

Estudio citológico de efusiones

Cytology study of effussion

Vet. Pablo Cigüenza del Ojo (LV, GPCert oncology, Acred. AVEPA oncología)

Onkos- Servicios Oncológicos veterinarios; E-mail: info@onkos.es

Palabras clave: derrame, ascitis, trasudado, trasudado modificado, exudado, citología, PAAF, FNA

INTRODUCCIÓN

Cuando nos referimos a “citología de fluidos” hacemos referencia al estudio del contenido celular presente en el fluido acumulado en las cavidades primarias del cuerpo, las cuales son la pericárdica, torácica y la abdominal.

En condiciones normales estas cavidades presentan una escasa concentración de fluido cuya función es permitir el movimiento de los órganos internos. Están recubiertas por células mesoteliales, encargadas de la homeostasis, la cual, a su vez, depende de un equilibrio entre la producción de fluido y el drenaje linfático, cuando este falla, se produce una “efusión” o acúmulo anormal de fluido.

De cara a su estudio, para obtener la mayor información posible, se realiza un primer estudio laboratorial, donde se valora la concentración de proteínas, el recuento de células nucleadas, así como estudios bioquímicos (medición de creatinina o bilirrubina, colesterol fundamentalmente), y un cultivo.

Una vez hecho este estudio laboratorial podremos realizar el citológico de las células

presentes (mesoteliales, neutrófilos, linfoides, neoplásicas...). En muchas ocasiones estos fluidos presentan una reducida concentración de ellas, siendo necesario siempre su centrifugación previa, y a ser posible, usando una cito centrifugadora antes que una centrifugadora convencional, ya que esta última no será capaz, fundamentalmente en los trasudados, de concentrar las pocas células presentes, dificultando sobremanera el estudio citológico.

ESTUDIOS LABORATORIALES

1. Recuento de proteínas

Se puede medir mediante bioquímica o mediante el uso del refractómetro. Cuando utilicemos este último método, hay que tener en cuenta que, ante efusiones turbias, opacas, es necesario centrifugar la muestra y determinar la concentración de proteínas del sobrenadante, ya que, de lo contrario, las partículas en suspensión no proteicas (glucosa, urea, colesterol...) alteran la refracción de la luz dando una lectura errónea.

2. Recuento de células nucleadas

Junto con la concentración de proteínas podremos determinar el grado de inflamación existente en el fluido y su clasificación (**Tabla 1**). Para su medición emplearemos una muestra conservada en EDTA y la pasaremos por el analizador de hemograma, de tal manera que obtendremos la concentración y distribución de cada uno de los tipos celulares.

3. Cultivos microbiológicos

Siempre es recomendable hacer un cultivo bacteriano y fúngico, para ello es imprescindible no usar tubos que contengan EDTA, ya que este es bactericida/bacteriostático. Lo recomendable es utilizar los medios de soporte con medios de cultivo que facilite el laboratorio.

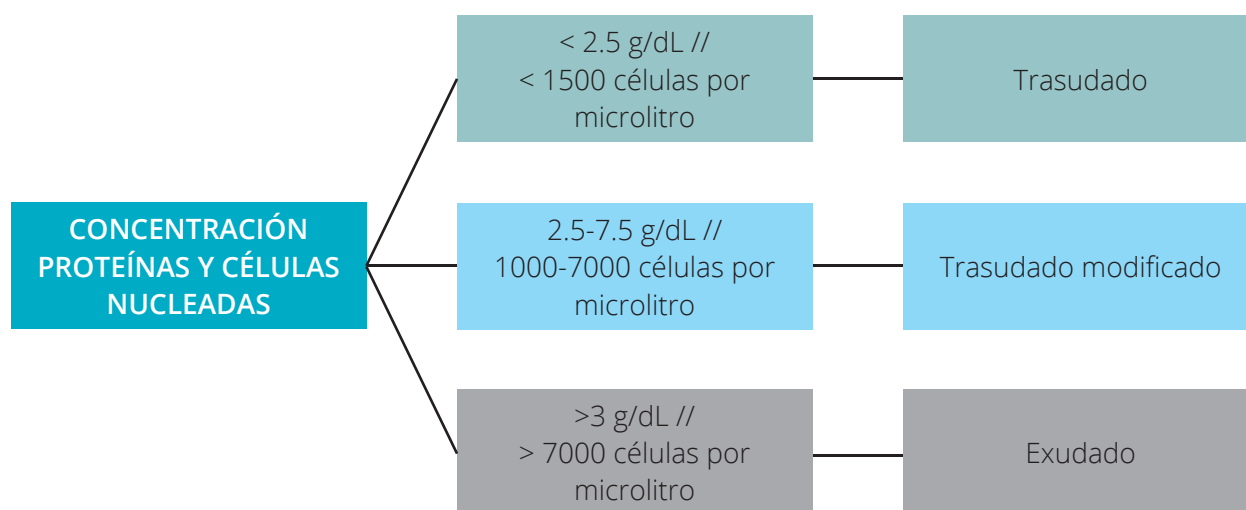


Tabla 1. Clasificación de efusiones

ESTUDIOS CITOLÓGICOS: IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MÁS FRECUENTES

1. Mesoteliales

Estas células recubren la superficie de la pleura, pericardio, peritoneo y de las vísceras, de tal manera que, en un número variable, (en función de la patología y cronicidad del proceso) estarán presentes en las efusiones.

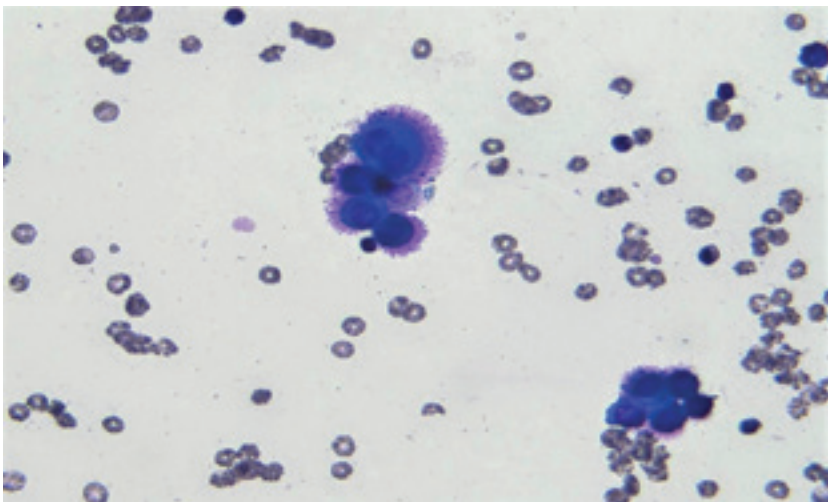
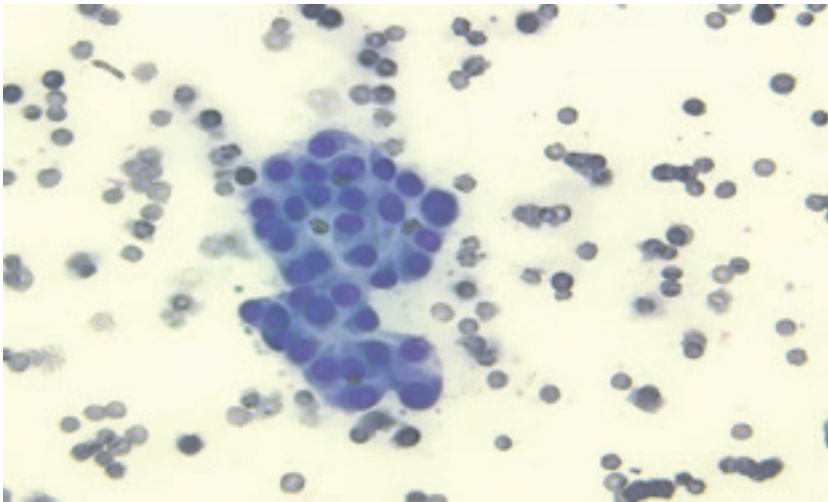
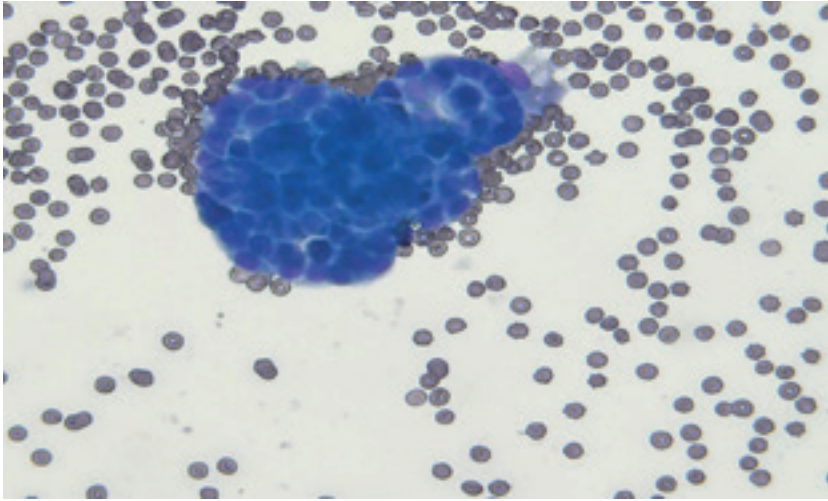
Cuando se encuentran en reposo estas células forman grupos compactos, normalmente presentan una corona eosinófila, tienen una ratio N:C muy elevada, con un citoplasma no vacuolizado, intensamente basófilo, con un núcleo redondo central y de cromatina compacta. Cuando se activan, estas células se distribuyen de manera individual y la ratio N:C se va invirtiendo, el citoplasma perderá gradualmente su basofilia, irán apareciendo vacuolización y pueden presentar multinucleaciones de manera recurrente, con patrones de cromatina irregular y nucléolos prominentes. Además, se verán invaginaciones citoplasmáticas.

Cuando se vuelven neoplásicas veremos un incremento severo en su concentración, el número de displasias celulares/poblaciones y nucleares son muy elevadas, hasta el punto de que podremos ver cinco criterios de malignidad nuclear (anisocariosis, cariomegalia, cromatina irregular, nucléolos prominentes, hipernumerarios, heterogéneos y gigantes).

Imágenes 1, 2 y 3.

2. Neutrófilos

Los veremos fundamentalmente en efusiones de origen inflamatorio. En esta localización es imprescindible determinar si están degenerados o intactos. En el primer caso suelen producirse cambios degenerativos hidrópicos, los cuales son provocados por toxinas que provocan la entrada de agua en la célula y en el núcleo, este último se hincha, pierde intensidad cromática y acaba rompiéndose a modo de hebras nucleares, estos procesos suelen asociarse a agentes infecciosos.



Imágenes 1, 2 y 3. Grupos de mesoteliales en reposo, observe la presencia de corona eosinofílica y las invaginaciones del citoplasma.

Cuando no se encuentran degenerados, estos presentan signos derivados del envejecimiento celular, y no de muerte aguda, acaban siendo hipersegmentados, y finalmente, fagocitados por macrófagos. Normalmente su presencia se asocia a efusiones no sépticas, pero, algunos agentes que generan pocas toxinas, y por tanto una degeneración hidrópica leve, pueden dar este tipo de efusiones (*Actinomyces spp*, *Ehrlichia spp*, *Toxoplasma spp*).

Imagen 4.

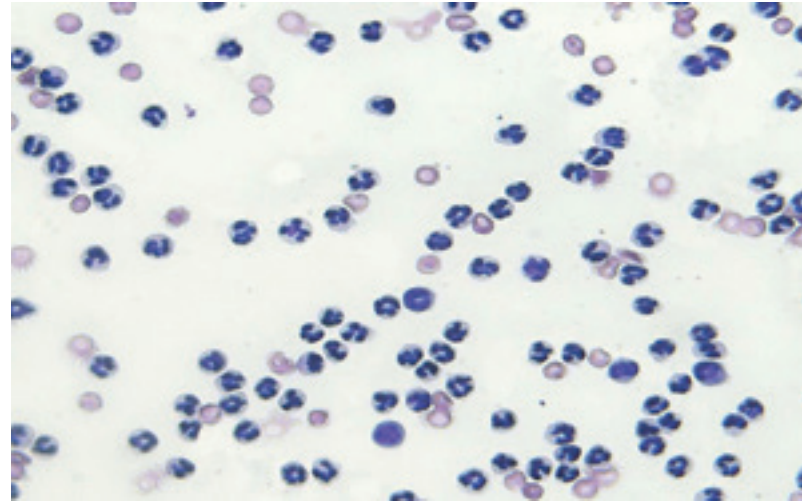


Imagen 4. Población de polimorfonucleares neutrófilos no degenerados en un paciente canino de 14 años.

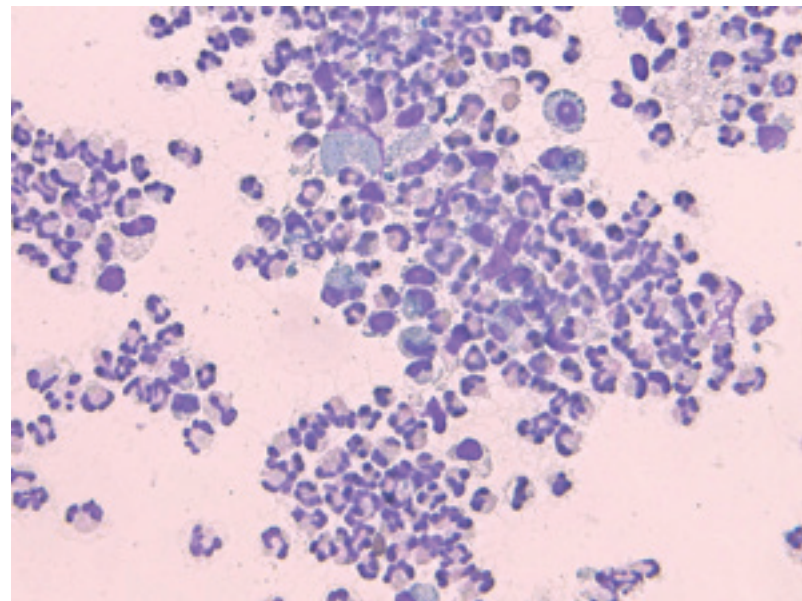


Imagen 5. Presencia de macrófagos vacuolizado con restos celulares fagocitados.

3. Macrófagos

Suelen ser vacuolizados, con diferente grado de presencia de material fagocitado en su interior, pueden ser multinucleados.

Imagen 5.

4. Linfocitos

Una de las células más frecuentes con las que nos encontramos en las efusiones, y son la población predominante en las de tipo quiloso, así como en las linfocíticas. En este caso son heterogéneas entre sí, distinguiéndose de tipo linfocítico o célula pequeña/intermedia, este hecho es importante para poder distinguirlas de efusiones linfoides malignas en donde podremos ver una marcada homogeneidad, normalmente con marcadas displasias nucleares (formas convolutas, algunas en forma de trébol, con patrones irregulares de cromatina) así como mitosis aberrantes.

Imágenes 6 y 7.

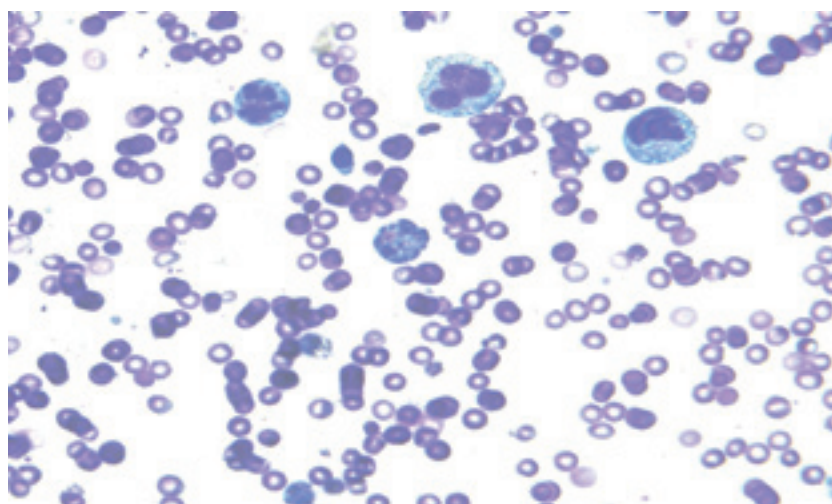
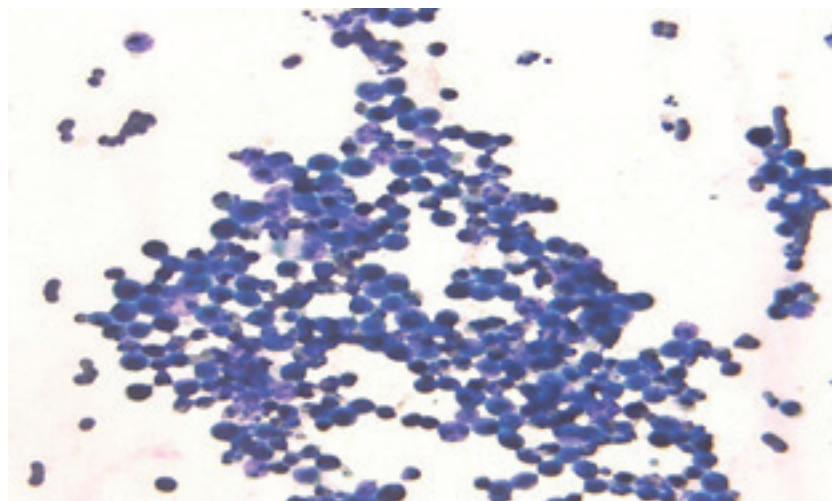
5. Eosinófilos

No son frecuentes, si se evidencian (células del grupo polimorfonuclear, con estructuras eosinófilas en su interior) en alto número nuestro diferencial debe incluir enfermedades parasitarias, alergias, hipersensibilidad, signo paraneoplásico de un mastocitoma fundamentalmente.

Imagen 8.

6. Eritrocitos

Su presencia puede ser por contaminación o como signo de un sangrado. Cuando es por sangrado no se aprecian plaquetas, podremos observar fenómenos de eritrofagocitosis, pigmento de hematoidina y hemosiderina.



Imágenes 6 y 7. Imagen 6- Presencia de un derrame linfoide no displásico en paciente felino de 1 año. Imagen 7- Derrame linfoide maligno en perro de 12 años con linfoma linfoblástico multicéntrico.

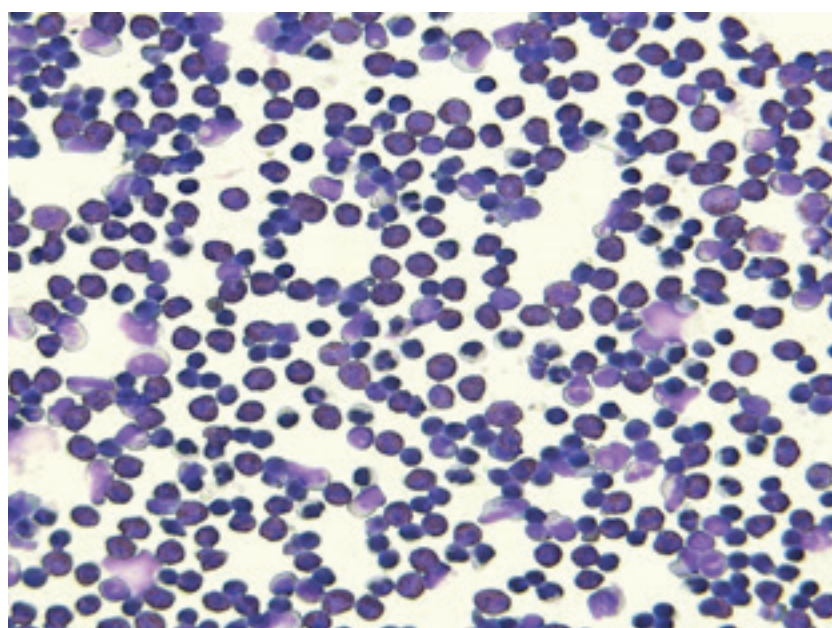
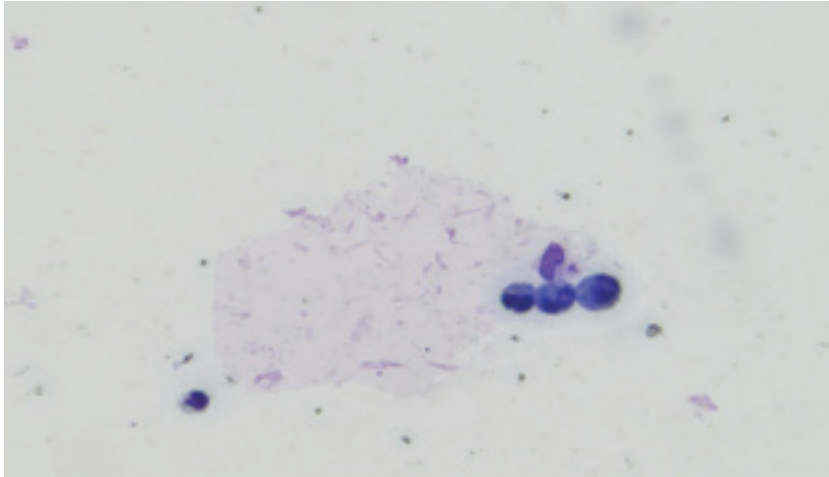
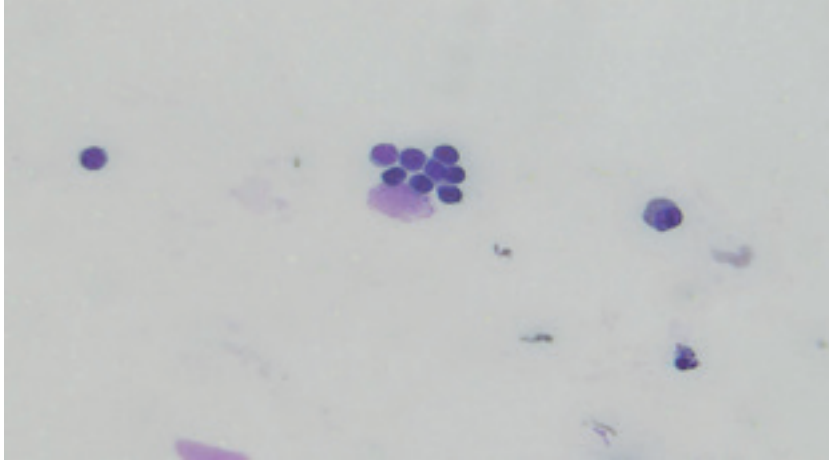
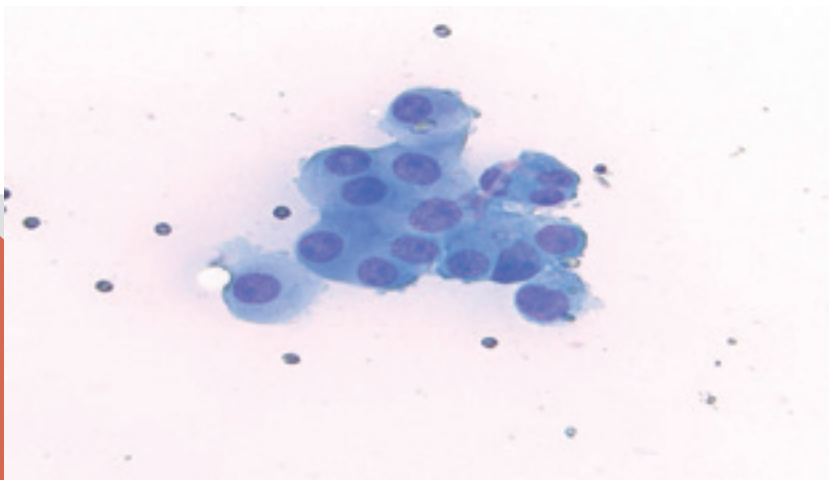
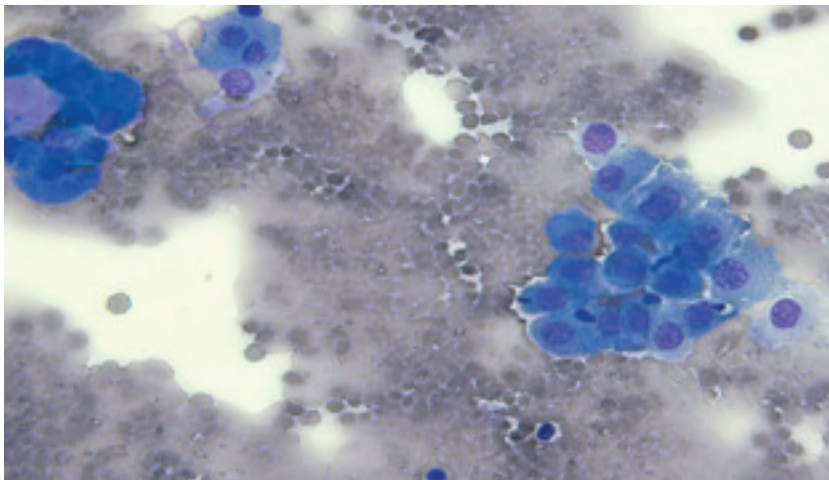


Imagen 8. Eosinofilia en derrame paraneoplásico por mastocitoma.



Imágenes 9 y 10. *Trasudado puro en paciente canino cardiópata. Observe la presencia de linfocitos, neutrófilos no degenerados y aislados macrófagos.*



Imágenes 11 y 12. *Imágenes de trasudado modificado en donde se evidencia una elevada celularidad de mesoteliales en reposo y levemente activadas.*

CLASIFICACIÓN GENERAL DE LAS EFUSIONES (valorando proteínas y celularidad)

1. Trasudado

Fluidos con una concentración de proteínas inferior a 2 g/dl y menos de 1500 células nucleadas por microlitro. Normalmente son fluidos transparentes, sin densidad, sin partículas en suspensión.

Las células que normalmente son detectadas son mononucleares, es decir, linfocitos y macrófagos, así como escasas mesoteliales, y, en menor número, neutrófilos.

Entre las principales causas se describen la hipoproteïnemia, fundamentalmente hipoalbuminemia, nefropatía y enteropatía perdedora de proteínas, insuficiencia hepática, síndrome de malnutrición/malabsorción, hipertensión portal e insuficiencia cardíaca.

Imágenes 9 y 10.

2. Trasudados modificados

En esta ocasión la concentración de proteínas es superior a 2 g/dl y las células son inferiores a 5000 nucleadas por microlitro. La transparencia, densidad y turbidez, así como la presencia o no de material en flotación es muy variable.

Veremos una concentración mayor, que, en los trasudados puros, de células mesoteliales (reactivas), neutrófilos y macrófagos, linfocitos pequeños.

Las causas que lo provocan son fallo cardíaco e hipertensión portal.

Imágenes 11 y 12.

3. Exudados

La concentración de proteínas es superior a 2 g/dl, las células nucleadas superan las 5000 por microlitro. Con esta concentración celular, una centrifugadora convencional es suficiente para concentrar las células de cara a su valoración.

La coloración es variable al igual que su turbidez y densidad.

Las causas más frecuentes descritas se pueden dividir en dos grupos, infecciosas y estériles o no infecciosas:

- ▶ **Infecciosas**, en donde existe un predominio de polimorfonucleares neutrófilos variablemente degenerados.
 - Bacterianas. Fundamentalmente por *Actinomyces spp.*, *Nocardia spp.*, *Fusobacterium spp.* En este caso los neutrófilos si se encontrarán degenerados, con cariólisis, cariorrexis y hebras nucleares libres, con bacterias fagocitadas y libres en el medio extracelular.
 - Fúngicas.
 - Parasitarias, poco frecuentes, normalmente por migraciones aberrantes de larvas.
 - Víricas, fundamentalmente en la especie felina por el virus de la peritonitis.

▶ **No infecciosas**,

- Neoplasias
- Peritonitis por bilis o rotura de vejiga de la orina
- Cuerpos extraños
- Compromiso vascular
- Inflamación de tejidos

Imágenes 13 y 14.

ESTUDIOS CITOLÓGICOS: PATOLOGÍAS ESPECÍFICAS

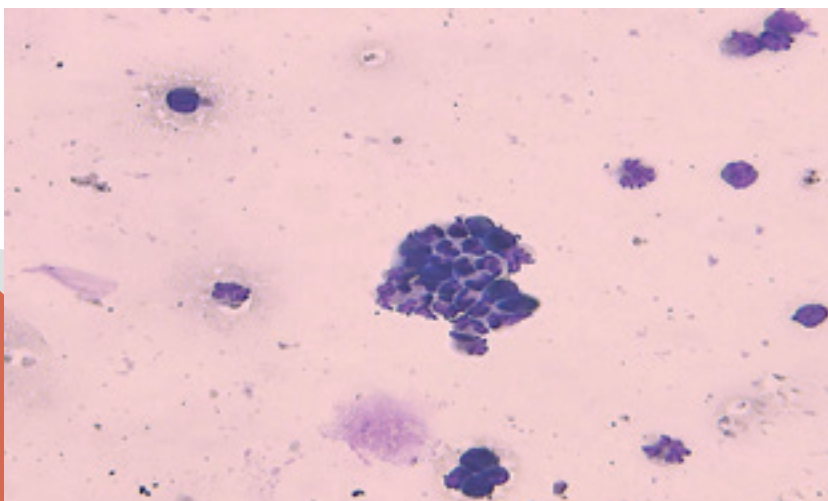
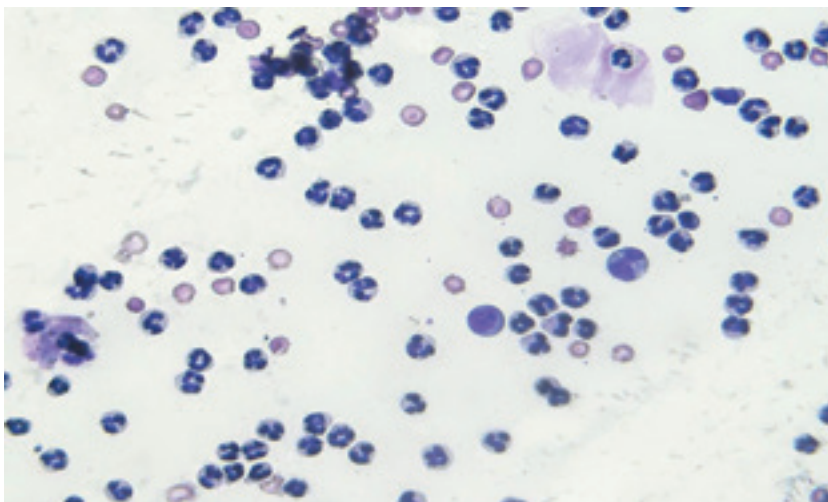
1. Exudados bacterianos

Ya se han comentado anteriormente los principales agentes causantes. Existe un predominio de polimorfonucleares neutrófilos con rotura de sus límites citoplasmáticos, interior con bacterias fagocitadas, el núcleo puede encontrarse hinchado, con pérdida cromática y material libre a modo de hebras.

La colonización de estos agentes puede ser debida a traumatismos perforantes, a través de la sangre o linfa, neumonías, alteraciones digestivas, las cuales pueden ser bien por situaciones de perforación (por cuerpos extraños, necrosis de masas intestinales) o por alteración de la permeabilidad de la pared.

2. Exudados fúngicos

A nivel celular es una imagen muy similar a los exudados bacterianos, entre las principales agentes causales encontramos *Nocardia spp.* (muy pequeños, de 2-5 micras, normalmente intracelulares, esferas muy basófilas con un pequeño anillo claro alrededor), *Blastomyces spp.* (a modo de esferas con tabique fino, hasta 20 micras, azulados.). *Candida spp.* (presenta una morfología esférica u ovalada, de hasta 8 micras de media, fundamentalmente agrupadas, cuando obtiene su forma de hongo estas se alargan hasta tener su típico aspecto filamentosos y tabicado).



14 **Imágenes 13 y 14.** Exudado estéril y no estéril respectivamente. Observe las bacterias libres y fagocitadas en la imagen 14.

3. Víricas (Peritonitis infecciosa felina)

Una de las causas más frecuentes de exudado en esta especie, este fluido se puede acumular en abdomen, tórax, pericardio, la concentración de proteínas normalmente supera las 4 g/dl, y las células no suelen superar las 6000 por microlitro.

Las extensiones (esta descripción no es patognomónica de esta enfermedad, y siempre hay que correlacionarlo con la clínica o pruebas complementarias) tienen un fondo eosinófilo debido a las proteínas, la población predominante son los neutrófilos, los cuales normalmente no se encuentran degenerados, pero podremos observar un porcentaje variable con signos leves de degeneración. Además, entremezclados se observan linfocitos pequeños picnóticos no displásicos, así como macrófagos parcialmente activados. De manera ocasional, en muy bajo número, podemos ver células plasmáticas en reposo.

Cuando sospechemos de esta enfermedad, en el fluido podemos calcular la ratio A:G, la cual suele ser inferior a 0.9 g/dl. PCR de coronavirus (mARN).

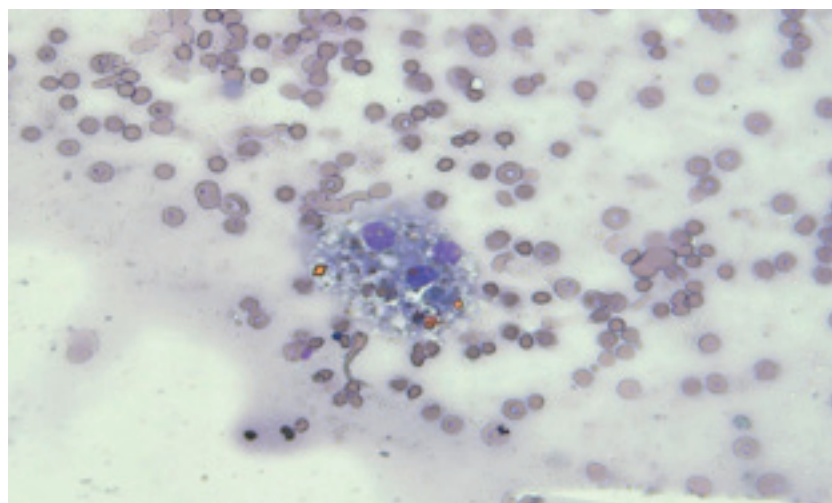
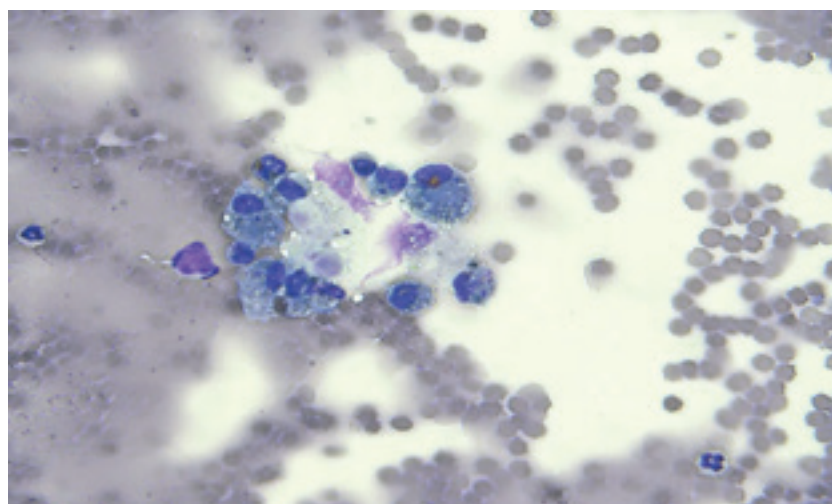
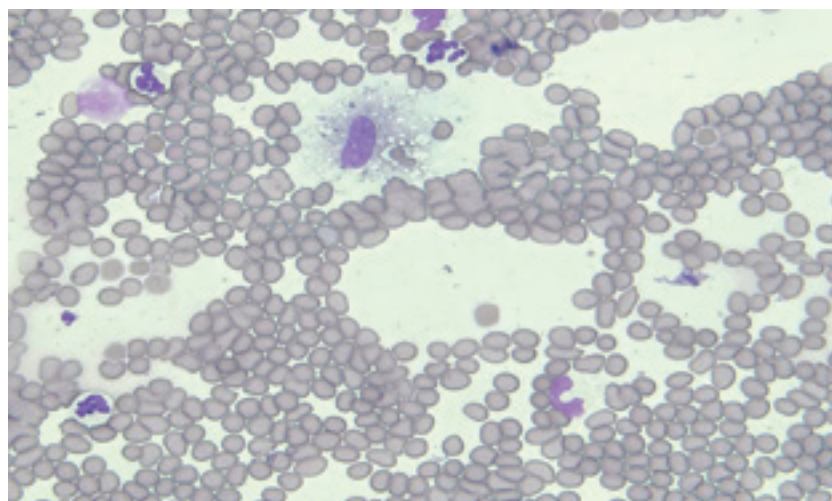
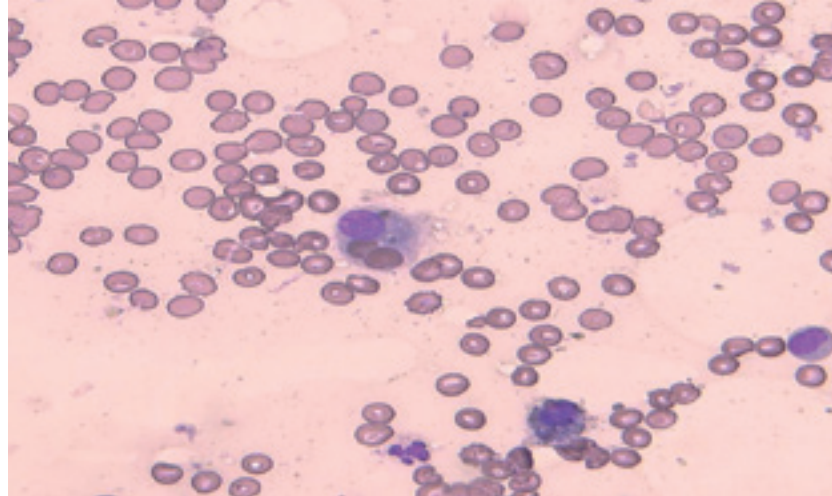
4. Hemorrágicos

No es una entidad primaria en sí, si no consecuencia de diferentes causas primarias como pueden ser alteraciones hemostáticas, traumatismos, neoplasias, infecciosas (parasitarias fundamentalmente).

En las ocasiones en las que se observen eritrocitos es de vital importancia distinguir si son contaminación cruzada o sangrado. Sangrados de más de 24 h presentarán ausencia de plaquetas y fenómenos de eritrofagocitosis, posteriormente se generarán restos de hemosiderina y cristales de hematoidina.

Con respecto a la presencia de plaquetas hay que tener en cuenta que en hemorragias muy recientes pueden verse.

Imágenes de la 15 a la 18.



Imágenes de la 15 a la 18. En las imágenes 15 y 16 se evidencia un sangrado reciente con eritrofagocitosis, observe los eritrocitos en el interior de los macrófagos. Sin embargo, en la imagen 17 y 18 el sangrado es más antiguo ya que se aprecian cristales de hematoidina.

5. Efusión quilosa

Macroscópicamente es un fluido lechoso (que no se aclara tras la centrifugación), esto es debido a la presencia de quilomicrones provenientes de la linfa. Son mucho más frecuentes en la pleura, bilaterales, y mucho menos frecuente en abdomen. Suele estar provocado por obstrucción del sistema linfático, la cual puede ser funcional (por incremento de la presión -linfangiectasia- derivada fundamentalmente de patologías cardíacas) o física (por la presencia de neoplasias como timoma, linfoma, o procesos granulomatosos o inflamaciones severas).

Citológicamente están constituidas por linfocitos maduros, macrófagos vacuolizados de pequeño tamaño y aisladas células plasmáticas, siempre en reposo.

Si estamos frente una efusión rica en linfocitos, pero macroscópicamente no es blanquecina, podemos medir los triglicéridos de la efusión y compararlos con los del suero, si es quiloso, la concentración será mayor en la efusión.

6. Uroperitoneo y Peritonitis biliar

Son dos efusiones relativamente poco frecuentes. La primera es derivada de una rotura de la vejiga de la orina, normalmente por traumatismos, y, debido a la capacidad irritante de la orina se evidencian neutrófilos muy degenerados, y en algunos casos, cristales.

En el caso de la peritonitis biliar, normalmente es consecuencia de la rotura de mucocelos, el color de la efusión es amarilla verdosa por efecto de los restos biliares, veremos macrófagos con pigmento verdoso en su citoplasma y neutrófilos no degenerados. Podemos evidenciar una sustancia amorfa, acelular, que no dejan de ser restos de la sustancia mucinosa del mucocelo, algunos autores lo denominan "bilis blanca"

7. Derrames malignos

Dentro de este apartado se incluye una gran variedad de neoplasias que pueden provocar derrames pleurales, abdominales o pericárdicos. La sensibilidad del estudio de estos fluidos para detectar una neoplasia primaria es de un 64 % y 61 % en perros y gatos respectivamente, y esto es debido a varias razones:

- La facilidad de exfoliar células tumorales, lo cual depende de la naturaleza del tumor y de su localización y extensión.
- En muchas ocasiones se genera un proceso inflamatorio cuya gravedad es muy variable, llegando incluso a ser superior en concentración que las células tumorales.
- Las inflamaciones descritas anteriormente pueden provocar cambios reactivos en células tisulares que no necesariamente tienen que ser tumorales, esto es especialmente complicado en mesoteliomas.

7.1. Linfomas

Provocado por linfomas originados en ganglios linfáticos y bazo fundamentalmente, pero también en hígado, intestino, riñones, timo...

Normalmente son derrames con abundantes linfoblastos, marcadamente pleomórficos a nivel celular y nuclear, en el núcleo es frecuente ver formas trilobulares. Su citoplasma es basófilo y puede presentar vacuolización displásica.

El núcleo presenta un patrón de cromatina granular. La presencia de mitosis aberrantes es frecuente, así como cuerpos linfoglandulares.

Imágenes 19 y 20.

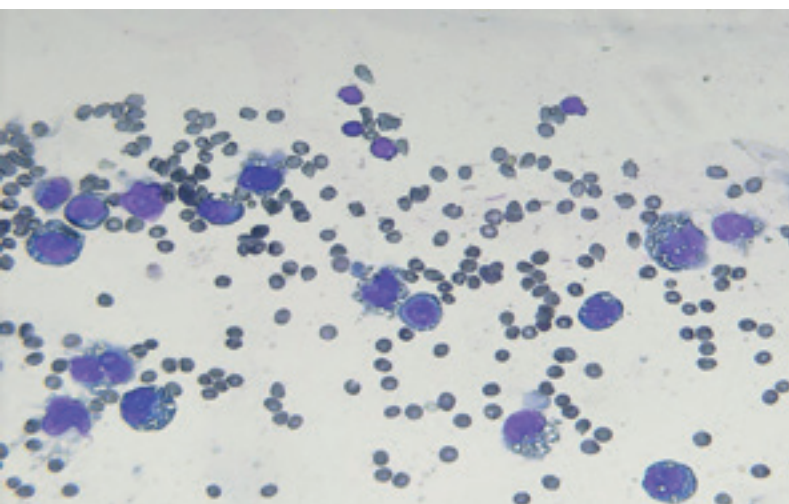
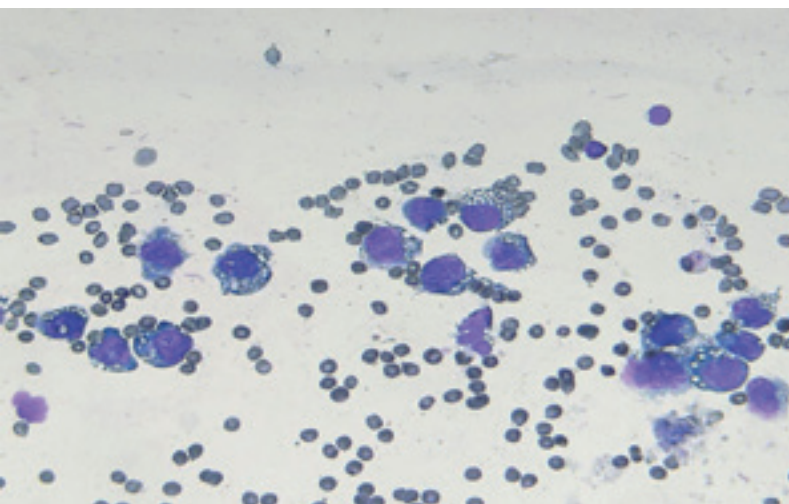
7.2. Epiteliales (Carcinomas/adenocarcinomas)

Veremos una alta concentración de células agrupadas, de manera frecuente formando estructuras voluminosas a modo de sábanas, pudiendo distinguirse estructuras acinares.

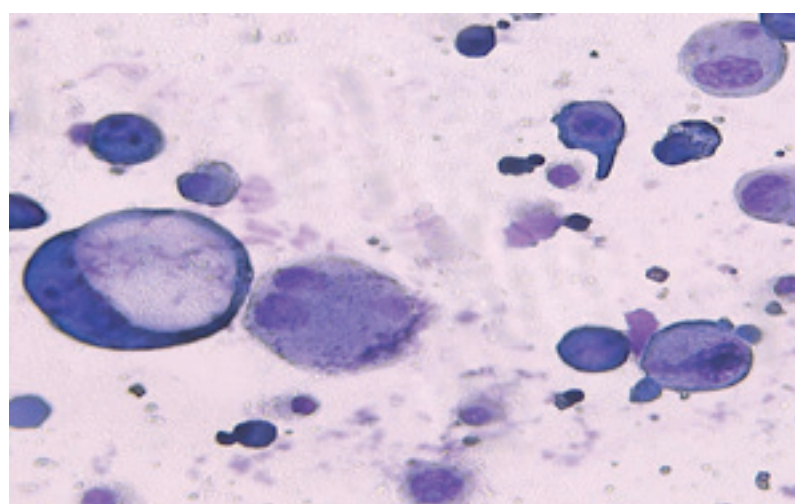
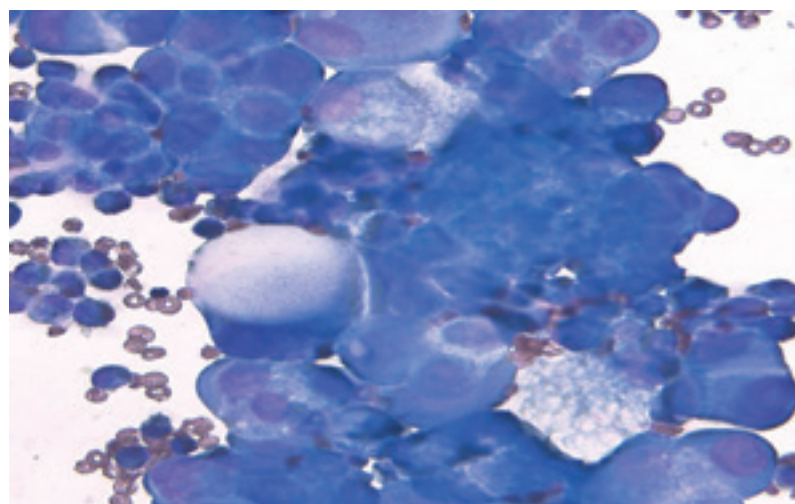
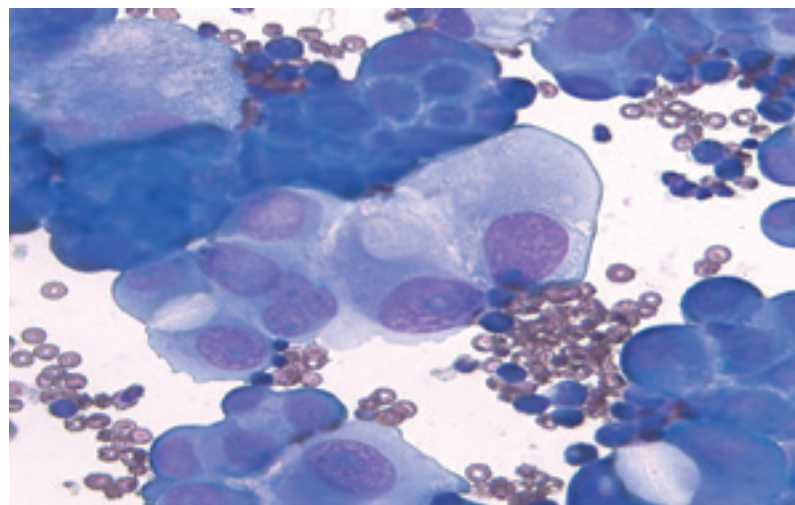
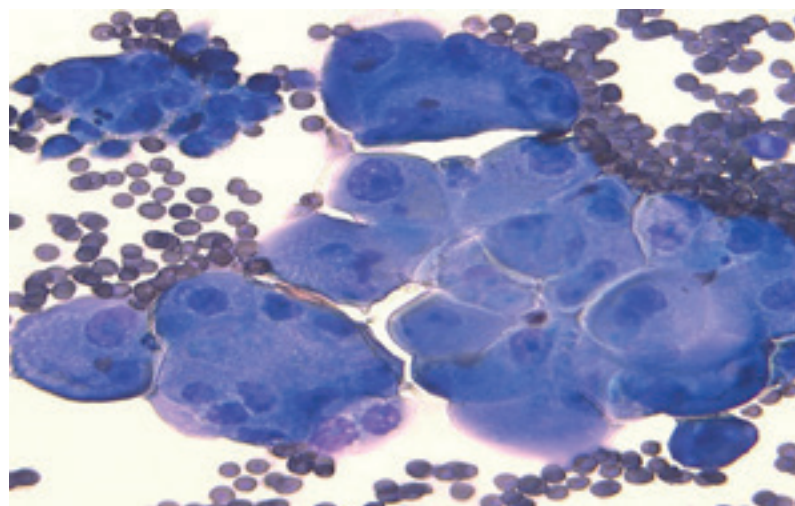
El número de criterios displásicos es muy elevado, con un grado de anisocitosis/anisocariosis y pleomorfismo celular/nuclear severo, recurrentes fenómenos de citomegalia y cariomegalia. Límites citoplasmáticos muy evidentes, interior basófilo con vacuolización displásica, podemos encontrarnos células en anillos de sello (una gran vacuola que desplaza el núcleo, el cual queda extrusionado) lo cual suele ser asociado a derrames carcinomatosos y no a mesoteliomas.

El núcleo presenta normalmente un patrón de cromatina irregular y varios nucleolos prominentes.

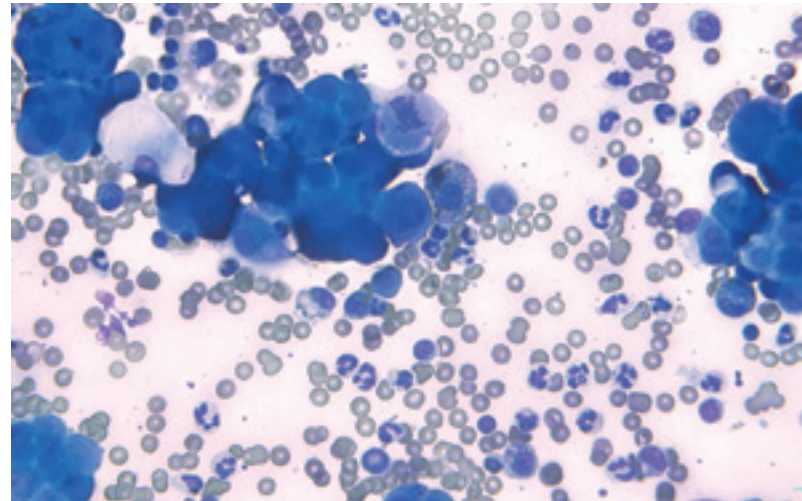
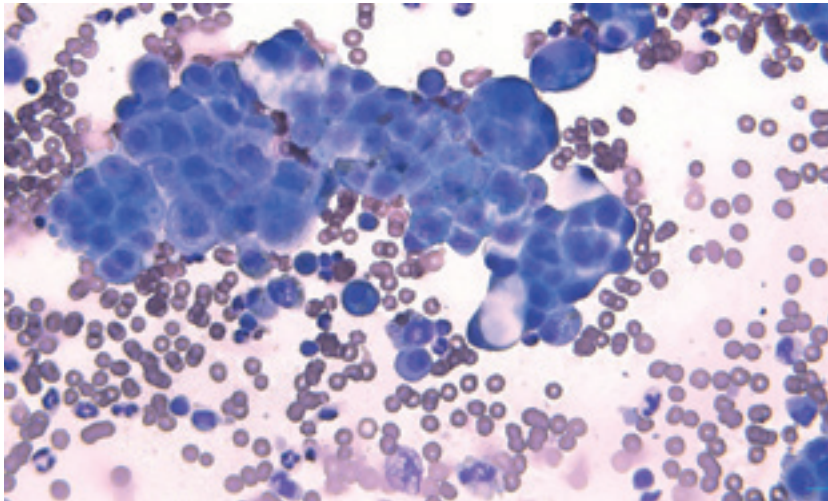
Imágenes de la 21 a la 24.



Imágenes 19 y 20. Población linfoide atípica, observe la elevada basofilia y vacuolización del citoplasma. Otro criterio displásico es la presencia de núcleos pleomórficos.



Imágenes de la 21 a la 24. Derrame carcinomatoso, En las dos primeras imágenes se ven grupos de mesoteliales, cohesionados, con severas displasias celulares y nucleares, así como multinucleaciones. En las dos últimas se aprecian células en anillo de sello, lo que se asocia a derrames malignos epiteliales.



7.3. Mesoteliomas

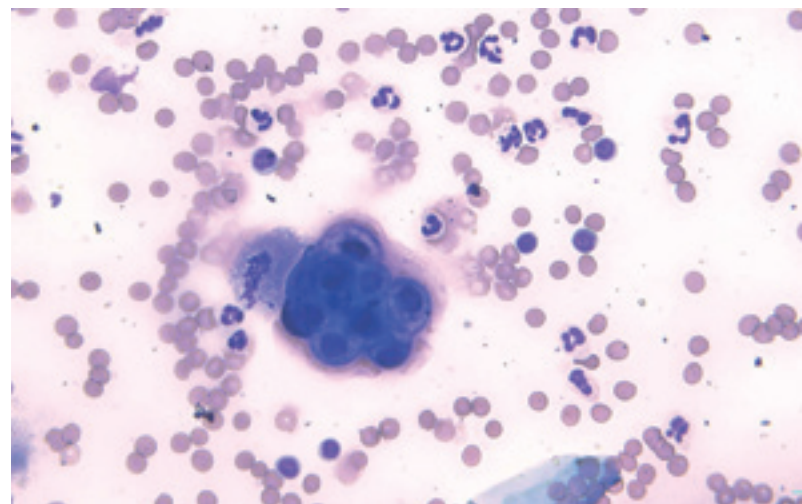
Desde el punto de vista del autor, este punto es el principal reto diagnóstico de los derrames. Estos tumores pueden ser diferenciados o no diferenciados. Dada la gran capacidad reactiva de estas células, y su distribución en cluster, distinguirlos de derrames epiteliales es muy complejo. A continuación, se exponen criterios para su diagnóstico:

Presencia de un número muy elevado de grupos de mesoteliales, no necesariamente displásicos. Esto suele asociarse a mesoteliomas diferenciados, pero no es exclusivo, ya que se pueden ver en situaciones de hiperplasia.

Presencia de displasias de poblaciones, celulares y nucleares. Normalmente se intenta describir 5 criterios nucleares para su diagnóstico (pleomorfismo nuclear, cariomegalia, patrones de cromatina irregulares, nucléolos hipernumerarios, gigantes y pleomórficos)

Además, el diagnóstico viene apoyado de otras pruebas clínicas, fundamentalmente pruebas de imagen, la presencia de lesiones sólidas en órganos ayudaría a distinguir un derrame epitelial maligno de un mesotelioma.

Imágenes de la 25 a la 27.



Imágenes de la 25 a la 27. Presencia de grupos de células displásicas, sospechoso de mesotelioma, el paciente presenta engrosamiento de la pleura, la biopsia confirma el diagnóstico.

7.4. Timoma

Tumor del epitelio tímico, aparece a modo de masa en mediastino craneal que desplaza dorsalmente la tráquea. Su diagnóstico es fundamentalmente a través del estudio citológico directo de la masa o estudios de citometría de flujo (más de 10 % de linfocitos cd 4 y cd 8 positivos). Los derrames suelen no ser concluyentes, normalmente son ricos en linfocitos maduros, aislados mastocitos cebados no displásicos y, en algunas ocasiones, se pueden observar grupos de células epiteliales con escaso citoplasma basófilo, núcleo redondo, central, de cromatina granular y un nucléolo prominente.

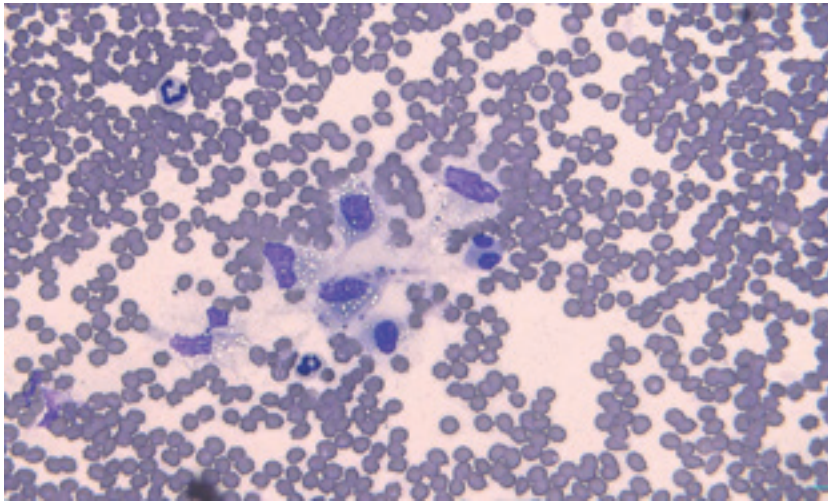


Imagen 28. Derrame sarcomatoso pericárdico en paciente canino con hemangiosarcoma esplénico y metástasis a aurícula derecha.

7.5. Sarcomas

Si de por sí son neoplasias que exfolian pocas células en las punciones, los derrames diagnósticos de sarcomas son muy poco frecuentes, fundamentalmente hemangiosarcomas.

Se aprecian células fusiformes, distribuidas de manera individual con un grado variable de pleomorfismo celular, límites moderadamente evidentes, interior de basofilia variable con vacuolización también variable. Núcleo ovalado, de cromatina irregular y nucléolos prominentes.

Imagen 28.

7.6. Mastocitomas

Su diagnóstico es relativamente sencillo, igual que el diagnóstico de un mastocitoma primario, se aprecian células redondas de límites difusos y un interior cebado de gránulos basófilos con un núcleo redondo, central de cromatina regular y con o sin nucléolos prominentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arefeh Ravanbakhsh et al. What is your diagnosis? Thoracic fluid from a dog. *Veterinary Clinical Pathology* 2021 Volume 50, Issue 1.
2. Chind Yang et al. What is your diagnosis? Thoracic mass in a dog. *Veterinary Clinical Pathology* 2019 Volume 48, Issue 4
3. Cowgill E, Neel J. Pleural fluid from a dog with marked eosinophilia. *Vet Clin Pathol.* 2003;32(4):147-149.
4. D'Urso L. Thoracic and pericardial taps and drains. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia, PA:Saunders; 2005:380-831.
5. George JW. The usefulness and limitations of handheld refractometers in veterinary laboratory medicine: an historical and technical review. *Vet Clin Path.* 2001;30(4):201-210.
6. Johnson M, et al. A retrospective study of clinical findings, treatment and outcome in 143 dogs with pericardial effusion. *J Small Anim Pract.* 2004;45:546-552.
7. Lana S, Plaza S, et al. Diagnosis of mediastinal masses in dogs by flow cytometry. *JVIM.* 2006;20:1161-1165.
8. Luis Mesquita et al. Neoplastic pleural effusion and intrathoracic metastasis of a scapular osteosarcoma in a dog: a multidisciplinary integrated diagnostic approach. *Veterinary Clinical Pathology* 2017 Volume 46, Issue 2
9. Mertens MM, Fossum TW. Pleural and extrapleural diseases. In: Fossum TW, ed. *Small Animal Surgery*. St. Louis, MO: Mosby; 2002:1281-1282.
10. Nelson OL. Pleural effusion. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia, PA: Saunders; 2005:204-207.
11. Reggeti F, Brisson B, Ruotsalo K, et al. Invasive epithelial mesothelioma in a dog. *Vet Pathol.* 2005;42:77-81.
12. Ricardo Marcos et al. Cyto centrifuge preparation in veterinary cytology: a quick, simple, and affordable manual method to concentrate low cellularity fluids. *Veterinary Clinical Pathology* 2017 Volume 45, Issue 4
13. Stockham SL, Scott MA. Cavitary Effusions. In: *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2nd ed. Ames, IA: Blackwell Publishing; 2008:851, 849,841, 842.
14. Takahashi T, et al. Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982-1997). *J Am Vet Assoc.* 2000;216(2):222-226.
15. Walters JM. Abdominal paracentesis and diagnostic peritoneal lavage. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2003;18(1):32-38.
16. Zoia A, Hughes D, Connolly DJ. Pericardial effusion and cardiac tamponade in a cat with extranodal lymphoma. *J Small Anim Pract.* 2004;45:467-471.