente esfoliate possono renderne difficile l'interpretazione. Ciò nonostante, la sola presenza durante la menopausa nel prelievo cervico-vaginale di cellule endometriali è sospetta per patologia endometriale anche in assenza di atipie cito-architetture.

Il prelievo endometriale diretto può essere ottenuto con tre metodi:

1. *aspirazione* (mediante una cannula con dei fori di raccolta cui viene applicata una forza aspirante)
2. *lavaggio* (introduzione all'interno della cavità uterina di una soluzione salina successivamente aspirata)
3. *spazzolamento* (irregolarità della superficie di prelievo del dispositivo provocano abrasione endometriale e conseguente prelievo cellulare).

In ogni caso, qualunque metodo e specifico dispositivo si usi, l'obiettivo finale deve essere un adeguato campionamento endometriale che comprenda il fondo uterino e gli angoli tubarici, sedi frequentemente interessate dall'adenocarcinoma endometriale, con minima contaminazione endo-esocervicale. A tale ultimo scopo si rivelano particolarmente efficaci i **dispositivi dotati di "camicia" retraibile** (Fig. 1.1).

Prelievo endometriale mediante spazzolamento

Visualizzata la portio con lo speculum, si deterge la mucosa cervico-vaginale con un batuffolo imbevuto di soluzione fisiologica. Si afferra quindi la cervice con la **pinza di Pozzi** esercitando una leggera trazione per ridurre la flessione e versione dell'utero. Senza dilatare il canale cervicale si inserisce il dispositivo all'interno della cavità uterina ruotandolo per ottenere uno spazzolamento dell'endometrio.

Se il dispositivo è dotato di "camicia" quest'ultima dovrà essere posizionata in modo da nascondere la parte abrasiva sia al momento dell'inserimento che al momento dell'estrazione del dispositivo stesso dalla cavità uterina (Fig. 1.2).

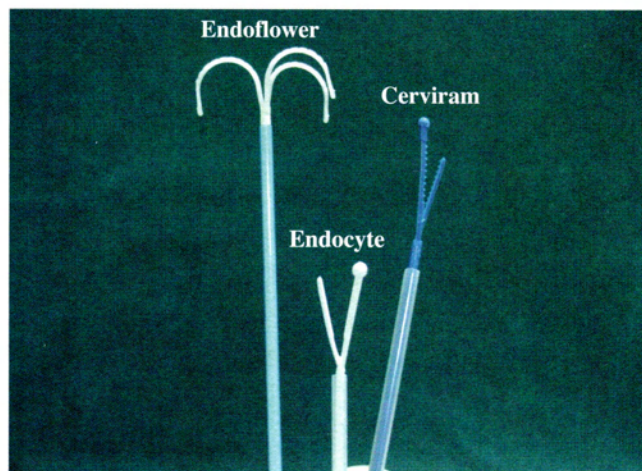


Fig. 1.1 - Dispositivi per prelievo citologico endometriale mediante spazzolamento dotati di "camicia" retraibile (la "camicia" è retratta con esposizione delle superfici di prelievo)

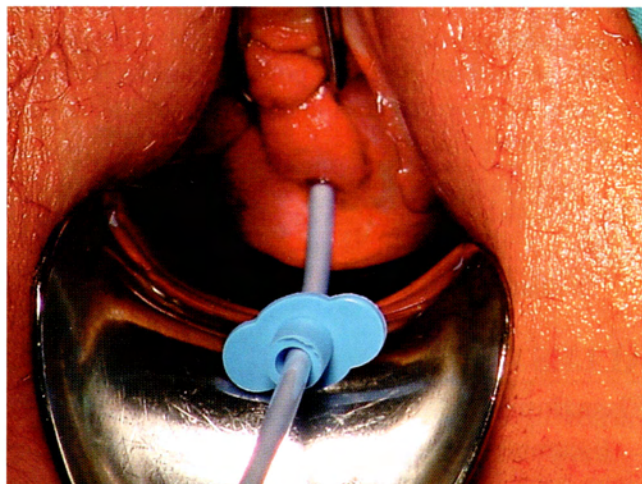


Fig. 1.2 - Visualizzata la portio con lo speculum, si afferra la cervice con la **pinza di Pozzi** e si inserisce il dispositivo all'interno della cavità uterina ruotandolo per ottenere uno spazzolamento dell'endometrio.

Per limitare la contaminazione cervicale la "camicia" deve essere infatti retratta solo in cavità endometriale.

Dopo l'estrazione del dispositivo dalla cavità uterina la "camicia" deve essere prima pulita con una garza per eliminare la cellularità cervicale ad essa adesa e solo successivamente retratta.

Il dispositivo su cui è adeso il materiale endometriale viene quindi immerso in una soluzione di trasporto con proprietà fissative e ruotato più volte all'interno di essa per favorire il rilascio del materiale prelevato ed infine allontanato da quest'ultima (Fig. 1.3).

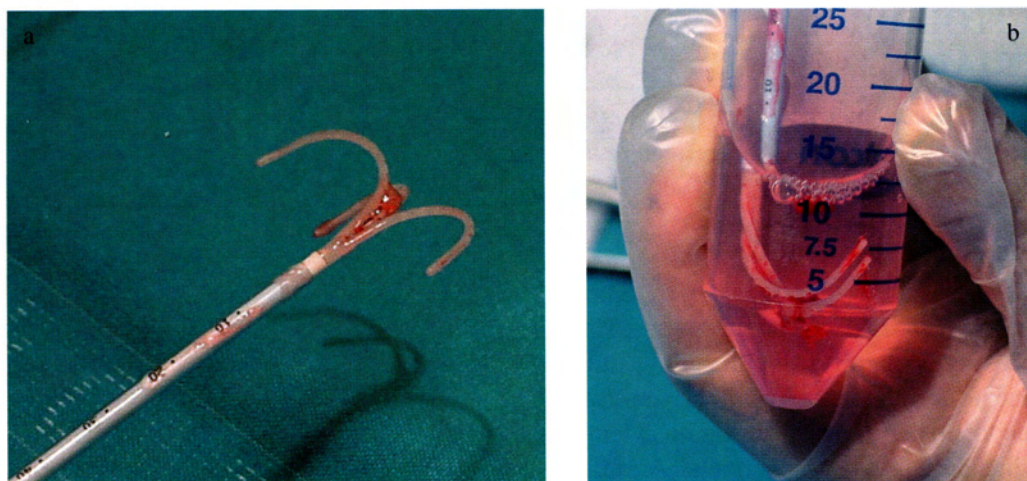


Fig. 1.3 - a) Dopo l'estrazione dalla cavità uterina la "camicia" viene retratta. b) Il dispositivo con adeso il materiale endometriale prelevato viene ruotato più volte all'interno della soluzione di trasporto per favorire il rilascio delle cellule

Nelle donne in età fertile è consigliabile eseguire l'esame citologico durante la fase secretiva intermedia o tarda per evitare eventuali possibili problemi di diagnostica differenziale tra l'endometrio proliferativo e l'iperplasia endometriale.

Nelle nullipare e nelle donne in post-menopausa può talora essere opportuno verificare preliminarmente la presenza di una eventuale stenosi del canale cervicale con un dilatatore di piccolo calibro.

ALLESTIMENTO

Fissazione e processazione

Il **campione endometriale** subito dopo il prelievo viene, come già ricordato, adeguatamente stemperato in una soluzione di trasporto alcolica con proprietà fissative che lo mantiene inalterato e analizzabile per alcuni giorni e quindi inviato al laboratorio di citologia.

In laboratorio il campione viene concentrato mediante centrifugazione e poi risospeso in una più specifica soluzione fissante; quando presenti, si eliminano sangue e muco attraverso lavaggi ottenuti mediante il susseguirsi di centrifugazione e risospensione in N-Acetil-L-cisteina allo 0,2% (mucolisi; prima della fissazione) e/o Acido Acetico al 10% (emolisi; previa fissazione) (Fig. 1.4). La risospensione ottenuta mediante una energica agitazione in vortex assicura inoltre l'omogeneizzazione del campione. Un efficace trattamento di emo-mucolisi e di omogeneizzazione è fondamentale in quanto condiziona la qualità finale del preparato citologico che dovrà risultare completamente libero da elementi inquinanti e rappresentativo di tutte le componenti cellulari prelevate.

Le fasi successive avvengono in maniera automatizzata o semi-automatizzata nei diversi apparecchi processori (Fig. 1.5).

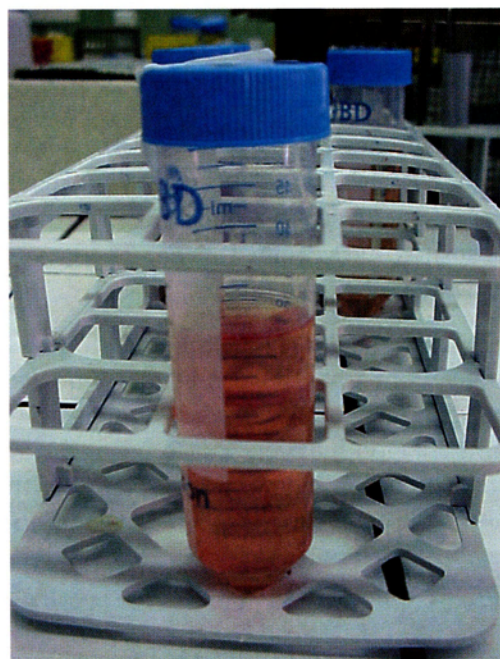


Fig. 1.4 - Presenza di sangue nel campione

In ogni caso una frazione cellulare rappresentativa dell'intero campione viene trasferita su di una limitata area del vetrino portaoggetto di dimensioni e forma variabili.

Il preparato viene fissato in etanolo al 95% per 10 min. e successivamente colorato.

Il materiale residuo è disponibile per l'allestimento di ulteriori preparati o indagini supplementari

Colorazione

La colorazione più idonea è quella di *Papanicolau* con tecnica progressiva cui sono state apportate alcune modifiche per migliorare la risoluzione dei dettagli nucleari (Tab. 1.1).

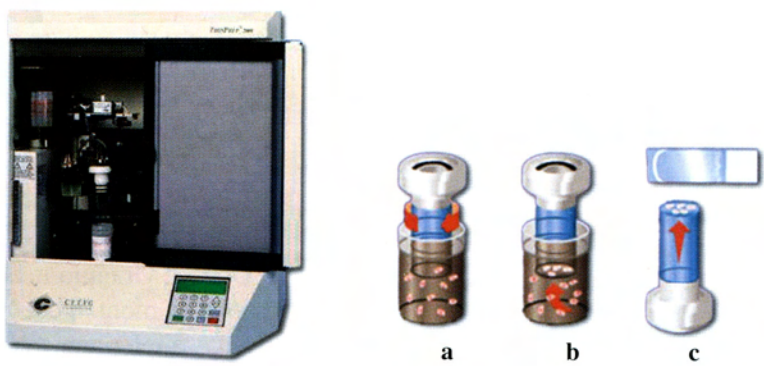


Fig. 1. 5 - Allestimento dei preparati citologici in fase liquida: principi generali secondo la metodica ThinPrep®. Il materiale endometriale, posto in una specifica soluzione di trasporto con proprietà emolitiche, proteolitiche oltre che fissative, viene prima concentrato mediante centrifugazione e poi risospeso in una più specifica soluzione fissante. Successivamente il campione viene trasferito nell'apparecchio processore entro cui avviene l'allestimento del vetrino attraverso una fase di dispersione delle cellule tramite la rotazione del filtro nel campione (a) seguita dalla raccolta delle stesse sulla membrana del filtro mediante una pressione negativa (b) e dal loro successivo trasferimento sul vetrino (c).

TAB. 1.I - COLORAZIONE DI PAPANICOLAU: METODICA PER CITOLOGIA ENDOMETRIALE		
Step	Trattamento	Durata
1	Alcool 90°	2 min.
2	Alcool 70°	2 min.
3	H ₂ O	3 min.
4	Ematossilina di Harris	4 min.
5	H ₂ O	4 min.
6	Alcool acido*	5 sec.
7	H ₂ O	2 min.
8	Soluzione di Scott**	30 sec.
9	H ₂ O	1 min.
10	Alcool 90°	2 min.
11	Orange G	5 min.
12	Alcool 90°	15 sec.
13	Alcool 90°	15 sec.
14	EA50	4 min.
15	Alcool 90°	15 sec.
16	Alcool assoluto	1 min.
17	Xilene	3 min.
18	Xilene	3 min.

* Alcool Acido 1% HCl in Alcool 70°
** Soluzione di Scott 0, 35% Sodio Bicarbonato, 1% Magnesio Solfato

L'idratazione e la disidratazione sono ottenute attraverso passaggi in alcool etilico scalare.

I coloranti utilizzati sono l'Ematossilina di Harris come colorante nucleare e l'Orange G e l'EA50 come coloranti citoplasmatici. La chiarificazione è ottenuta con xilene. Per il montaggio del coprioggetto viene usato un montante contenente xilene.

Immunocitochimica

Il preparato citologico viene allestito su vetrini portaoggetto dedicati seguendo i procedimenti precedentemente descritti.

Dopo la fissazione in etanolo al 95% il preparato viene immerso per 10 volte in una ulteriore soluzione fissativa contenente metanolo specifica per preparati citologici al fine di preservare in maniera ottimale la morfologia e l'immunofenotipo.

Il vetrino viene poi asciugato a temperatura ambiente per 12 ore e quindi reidratato in PBS (Tampone fosfato salino, pH 7.4) per 15 min.

Il recupero antigenico, se previsto nel protocollo, è lo stesso utilizzato nella reazione immunoistochimica. Può essere applicato uno dei seguenti trattamenti:

- enzimatico (es. Proteasi, Pepsina, etc.)
- forno a microonde a 98 °C in:
 - Tampone Citrato a pH 6.0
 - TEC (Tris-EDTA-Citrato) a pH 7.8
 - EDTA (Acido EtilenDiaminoTetraAcetico) a pH 8.0 con successivo raffreddamento a temperatura ambiente per 20 min.

L'inibizione delle perossidasi endogene si ottiene immergendo le sezioni in una soluzione di perossido di idrogeno allo 0.3% in acqua distillata per 10 min. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

L'incubazione dell'anticorpo primario si esegue con gli stessi tempi e temperature previsti nella reazione immunoistochimica. Di contro, per limitare la presenza di colorazioni di fondo aspecifiche, si suggerisce una più alta diluizione dell'anticorpo primario.

La reazione immunocitochimica può essere evidenziata applicando uno dei seguenti **protocolli**:

- *sistema Streptavidina-Biotina-Perossidasi* (due step da 10 min. l'uno);
- *sistema Streptavidina-Biotina-Fosfatasi* (due step da 10 min. l'uno);
- *Polimero di Destrano o Carbossilico* (un solo step da 30 min.).

La positività della reazione viene rilevata con il cromogeno relativo al **sistema di rivelazione** usato:

- DAB (3-3' - diaminobenzidina) o AEC (3-amino-9-etil-carbazolo) per l'immunoperossidasi;
- *New Fuchsin* o BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato/nitro blu di tetrazolio) per l'immunofosfatasi.

I nuclei sono controcolorati con Ematossilina di Mayer per 3-4 min.

Dopo il viraggio in acqua di fonte i vetrini vengono disidratati, montati con mezzi di montaggio contenenti xilene o direttamente sigillati con un montante acquoso.