



## Valoración de técnicas de citología en mucosa bucal en pacientes con síndrome de Sjögren

### *Assessment of cytology techniques in oral mucosa of Sjögren's syndrome patients*

Beatriz Busamia,\* Carla Gobbi,§ Eduardo Albiero,|| Marcelo Yorrio¶

#### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es comparar dos técnicas de estudio de citología bucal, la citología exfoliativa y de impresión, para evaluar cambios en la mucosa oral que permitan el diagnóstico no invasivo de síndrome de Sjögren (SS). **Pacientes:** Se seleccionaron 50 pacientes apareados por sexo y edad, diagnosticados con síndrome de Sjögren según criterios del Consenso Americano-Europeo. Los pacientes fueron distribuidos en tres grupos experimentales: controles sanos (C), n = 14, boca y ojo secos sin SS (BO), n = 13, y con SS n = 23. **Material y métodos:** Para la citología exfoliativa se utilizó cepillo recolector de células (*Cytobrush*) deslizando a lo largo de la lámina de vidrio, fijándose posteriormente en etanol al 95%. En citologías por impresión se utilizó papel de acetato de celulosa (Millipore Hawp 304®), en tiras de un cm de longitud colocadas sobre la superficie de la mucosa bucal sobre el surco vestibular superior inmovilizando el papel y presionando por tres segundos. Se tiñeron con técnica de Papanicolau (PAP). Se valoró la morfología e histomorfometría, estudiando: área citoplasmática (AC), área nuclear (AN), relación núcleo-citoplasma (N:C) y cantidad de células por milímetro cuadrado (mm<sup>2</sup>). **Resultados:** Ambas técnicas nos permitieron observar en C: células epiteliales pavimentosas aisladas, basófilos, núcleos centrales normales, 20 a 30 por mm<sup>2</sup>, relación N/C 1:8. En el grupo BO: células aisladas, agrupadas y plegadas, con citoplasma a predominio eosinófilo, aumento de la cantidad de células 40 por mm<sup>2</sup>, relación núcleo-citoplasma relación N/C 1:4. En los pacientes SS se observó el área nuclear con cromatina más densa, 400 células por mm<sup>2</sup>, y relación N/C 1:2 en relación a BO y C. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en todas las características estudiadas. **Conclusión:** Podríamos inferir que la citología por impresión puede ser utilizada en el diagnóstico de lesiones orales y sistémicas en pacientes con hiposalivación.

#### ABSTRACT

The aim of the present research project was to compare two techniques for oral cytology study (exfoliative cytology and impression cytology) in order to assess changes in oral mucosa which might allow non-invasive diagnosis of Sjögren's syndrome cases (SS). **Patients:** 50 patients were selected, patients were paired by age and gender, and had been diagnosed with Sjögren's syndrome according to criteria of the American-European Consensus. Patients were distributed into the following three experimental groups: healthy control group (C), n = 14, Dry mouth and eyes group without SS, (ME) n = 13, and SS group n = 23. **Material and methods:** A cell harvesting brush (*Cytobrush*) was used for the exfoliative cytology procedure, sliding it along a glass plate and later fixating harvested cells in 95% ethanol. Cellulose acetate paper (Millipore Hawp 304®) was used for the impression cytology procedure. The paper was in 1 cm long stripes which were placed on the oral mucosa surface above upper vestibular groove; stripes were immobilized and pressure was applied for three seconds. Papanicolau (PAP) technique was used for dyeing. Morphology and histomorphology were assessed studying the following: cytoplasmic area (CA), nuclear areas (NA) nucleus-cytoplasm relationship (N:C) and amount of cells per square millimeter (mm<sup>2</sup>). **Results:** Both techniques revealed the following in C: isolated single-layered epithelial cells, basophils, normal central nuclei, 20 to 30 per mm<sup>2</sup>, N:C ratio 1:8. In the eye and mouth group (EM): grouped and folded isolated cells, cytoplasm with eosinophilic predominance increase of cell amount to 40 per mm<sup>2</sup>, nucleus-cytoplasm relationship N/C 1:4. SS patients showed the following: nuclear area with denser chromatin, 400 cells per mm<sup>2</sup>, and 1:2 N/C relationship with respect to mouth and ears and control. Statistically significant differences were observed among groups in all studied characteristics. **Conclusion:** We can infer that impression cytology can be used in systemic and oral lesion's diagnosis in patients afflicted with hyposalivation.

**Palabras clave:** Mucosa bucal, diagnóstico citológico, hiposalivación.

**Key words:** Oral mucosa, cytological diagnosis, hyposalivation.

www.medigraphic.org.mx

Recibido: mayo 2017.

Aceptado: septiembre 2017.

© 2018 Universidad Nacional Autónoma de México, [Facultad de Odontología]. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/facultadodontologiaunam>

\* Profesora Asistente, Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

§ Profesora Titular de la Cátedra de Clínica Médica I, UHMI Núm. 3, Hospital Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Córdoba.

|| Unidad de Reumatología del Hospital Córdoba.

¶ Profesor titular de la Cátedra de Clínica Médica II, UHMI Núm. 3, Hospital Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

## INTRODUCCIÓN

El síndrome de Sjögren (SS) es una exocrinopatía crónica autoinmune, de progresión lenta y etiología desconocida. Se caracteriza por la sequedad de mucosas, principalmente bucal (xerostomía) y ocular (xeroftalmía), aunque con frecuencia puede producir síntomas por sequedad nasal, cutánea o vaginal. Aunque en la mayoría de los pacientes la enfermedad suele quedar localizada en las glándulas exocrinas (manifestaciones glandulares),<sup>1,2</sup> por su carácter sistémico suele tener manifestaciones extraglandulares.<sup>3</sup> El abordaje para el diagnóstico del SS puede ser difícil, controvertido y tardío. Incluye dos objetivos diferentes, la evaluación de los componentes oculares, salivales y sistémicos y determinar si es una patología primaria o secundaria. Algunos de los criterios para diagnóstico no son exactos y los pacientes pueden ser incorrectamente evaluados, particularmente en las etapas iniciales.<sup>4</sup> Dentro de los criterios de evaluación se valora la sequedad del ojo y boca, la determinación de anticuerpos y biopsia de glándulas salivales menores.<sup>2,5</sup>

Algunos estudios incorporan diagnóstico por imágenes, que son inespecíficos, por lo tanto los criterios de clasificación le dan valor diagnóstico a la determinación de anticuerpos anti-Ro y anti-La, que pueden encontrarse en otras enfermedades autoinmunes.<sup>5</sup>

La biopsia de glándulas salivales menores labiales es una técnica invasiva que puede dejar secuelas a nivel de la mucosa bucal.<sup>5</sup>

La citología exfoliativa es un procedimiento sencillo, no invasivo para el estudio de las células epiteliales de las mucosas, esta técnica se ha utilizado en el diagnóstico de ciertos tipos de lesiones orales, la mayoría de ellas relacionadas con las enfermedades virales y fúngicas.<sup>6</sup>

El término de citología de impresión fue introducido por Egbert y cols. en 1977,<sup>7,8</sup> se utilizó por primera vez en la mucosa conjuntival. Posteriormente, diversos autores han realizado modificaciones según sus necesidades, describiendo el uso de esta técnica para estudiar la pureza del mucus sobre la superficie conjuntival<sup>9</sup> y los cambios en la cromatina nuclear de las células epiteliales, en el síndrome de Sjögren.

Debido probablemente a la escasez de estudios sobre citología por impresión para el examen de la mucosa oral, el método convencional es todavía el más usado.

El objetivo del presente trabajo es comparar dos técnicas de citología, la exfoliativa y la de impresión, en el estudio de la mucosa bucal en pacientes con síndrome sicca y SS, que permitan un diagnóstico con una técnica no invasiva.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes

Se seleccionaron 50 pacientes (p) de la Unidad de Reumatología del Sanatorio Allende y Hospital Córdoba, ingresados consecutivamente, atendidos entre enero de 2010 y enero de 2013, fueron distribuidos en los siguientes grupos experimentales: 1. Controles clínicamente sanos (C), n = 14; 2. Boca y ojo seco sin síndrome de Sjögren (BO), n = 13; 3. Síndrome de Sjögren primario (SSp) n = 23.

Para el diagnóstico del SS se emplearon los criterios de consenso del grupo Europeo Americano de Reumatología.<sup>3</sup>

Se establecieron como criterios de exclusión pacientes que estuvieran sometidos a quimioterapia o radioterapia en la región craneofacial, pacientes con neoplasias en región de cabeza y cuello, pacientes con desórdenes psiquiátricos, pacientes con alteraciones metabólicas o ingesta de fármacos antihipertensivos, psicofármacos. Hepatitis C y B, HIV, sarcoidosis, Ig4.

Se determinaron los datos demográficos, clínicos y exploración de la cavidad oral.

### Métodos

Para la técnica de citología exfoliativa la toma de la muestra la realizó un solo operador, se realizó con cepillo recolector citológico (*Citobrush*) deslizando a lo largo del portaobjetos, se fijó posteriormente en etanol al 95%. Las muestras para citologías por impresión se realizaron con papel de acetato de celulosa (Milipore Hawp 304) de 45  $\mu\text{m}$  de espesor, cortados en tiras de 1 cm, se colocaron sobre la superficie de la mucosa bucal sobre el surco vestibular superior, inmovilizándolo por presión durante cinco segundos. Las muestras se colocaron en alcohol 96° para su fijación y posterior coloración.

Se obtuvieron células del surco vestibular superior.

La tinción de las muestras se realizó con la técnica de Papanicolau (PAP).

Se realizó una valoración morfológica que incluyó, tipo celular predominante, núcleos, agrupación y plegamiento celular e histomorfometría.

En el estudio histomorfométrico se evaluó: área citoplasmática (AC), área nuclear (AN), la relación núcleo-citoplasma (N/C) y la cantidad de células por 1 mm<sup>2</sup>. Las imágenes se obtuvieron con microscopía óptica, y el análisis histomorfométrico se realizó con un programa de Image Pro Plus 4.1.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Sanatorio Allende (CIEIS), bajo los lineamientos de la

Asociación Médica Internacional y se obtuvo consentimiento informado.

El análisis estadístico se realizó mediante Test «t» de Student para datos independientes, estableciendo valor de  $p < 0.05$  para significación estadística.

## RESULTADOS

La edad media de los pacientes fue de 50 años, el 86% fueron mujeres.

Ambas técnicas nos permitieron observar en C, células epiteliales pavimentosas aisladas regulares en tamaño, basófilas, núcleos normales en tamaño y forma, centrales y picnóticos (Figura 1A). En BO células aisladas, agrupadas y plegadas, con citoplasma a predominio eosinófilo y sin alteraciones nucleares (Figura 2B). En pacientes SS se observó área citoplasmática de menor tamaño, el área nuclear aumentada de tamaño con cromatina más densa (Figura 3C).

En el estudio histomorfométrico de ambas técnicas se observó en C una cantidad de 20 a 30 células por  $\text{mm}^2$  por campo, relación N/C 1:8. En BO un aumento de la cantidad de células 40 por campo  $\text{mm}^2$  en correspondencia a C  $p < 0.01$ , relación núcleo-citoplasma relación N/C 1:4 y en SS la relación N/C 1:2 de 400 células por  $\text{mm}^2$ , con un incremento estadísticamente significativo  $p < 0.001$  en relación a BO y C (Figuras 4 y 5).

## DISCUSIÓN

La citología exfoliativa de la mucosa oral es cada vez más importante en el diagnóstico precoz de distintas patologías locales y sistémicas, como un procedimiento para la obtención de muestras de células que luego puede ser analizada por técnicas de diagnóstico sofisticadas tales como citomorfometría, citometría de ADN y análisis moleculares.<sup>10</sup>

Citología por impresión

Citología exfoliativa

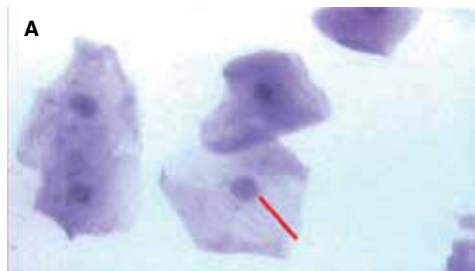


Figura 1.

A) Relación paciente (N/C) 1:8 imagen 200 x, escala = 100 micras.

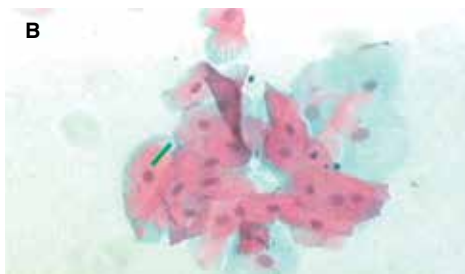
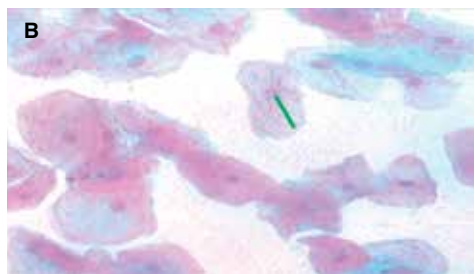


Figura 2.

B) Relación paciente (N/C) 1:4 imagen 200 x, escala = 100 micras.

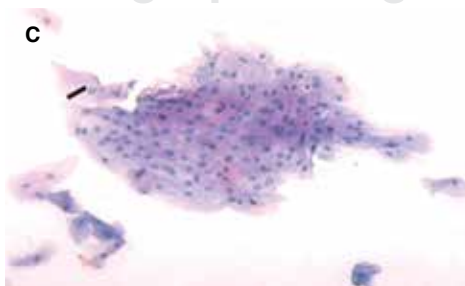
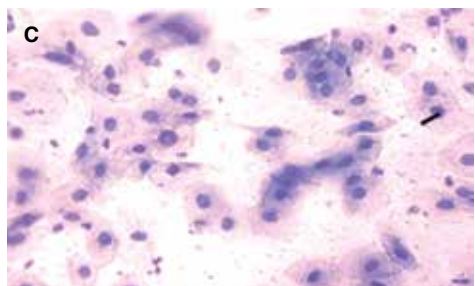
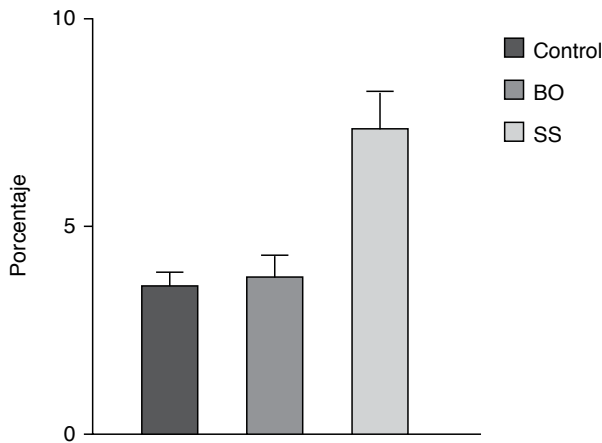


Figura 3.

C) Relación paciente (N/C) 1:2 imagen 200 x, escala = 100 micras.



**Figura 4.** Relación núcleo/citoplasma en los distintos grupos experimentales  $p < 0.01$ .

La aplicación de programas de computación sofisticados ha cambiado el escenario e hizo que la interpretación de los resultados sean más fiables.

La técnica de la citología exfoliativa de las células de la cavidad oral es simple y rápida, no agresiva, es por lo tanto bien aceptada por los pacientes y adecuada para la aplicación de rutina en los programas de cribado de la población para el análisis temprano de las lesiones sospechosas y para la pre- y posmonitoreo del tratamiento de las lesiones orales.<sup>10-12</sup>

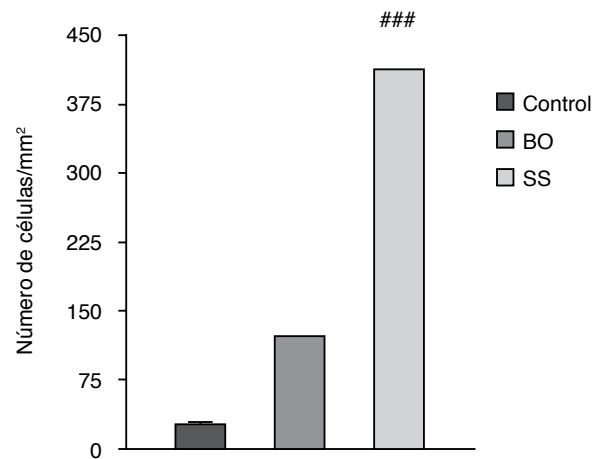
La citología por impresión utilizada en conjuntiva del ojo, ha permitido evidenciar fácilmente la metaplasia escamosa en ojo seco moderado y severo en pacientes con SS contribuyendo a la confirmación del diagnóstico clínico y seguimiento de la enfermedad.<sup>13-16</sup>

Es de destacar que no existen evidencias actuales de que este procedimiento sea utilizado en cavidad oral.

Nuestro estudio comparó ambas técnicas, exfoliativas y por impresión en términos de ajuste de la muestra y coincidencia de diagnósticos en los grupos detallados anteriormente.

Ambas técnicas de citología nos permitieron reconocer parámetros semejantes como tipos de células, color, tamaño y cantidad. En el caso de enfermedades autoinmunes, tales como SS, aunque ambas técnicas fueron eficientes para hacer el diagnóstico, la percepción de agrupamientos celulares fue mejor caracterizada en las preparaciones de citología por impresión.

En el análisis de las muestras se observó que las citologías procesadas por impresión presentaron ventajas, ya que la distribución delgada y uniforme del material celular permitió apreciar la forma de células y núcleos con más definición, además se redujo la superposición de células y se observó la presencia de polimorfocitos.



**Figura 5.** Número de células en los distintos grupos experimentales  $p < 0.01$ .

En el estudio histomorfométrico también la citología por impresión presentó ventajas sobre la técnica convencional, porque permitió una mejor observación de los parámetros estudiados como los cambios en la relación núcleo-citoplasmática de diversos grupos experimentales.

En nuestro estudio los resultados asociados con las observaciones clínicas y bioquímicas sugieren que el SS puede producir alteraciones morfológicas y funcionales en las células epiteliales orales, detectable por análisis microscópico y citometría utilizando las técnicas de citología.

### CONCLUSIÓN

Los datos preliminares de la descripción histológica evidenciaron mayor detalle al utilizar la técnica por impresión respecto a la exfoliativa. Podríamos inferir que la citología por impresión puede ser utilizada en el diagnóstico de lesiones orales y sistémicas en pacientes con hiposalivación.

### Fuente de financiamiento

Este estudio es subsidiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNC. Córdoba, Argentina.

### REFERENCIAS

- García-Carrasco M, Fuentes-Alexandro S, Escarcega RO, Salgado G, Riebeling C, Cervera R. Pathophysiology of Sjögren's syndrome. *Arch Med Res.* 2006; 37 (8): 921-932.
- Mavragani CP, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. The management of Sjögren's syndrome. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006; 2 (5): 252-261.
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE et al. Classification criteria for

- Sjögren's syndrome: a revise version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002; 61 (6): 554-558.
4. Per SR, Scully C, Hegarty AM. An update of the etiology and management of xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97 (1): 28-46.
  5. Sule Y, Ebru T, Muge B, Ronca M, Sezen F. Comparative analysis of autoantibodies against alfa-fodrin in serum, tear fluid, and saliva from patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2006; 33 (7): 1289-1292.
  6. Busamia B, Gonzalez-Moles MA, Mazzeo M, Linares J, Demarchi M, Gobbi C et al. Assessing the determination of salivary electrolytes and anti-Ro and anti-La antibodies for the diagnosis of Sjögren's syndrome (SS). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010; 15 (3): e437-440.
  7. Egbert PR, Lauber S, Maurice DM. A simple conjunctival biopsy. *Am J Ophthalmol*. 1977; 84 (6): 798-801.
  8. Sawada Y, Yuan C, Huang AJ. Impression cytology in the diagnosis of acanthamoeba keratitis with surface involvement. *Am J Ophthalmol*. 2004; 137 (2): 323-328.
  9. Verges RC, Pita SD. Estudio de la población de células calciformes en los síndromes de ojo seco mediante un método citológico traumático. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 1988; 55 (5): 525-530.
  10. Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions molecular. *Mol Cancer*. 2006; 5: 11.
  11. Maksem JA, Weldmann J. Specialized Preparative devices are not needed for liquid-based thin-layer cytology: an alternate manual method using a metastable alcoholic gel. *Diagn Cytopathol*. 2001; 25 (4): 262-264.
  12. Kavatkar AN, Nagwanshi CA, Dabak SM. Study of a manual method of liquid-based cervical cytology. *Indian J Pathol Microbiol*. 2008; 51 (2): 190-194.
  13. Singh R, Joseph A, Umapathy T, Tint NL, Dua HS. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol*. 2005; 89 (12): 1655-1659.
  14. Rodríguez MF, Juyo A, Rojas A. Descripción de la metaplasia escamosa por citología de impresión en pacientes con ojo seco. *Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular* N° 8: 51-62/ Enero-Junio de 2007.
  15. Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology*. 1985; 92 (6): 728-733.
  16. Nelson JD, Wright JC. Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disease. *Arch Ophthalmol*. 1984; 102 (7): 1049-1051.

Dirección para correspondencia:  
**Dra. Mgtr. Beatriz Busamia**  
E-mail: beabusamia@hotmail.com