



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA**  
**SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA**  
**Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico**  
**2° Anno-2° Semestre**

**SEDE DI VERONA**

**LEZIONI IN METODI E TECNICHE DI COLPOCITOLOGIA -MED/46**  
**Dott.ssa Marina Foroni**

**MODIFICAZIONI CITOMORFOLOGICHE NELLE AFFEZIONI FLOGISTICHE**  
**RISCONTRABILI NEL PAP-TEST**

**Quadro cellulare d'insieme**

I processi infiammatori, che possono di per sé determinare l'essfoliazione di cellule morfologicamente abnormi, riconoscono in genere come fattore predisponente un'insufficiente maturazione dell'epitelio squamoso pluristratificato, come si verifica nell'età prepubere, nella post-menopausa e nelle condizioni di deficit estrogenico. Numerosi e diversi sono i germi in causa: tra i più frequenti, streptococchi, stafilococchi, gonococchi e Neisseria catarrhalis. Istologicamente la mucosa si presenta edematosa ed è possibile il verificarsi di erosioni vere.

Dal punto di vista citodiagnostico il ruolo delle infiammazioni acute riveste un interesse molto minore rispetto a quelle dei processi flogistici cronici riproduttivi, nei quali più facilmente si verificano fenomeni proliferativi cellulari. Ciò consegue probabilmente alla complessità delle alterazioni infiammatorie croniche, legata all'intricato sovrapporsi dei diversi fattori che stimolano l'accrescimento epiteliale, la produzione di fenomeni di desmoplasia e le risposte immunitarie dell'organismo ospite.

I più importanti segni che si evidenziano in citologia sono: Infiammazione acuta e subacuta; lo striscio innanzitutto appare sporco, per l'abbondante sostanza di fondo formata da un elevato numero di leucociti polimorfonucleati, cellule necrotiche o in degenerazione, detriti cellulari, microrganismi o protozoi. Nelle forme subacute sono inoltre spesso presenti numerosi istiociti mono- e talvolta plurinucleati. Le cellule epiteliali sono per lo più di tipo superficiale e intermedio, ma non mancano le cellule parabasali, soprattutto in caso di erosione vera. Un preparato con tali caratteristiche può talvolta simulare i quadri tipici della postmenopausa. I criteri più sicuri per la diagnosi di infiammazione in atto sono rappresentati dalla presenza di fenomeni di citolisi, come vescicolazione e vacuolizzazione, limiti cellulari indistinti e irregolari, alone perinucleare, migrazione di leucociti all'interno del citoplasma, colorazione eosinofila. Importanti sono anche le modificazioni dei nuclei, che appaiono spesso ingranditi e picnotici, con trama cromatinica tenue e sfumata. A questo proposito è importante sottolineare come alterazioni citolitiche di natura batterica possano manifestarsi anche in mancanza di un'infiammazione in atto: la glicolisi delle cellule squamose ad opera dei bacilli di Doderlein, normali costituenti della flora batterica vaginale, ne rappresenta l'esempio di più frequente osservazione. Altro quadro che si riscontra non frequentemente nel Pap-Test è quello dell'infiammazione cronica nel quale non esistono aspetti citologici specifici significativi. Vi sono tuttavia alcuni elementi più frequenti e significativi, che non raramente, come l'ipertrofia e l'ipercromatismo nucleare, la presenza di vistosi cariosomi e talvolta di nuclei multipli, possono simulare la malignità.

Che si tratti di alterazioni benigne, tuttavia, appare di solito evidente considerando il rapporto N/C, che rimane nei limiti della benignità, e la distribuzione della cromatina, fine e omogenea, tranne che a livello di alcuni cariosomi prominenti. Si ricorda altresì come la presenza di cellule metaplastiche rappresenti il fenomeno che più spesso si associa alle condizioni infiammatorie con carattere di cronicità. In questo tipo di infiammazione prevalgono i linfociti, gli istiociti o anche le plasmacellule. Il numero di globuli bianchi varia a seconda della specie e della virulenza dell'agente infettante. Esistono infezioni batteriche o da trichomonas o da miceti in cui il numero dei leucociti endovaginali è aumentato in modo a mala pena impercettibile. In altri casi il quadro citologico è talmente ricco di leucociti che non si riesce a

valutare la morfologia degli elementi epiteliali. I leucociti possono essere distribuiti omogeneamente in tutto lo striscio oppure essere raccolti in fitti cumuli. A volte si può osservare che essi si raccolgono attorno alle cellule epiteliali o vi sovrappongono in spesso strato. In rapporto alla sede della flogosi il contenuto in elementi flogistici può variare fortemente negli strisci ottenuti da prelievi eseguiti in fasi diverse; si avrà così l'utile indicazione per localizzare l'affezione. Processi flogistici di una certa entità sono per lo più accompagnati da una trasudazione infiammatoria, cioè da un essudato. Il liquido ricco di sostanze proteiche forma nei preparati una specie di deposito granulare, per lo più eosinofilo. Se vi è un contemporaneo aumento della secrezione mucinosa cervicale, lo sfondo dei preparati assumerà un aspetto sporco, opaco. Si possono avere dei precipitati di fibrina sotto forma di esili filamenti eosinofili. La facile vulnerabilità del tessuto infiammatorio, fortemente irrorato, fa sì che il quadro citologico possa essere sommerso da una grande quantità di eritrociti.

Tuttavia non ogni aumento di globuli bianchi negli strisci vaginali deve venire interpretato come segno di uno stato flogistico. Ad esempio durante la fase mestruale e premenstruale è del tutto normale trovare numerosi leucociti polimorfonucleati. Anche la comparsa di un gran numero di elementi istiocitari verso la fine della mestruazione (chiamata anche exodus) è un fatto flogistico. Essi possono comparire assieme a filiere di cellule endometriali e se ne possono trovare fino al 10° giorno del ciclo. I piccoli istiociti presentano una spiccata somiglianza con le cellule stromali degli strati superficiali dell'endometrio, anzi sono probabilmente da identificarsi con esse.

### **Modificazioni cellulari negli epiteli piatti e cilindrici**

I processi flogistici provocati da agenti batterici, chimici o fisici provocano più o meno spiccate alterazioni delle cellule epiteliali piatte e di quelle cilindriche.

Nelle cellule si ha innanzitutto una aumentata assunzione di liquidi. I nuclei delle cellule epiteliali piatte possono essere leggermente ingranditi e più o meno leggermente srondati. La cromatina si addossa dall'interno all'involucro nucleare per cui la cosiddetta membrana nucleare risulta più evidente. I nuclei presentano spesso delle modificazioni di retrazione con pieghe e dentellature del loro contorno. Altre volte i nuclei appaiono leggermente ipercromici perché la loro impalcatura cromatinica si addensa. La cromatina è disomogeneamente distribuita ma non sensibilmente grossolana. In altre cellule ancora i nuclei sono rigonfi, pallidi e con struttura confusa. Nelle cellule epiteliali piatte alterate da flogosi si nota talvolta il fenomeno di binucleazione senza un corrispondente aumento di grandezza. Il citoplasma dimostra un'accentuata tendenza a colorarsi con l'eosina anche nelle normalmente cinofile cellule parabasali e piccole intermedie. Si parla allora di pseudoeosinofilia. In altre cellule si trova invece una amfifilia ossia i corpi cellulari sono in parte cinofili e in parte eosinofili.

Nelle affezioni da *Trichomonas* si vedono con particolare frequenza degli ampi aloni chiari attorno ai nuclei per lo più retratti, ipercromici o prepiconotici. La formazione di questi aloni indica che il citoplasma o il nucleo, oppure anche tutti e due, erano rigonfi e si sono poi retratti (durante la fissazione) per cui tra l'endoplasma e l'involucro nucleare è venuto a formarsi uno spazio vuoto.

Però questi aloni nucleari possono insorgere anche nelle flogosi provocate da agenti batterici, senza partecipazione del *Trichomonas*. Oltre a ciò il citoplasma appare sovente sfumato a causa di influssi tossico-degenerativi e i limiti cellulari si fanno indistinti.

Negli strisci flogistici le alterazioni cellulari sono gran parte effetto di eterolisi, si tratta cioè dell'azione di tossine di batteri o di altri microrganismi patogeni. Contrariamente alla citolisi batterica da bacillo di Doderlein, l'eterolisi non è limitata alle cellule intermedie contenenti glicogeno ma interessa o può interessare, tutti gli elementi epiteliali piatti o cilindrici; anzi le manifestazioni litiche nelle cellule intermedie e in quelle superficiali sono relativamente modeste, mentre ne sono vistosamente interessate le forme cellulari immature dell'epitelio pavimentoso atrofico. Nei processi flogistici possono inoltre manifestarsi, per influssi degenerativi, vacuolizzazioni nel citoplasma degli elementi epiteliali piatti. I vacuoli sono in genere multipli e compaiono soprattutto nelle cellule parabasali (ma anche in quelle intermedie). Un importante criterio diagnostico differenziale per valutare le alterazioni infiammatorie consiste nella mancanza di un rilevante spostamento nel rapporto nucleo- citoplasmatico. Questo è il criterio migliore per distinguere le alterazioni cellulari infiammatorie dalle atipie cellulari dei carcinomi e dei loro preadenti. Però nelle cellule alterate provenienti da un epitelio atrofico o nelle cellule metaplastiche immature, la valutazione del rapporto nucleo- citoplasmatico è differente perché qui, già normalmente, i nuclei costituiscono buona parte del corpo cellulare.

Una delle infezioni parassitiche più comuni riscontrabili nell'apparato genitale femminile è data dalla presenza di *Trichomonas Vaginalis*, nonostante siano state documentate tutte le altre infezioni extra- vaginali, quali la polmonite neonatale, le lesioni cutanee e le infezioni del tratto digerente, come pure le affezioni della prostata. Molti fattori sono fra i più importanti elementi che contribuiscono per la diagnosi dei sintomi clinici e sono: il muco endocervicale, parecchie immunoglobuline, il sistema di complemento ed i leucociti, i macrofagi e le condizioni ambientali della flora vaginale. La malattia clinica è spesso rappresentata da varie fasi: acuta, cronica e latente. Il periodo di incubazione dell'infezione da *Trichomonas Vaginalis* è compreso tra i 4 e 28 giorni. I segni evidenti durante la fase del prelievo

sono dati da perdite schiumose e maleodoranti, molto abbondanti e di colore giallo-verdognolo. La cervice presenta una mucosa arrossata e piccole macchie emorragiche simili ad una punteggiatura ( in colposcopia denominata colpite a grandi e piccole chiazze) .

Il *Trichomonas Vaginalis* è un protozoo piuttosto delicato che richiede condizioni ambientali abbastanza costanti: temperatura ottimale è attorno ai 37° c , il ph deve essere compreso tra i 5,8 e i 7 ed è molto sensibile alla pressione osmotica e all'umidità dell'ambiente ( infatti muore rapidamente se si trasferisce in acqua o se viene sottoposto ad un rapido essiccamento). Il riconoscimento del protozoo è agevole con l'esame a fresco quando si tratta di secrezioni vaginali in cui il *Trichomonas Vaginalis* conservi il tipico aspetto e la caratteristica mobilità.

### **Caratteristiche citomorfologiche**

Sebbene il protozoo possa essere osservato con un vario numero di tecniche quali l'osservazione in campo scuro, la sospensione liquida e la preparazione a fresco il Pas, il Romanowsky ed i metodi di colorazione immunoenzimatica, eccellenti dettagli morfologici si sono visti usando la fissazione e la colorazione degli strisci vaginali secondo la tecnica di Papanicolau. Nei campioni colorati degli strisci vaginali, la presenza di *Trichomonas Vaginalis* può evidenziare le seguenti caratteristiche citomorfologiche: la presenza di aggregati di leucociti che ricoprono la superficie delle cellule squamose epiteliali con una tipica distribuzione a "rosetta", appare frequentemente piccolo, con una struttura rotonda o ovalare e le dimensioni variano dalla misura di un leucocita a quella di una cellula parabasale. Sono stati osservati *Trichomonas* estremamente grandi, con dimensioni che vanno da 150 a 200 micron. Il colore del citoplasma può variare a seconda del ph della vagina, della qualità della fissazione e colorazione. Generalmente sono cionofili o di un delicato color lavanda, possono presentare forme strane , allungate o a forma di girino. Sebbene si rilevino singolarmente, nei casi gravi di infezioni o di immunodepressione, si trovano nello striscio grandi microcolonie del protozoo. Il *Trichomonas* ha sempre un nucleo indistinto vescicolare, il più delle volte è in posizione eccentrica. Talvolta si possono osservare un buon numero di granuli acidofili di dimensioni uniformi all'interno del citoplasma. Benché si possano evidenziare nel caso di trichomoniasi modificazioni epiteliali cellulari reattive e atipiche, non c'è conferma evidente di una chiara infezione da trichomonas che causi alterazione della cromatina nucleare o aneuploidia, displasie o alterazioni epiteliali pre- e neoplastiche. Fra l'altro il *Trichomonas Vaginalis* può essere rilevato in concomitanza di infezioni da *Chlamydia Trachomatis*, *Herpes* e HPV.

### **Moniliasi**

Le vaginiti da miceti nella maggior parte dei casi sono legate all'infezione da *Candida Albicans*. La candidasi, o moniliasi, è caratterizzata da una risposta infiammatoria di grado modesto, con essudato biancastro , scaglioso, aderente alle pareti vaginali. Lo sviluppo del micete, che appartiene alla comune flora microbica della vagina, è condizionato dalla depressione della normale acidità, che ne favorisce l'invasione attraverso il rivestimento epiteliale; importanti fattori predisponenti sono inoltre il diabete mellito, la gravidanza e la somministrazione di antibiotici a largo spettro. L'aspetto morfologico della *Candida* è quello di pseudomicelio, i cui filamenti (ife) sono dotati di restringimenti " a canna di bambù", sui quali si inseriscono spore ovoidali lievitiiformi. Negli strisci di pazienti con candidiasi le cellule squamose presentano alterazioni caratteristiche: disposizione in ammassi voluminosi a struttura radiata, citoplasma evanescente con alone nucleare e anomalie dei nuclei, come irregolarità del contorno, ipercromasia e aumento del volume. Questi caratteri appaiono particolarmente pronunciati negli strisci contraddistinti dalla presenza di ife e blastospore.

Nelle infezioni da *torulospis glabrata* si trovano quasi esclusivamente elementi sporulanti o spore moltiplicantisi secondo vari piani di scissione, grigio-pallide con Papanicolau, in genere isolate. Vi possono essere degli accenni a formazione di pseudomiceli.

### **Carenza di acido folico e alterazioni simil-displastiche**

Le anomalie morfologiche che contraddistinguono la carenza di acido folico non sono limitate esclusivamente alle cellule emopoietiche, nelle quali si manifestano, tra l'altro, con macrocitosi eritrocitaria e iperpigmentazione dei granulociti neutrofili, ma interessano in egual misura vari tipi di cellule epiteliali. A livello cervicale le modificazioni più tipiche consistono in binuclearietà, aumento del rapporto N/C e vacuolizzazione citoplasmatica. La deficienza di vitamina B12 produce un quadro citologico analogo. La carenza di acido folico causa un disturbo della sintesi del DNA, che si riflette principalmente sulla morfologia nucleare; l'asincronismo maturativo si rende evidente soprattutto a livello dei precursori eritroidi, che possiedono un nucleo ancora immaturo per la ritardata sintesi di DNA, circondato da un citoplasma normalmente differenziato. Un elevato rischio di carenza di acido folico è stato segnalato nelle donne che hanno interrotto l'assunzione di contraccettivi orali estro-progestinici prima di una gravidanza: tali soggetti presentano nel 50% dei casi modificazioni citomorfologiche, sia pur modeste, analoghe a quelle indotte dal deficit di folati o di

vitamina B 12, verosimilmente a causa di un'interferenza farmacologica a livello del metabolismo dell'acido folico. In effetti, è noto che le donne che fanno uso della "pillola" possiedono livelli ematici e intraeritrocitari di folato più bassi rispetto ai soggetti normali di controllo, mentre più elevata appare l'escrezione urinaria di acido formiminoglutaminico. Degna di nota è anche la buona regressione delle anomalie citomorfologiche che si ottiene mediante la somministrazione di acido folico.

## **CITOLOGIA DELLA DISPLASIA, DEL CARCINOMA IN SITU E DEL CARCINOMA SCUAMOSO INVASIVO DELLA CERVICE UTERINA**

### **Citologia della displasia**

La displasia è caratterizzata da un disordine maturativi che interessa l'epitelio squamoso nel suo insieme, con parziale interruzione del normale aspetto pluristratificato.

Nelle displasie dei vari gradi il quadro citologico è caratterizzato dalla comparsa di elementi cellulari i cui nuclei presentano evidenti segni di anormalità (simili a quelli delle cellule maligne) mentre le cellule, nel loro insieme, possono avere un aspetto quasi del tutto normale. I nuclei presentano ingrandimenti, ipercromia, anisocitosi o polimorfismo. Sovente si nota bi- o plurinuclearità. Le alterazioni istologiche che stanno alla base dei vari quadri citologici sono di solito tanto più lievi quanto più differenziate sono le cellule che si vedono negli strisci e tanto più gravi quanto meno differenziate sono le cellule stesse.

Nelle displasie lievi si trovano negli strisci elementi displastici su cellule superficiali e grandi cellule intermedie. I loro nuclei sono ingranditi e lievemente ipercromici, a volte anche srotondati.

Si nota che a confronto con le cellule normali dello stesso grado di maturazione, il rapporto nucleo-citoplasmatico è palesemente aumentato. La struttura nucleare è regolare, finemente granulata, o lievemente grossolana. Raramente si vedono nuclei con piccoli cromocentri. Gli eventuali nuclei picnotici superano di poco le dimensioni di quelli delle cellule intermedie. Le cellule si trovano di solito isolate. Il citoplasma è ben conservato, di solito cianofilo, ma non raramente eosinofilo o giallo-oro.

Nelle displasie medie si trovano cellule displastiche che corrispondono, per grado di maturità, alle piccole cellule intermedie e in parte anche alle cellule parabasali. Il rapporto nucleo-citoplasmatico è più fortemente aumentato che non nelle displasie lievi. I nuclei, sovente srotondati, hanno più elevato contenuto cromatinico. La struttura cromatinica è lievemente o discretamente grossolana, però si conserva, nel complesso regolare, si può vedere qualche cromocentro. Eventuali addensamenti cromatinici all'interno dei nuclei, come pure apposizioni di cromatina alla faccia interna dell'involucro nucleare o retrazione dello stesso, sono in genere condizionati da fenomeni degenerativi. Le cellule con modificazioni relative a displasia moderata provengono spesso da tessuti metaplastici. Perciò, se il quadro è morfologicamente conclamato, si parla anche di displasia metaplastica. A prescindere dalle descritte modificazioni nucleari, le cellule assomigliano spesso alle cellule parabasali o alle piccole intermedie, pur essendo in genere rotondeggianti. Nei nuclei si rileva più o meno evidente anisocariosi e un polimorfismo. Il citoplasma è di solito cianofilo, denso, molto colorato. A volte vi si vedono dei vacuoli. Se le cellule alterate provengono da una displasia moderata di un epitelio escervicale anche solo modicamente maturo, si vedono negli strisci cellule displastiche piuttosto polimorfe ed eosinofile.

Nelle displasie gravi compaiono, accanto agli elementi displastici provenienti dagli strati medi dell'epitelio, anche quelli degli strati basali. In genere questi elementi possiedono, attorno al nucleo, solo una sottile cornice citoplasmatica. Il rapporto nucleo-citoplasmatico è fortemente aumentato. I nuclei (sensibilmente ipercromici) possono essere fortemente alterati nella loro struttura e nella loro forma ed è frequente il reperto di uno di più cromocentri. L'involucro nucleare può apparire irregolare a causa delle apposizioni cromatiniche e talvolta si vedono grossi nuclei nudi ipercromici, con struttura cromatinica grossolana. La cromatina nucleare presenta una singolare distribuzione a piccoli cromocentri regolarmente conformati che sono collegati da bande cromatiniche addensate, tutte della stessa lunghezza e dello stesso spessore.

Vengono così delimitate delle piccole aree completamente prive di cromatina. Questa distribuzione cromatinica conferisce ai nuclei un aspetto cribroso.

I quadri citologici della displasia cornificante vanno osservati con particolare attenzione. Negli strisci si vedono per lo più, accanto a lamelline cornee, cellule pavimentose polimorfe ormai ben mature, con citoplasma in parte giallo oro e con spiccate modificazioni nucleari.

Un citologo inesperto potrebbe ritenere trattarsi di elementi meno pericolosi di quelli precedentemente descritti; infatti essi hanno un aspetto altamente differenziato e il rapporto nucleo-citoplasmatico non è sensibilmente aumentato. In

realtà dietro ad essi si celano delle displasie gravi, carcinoma in situ (istologicamente accertati); a volte addirittura di carcinomi invasivi. Tra i quadri citologici delle varie forme di displasia sussistono passaggi gradualmente. Se si confrontano tra loro i quadri citologici dei vari gradi di gravità della displasia si vedrà che, in genere, le dimensioni delle cellule patologiche diminuiscono con l'aumentare della gravità della lesione. Contemporaneamente si eleva il rapporto nucleo-citoplasmatico. Negli strisci delle displasie mancano in genere i segni della distruzione tessutale che vediamo in genere nei carcinomi invasivi. Lo sfondo dei preparati è in genere "pulito", a meno che non siano intervenuti dei processi infiammatori di varia origine, con il loro essudato più o meno ricco di leucociti, eritrociti e di detriti cellulari, i limiti cellulari sono ben designati. Se sussistono contemporaneamente dei fattori flogistico-degenerativi si possono avere vacuolizzazioni citoplasmatiche. I sottili aloni perinucleari chiari sono invece artefatti dovuti alla fissazione. Negli strisci con cellule displastiche si vedono molto frequentemente, come aspetti accompagnatori, cellule ipercheratosiche e paracheratosiche. I nuclei delle cellule displastiche possono contenere uno o più cromocentri, specialmente nelle forme di displasia immatura. Non si vedono di solito, evidenti nucleoli con strutturazioni intranucleari eosinofile, li possiamo invece vedere nei processi riparativi insorti da tessuto displastico. In questo caso la diagnosi differenziale con le forme immature del carcinoma invasivo è molto difficile.

### **Displasia da radiazioni**

La displasia da radiazioni consiste nell'insieme di alterazioni epiteliali atipiche che si stabiliscono dopo un lungo periodo di latenza in pazienti sottoposte a radioterapia: gli aspetti morfologici salienti, non dissimili a quelli delle displasie spontanee, si riassumono nell'ipertrofia nucleare, con l'aumento del rapporto N/C, nel marcato ipercromatismo dei nuclei stessi, che presentano una trama cromatinica finemente granulare o uniformemente addensata, e nella presenza di note di differenziazione superficiale (ipercheratosi e paracheratosi). Si tratta quindi di alterazioni molto diverse da quelle acute che seguono immediatamente l'irradiazione (formazione di cellule giganti, aloni perinucleari, fagocitosi). Per quanto il significato biologico della displasia da radiazioni rimanga oscuro, non può essere misconosciuta la sua potenziale attitudine alla progressione in senso neoplastico, particolarmente nei casi che insorgono nei tre anni successivi al trattamento radiante. I principali criteri di differenziazione tra una displasia post-radiazione da una comune preesistente sono: 1) presenza di cellule discariotiche anormali riunite in ampi lembi, anziché in forma isolata; 2) spiccata eosinofilia del citoplasma; 3) prevalenza di cellule ovalari con configurazione irregolare-bizzarra; 4) bi e multinucleazione (da 6 a più nuclei).

### **Condiloma acuminato (papilloma squamoso)**

Il condiloma acuminato è una formazione verrucosa, spesso multipla, che si sviluppa a livello della vulva, della vagina e, più raramente del collo dell'utero; è caratterizzato istologicamente da una spiccata papillomatosi e acantosi, con approfondimento delle creste epidermiche. La sua eziologia è virale, come dimostra tra l'altro la possibilità di trasmissione per contagio intersessuale. È stato coniato il termine più ampio di "lesione condilomatosa", che comprende accanto al condiloma acuminato classico, anche il condiloma piatto acantotico e quello invertito a sviluppo endofitico. Queste lesioni sono state riscontrate in donne giovani associate alla displasia lieve, sottolineandone altresì il potenziale rapporto con le neoplasie intraepiteliali. Le alterazioni citologiche più evidenti sono: cellule epiteliali discheratosiche che possono desquamare dalle superfici epiteliali in preda a fenomeni di ipercheratosi e paracheratosi; la componente più rappresentativa delle zone acantotiche è costituita da cellule spinose, soprattutto di tipo intermedio profondo o parabasale esterno, dalla caratteristica forma arrotondata. Abituale e caratteristico è inoltre il reperto di cellule binucleate, più raramente multinucleate. Particolarmente indicativo per la diagnosi di condiloma sarebbe poi il riscontro, accanto alle cellule discheratosiche intermedie e superficiali, di cellule di tipo intermedio dotate di un distinto alone chiaro perinucleare, le cosiddette Koilocitotiche.

Un marcato aumento di incidenza del carcinoma cervicale è stato segnalato nelle donne che hanno ricevuto un trapianto renale. I farmaci immunosoppressori (busulfam, ciclofosfamide, azatioprina) determinano di per sé la comparsa di marcate alterazioni displastiche, come ipertrofia nucleare e vistose bizzarrie morfologiche.

### **Carcinoma in situ**

Il carcinoma in situ, o intraepiteliale, è una condizione caratterizzata da una proliferazione tumorale strettamente confinata dall'epitelio mucoso, con invasione o meno degli sfondati ghiandolari. È una fase che precede il carcinoma invasivo ma che non sempre inevitabilmente evolve in questa patologia. L'età media delle pazienti con carcinoma in situ è nettamente e statisticamente più bassa di alcuni anni rispetto a quella delle pazienti con carcinoma invasivo (circa 35 anni). Nel carcinoma in situ i quadri citologici sono caratterizzati dalla comparsa di cellule atipiche poco differenziate o del tutto indifferenziate che per forma e dimensioni ricordano più che altro cellule epiteliali pavimentose immature o cellule metaplastiche.

Di solito le cellule sono rotonde o ovalari, solo la loro piccola parte ha la forma poligonale, il citoplasma è in genere cianofilo, più raramente eosinofilo o amfifilo e se è ben conservato le cellule danno un'impressione di relativa uniformità. È solo osservandole più attentamente e a forte ingrandimento che si individuano le modificazioni di forma

e di grandezza delle cellule e dei nuclei. I vacuoli citoplasmatici sono di modesto rilievo. La maggior parte delle cellule del carcinoma in situ presenta, attorno al nucleo, un più o meno evidente anello citoplasmatico. Negli strisci citologici si vedono anche grossi nuclei atipici liberi, rotondi o allungati.

Si distinguono nel carcinoma in situ otto tipi cellulari diversi:

- 1) Cellule parabasali maligne, per dimensioni e forma ricordano le cellule parabasali dell'epitelio pavimentoso, si riconoscono per la relativa grandezza e ipercromia nucleare.
- 2) Cellule disposte in cumuli: elementi molto stipati nei quali i limiti cellulari sono mal riconoscibili oppure manca il citoplasma.
- 3) Grandi cellule non cheratinizzate: questi elementi, relativamente grandi, rotondi, ovalari od di forma irregolare, sono in genere disposti in gruppi o anche isolatamente. I nuclei appaiono vescicolosi con cromatina e cromocentri irregolarmente distribuiti, simulanti a volte dei nucleoli.
- 4) Cellule cheratinizzate maligne: esse si distinguono per le loro forme irregolari e per i limiti cellulari nettamente segnati; il citoplasma è in genere eosinofilo. Esse compaiono in genere nelle donne al di sopra dei 50 anni.
- 5) Piccole cellule maligne: si tratta di elementi decisamente piccoli, di forma rotonda, ovalare o fusata. La cromatina nucleare è grossolanamente granulare oppure opaca.
- 6) Cellule fibrillari: esse hanno una forma fusata, lunga con un piccolo nucleo ipercromico pur esso stirato longitudinalmente.
- 7) Cellule tumorali indifferenziate: esse spiccano per l'irregolarità della forma e delle dimensioni sia del citoplasma che del nucleo; in donne relativamente giovani il loro riscontro è molto raro.
- 8) Cellule a girino: elementi con grossi nuclei ipercromici o a "macchia d'inchiostro" e citoplasma stirato a una estremità per lo più eosinofilo-laccato.

La struttura cromatinica cellulare è grossolana e irregolare, è il reperto di uno o più addensamenti cromatinici (cromocentri), in parte di forma irregolare, collegati fra loro da bade cromatiniche di varia lunghezza e vario spessore. La membrana nucleare è sovente ispessita e presenta sovente interruzioni, i contorni nucleari possono essere irregolarmente deformati. In genere nelle cellule dei carcinomi in situ non si vedono nucleoli ingranditi (macronucleoli). Si possono avere cellule bi e plurinucleate, più raramente che nelle displasie. Il quadro generale è relativamente pulito, purchè non vi siano sovrapposte alterazioni di tipo flogistico. Non vi si riconosce la diatesi tumorale. Può verificarsi in alcuni casi negli strisci una citolisi da Doderlein.

Il problema diagnostico differenziale del carcinoma in situ è tra la displasia e il carcinoma invasivo. In alcuni casi è possibile incontrare difficoltà diagnostiche relativamente all'interpretazione di cellule endocervicali degenerate oppure negli strisci atrofici, a cellule parabasali degenerate e elementi istocitari.

### **Carcinomi squamosi invasivi**

Gli strisci citologici dei carcinomi invasivi della cervice sono caratterizzati dal fatto che, nella maggioranza dei casi, sussiste un evidente quadro accompagnatorio detto diatesi tumorale.

Questo aspetto è per lo più già riconoscibile a una visione superficiale dei preparati a piccolo ingrandimento. La sierosità riccamente proteica e il precipitato finemente granulare, conferiscono allo striscio un aspetto leggermente opaco-sporco, specie se vi è contemporaneamente del muco. I precipitati di fibrina si presentano sotto forma di fibrille per lo più eosinofile. A causa della frequente flogosi accompagnatoria gli strisci del carcinoma invasivo contengono spesso leucociti, linfociti o anche istiociti. Gli eritrociti non mancano quasi mai e sono in genere numerosi. Essi sono in parte mal conservati oppure si vede del pigmento emossiderinico. Nei tumori con estesa necrosi è particolarmente caratteristica la presenza di detriti cellulari e nucleari. Negli strisci dei carcinomi invasivi il numero delle cellule atipiche può essere alto. In alcuni casi nelle neoplasie ampiamente ulcerate e necrotiche, si vedono solo, poche cellule atipiche, in un numero di gran lunga inferiore a quello medio nei carcinomi in situ o nelle displasie. E se anche queste poche cellule neoplastiche sono danneggiate da processi degenerativo-autolici oppure flogistici, potranno insorgere gravissime difficoltà diagnostiche.

In qualche caso risulterà impossibile formulare una diagnosi.

Dalla morfologia delle cellule tumorali si possono distinguere tre diversi tipi di neoplasie squamose: il tipo cornificante, il tipo non cornificante a grandi cellule e il tipo non cornificante a piccole cellule. Ciò che risalta maggiormente negli strisci citologici dei carcinomi squamosi corneificanti è il polimorfismo delle cellule neoplastiche che presentano in genere un citoplasma relativamente ben conservato. Tali elementi hanno dimensioni molto variabili, che vanno da quelle delle piccole cellule parabasali fino a quelle delle cellule superficiali. Caratteristica è la varietà delle forme cellulari. Gli elementi possono essere poligonali, globosi, allungati, fusiformi, spinosi o anche a "girino", con lunghi prolungamenti citoplasmatici. Alcuni elementi presentano una caratteristica colorazione giallo-oro del citoplasma. Soprattutto le lunghe cellule fibrillari, che si dispongono sovente negli strisci come branchi di pesci, sono caratteristiche per i carcinomi squamosi invasivi; nei carcinomi in situ è raro vederne. I nuclei presentano una evidente ipercromia con forte spostamento del rapporto nucleo-citoplasmatico a favore del nucleo. Nella maggioranza delle cellule la cromatina nucleare è grossolana e distribuita

in modo del tutto irregolare. Negli strisci sono molto frequenti elementi con nuclei picnotici che possono essere rotondi, allungati o di forma del tutto bizzarra. Nei nuclei dei carcinomi squamosi cornificanti si vedono raramente, in confronto a quanto si nota nelle altre forme carcinomatose invasive, dei nucleoli ingranditi.

Nei carcinomi squamosi non cheratinizzanti, come segno peculiare nella pratica diagnostica è la presenza di macronucleoli i quali possono essere rotondi e di forma irregolare. Di solito possono essere singoli o multipli. Ai nucleoli ( contenenti RNA) si possono addossare depositi di DNA, il che rende difficile negli strisci colorati con Papanicolau, la loro differenziazione dai cromocentri. Negli strisci dei carcinomi squamosi immaturi si vedono frequentemente numerosi nuclei nudi i quali costituiscono frequentemente assieme all'iperchromia e alla irregolare distribuzione cromatinica nucleare, il primo segnale della possibile esistenza di un carcinoma invasivo. Ed infine nei carcinomi anaplastici a piccole cellule si evidenziano gli analoghi segni di alterazioni citomorfologiche simili agli altri tipi di carcinomi sopraccitati. La caratteristica che può contraddistinguerli è data dalla presenza di cellule per lo più isolate, raramente riunite in sincizi. A volte gli elementi dei carcinomi anaplastici a piccole cellule sono difficilmente distinguibili da quelli del carcinoma in situ o da quelli di cellule stromali degli strati profondi dell'endometrio. La presenza di strutturazioni cromatiniche grossolane, di nucleoli ingranditi e di una "diatesi tumorale" depone per l'esistenza di un carcinoma

### ALTERAZIONI CELLULARI DA RADIAZIONI IONIZZANTI NEL TRATTO GENITALE FEMMINILE

Per azione delle radiazioni ionizzanti si verifica, nelle cellule immature e ancora incapaci di moltiplicarsi, una più o meno evidente alterazione del codice genetico. Già piccole dosi di raggi possono bloccare l'RNA messaggero, dal che deriva una riduzione della sintesi proteica. Dosi radianti più elevate disturbano la sintesi di DNA, con conseguente incapacità delle cellule alla divisione mitotica. Le radiazioni provocano inoltre l'attivazione dei sistemi enzimatici, la coagulazione dei colloidi protoplasmatici e la denaturazione delle proteine nucleari. In tutte le cellule, danneggiate in modo irreversibile ma ancora capaci di dividersi, compaiono alterazioni morfologiche caratteristiche. La sensibilità ai raggi delle varie forme cellulari è molto variabile.

Nell'ambito dell'apparato genitale femminile sono specialmente gli elementi immaturi degli strati basali dell'epitelio pavimentoso e le cellule tumorali ad essere sensibili alle radiazioni ionizzanti. In genere gli elementi cellulari embrionali, immaturi o poco differenziati, reagiscono alle stimolazioni attiniche con maggiore sensibilità che non gli elementi più differenziati. Tutti gli elementi in via di divisione mitotica sono, a questo proposito, più sensibili, specie durante la fase premitotica. Questo spiega la particolare sensibilità ai raggi delle cellule neoplastiche maligne.

Tra le alterazioni cellulari da radiazioni ionizzanti bisogna fare una distinzione tra:

- 1) reazioni primarie da raggi insorgenti acutamente per effetto dell'irradiazione e di durata molto varia,
- 2) alterazioni cellulari insorgenti dopo un lungo intervallo e note come displasie da raggi.

Un problema a parte è inoltre costituito dalla diagnostica citologica delle cellule tumorali in donne che, in epoca più o meno recente, sono state sottoposte a una terapia radiante; si tratterà infatti di decidere se la terapia ha avuto successo o se ci si trova davanti ad una recidiva.

Sia negli elementi cellulari che in quelli patologici possono manifestarsi i segni della reazione primitiva da raggi. Essi sono massimamente evidenti nelle cellule dell'epitelio pavimentoso normale.

I primi segni della reazione da raggi sono in genere riconoscibili nel citoplasma, mentre nei nuclei le alterazioni si manifestano solo dopo alcuni giorni. Nel citoplasma si hanno delle vacuolizzazioni che possono essere a bolle minute oppure grossolane. Il fenomeno è particolarmente evidente negli elementi immaturi dell'epitelio pavimentoso. Contemporaneamente aumenta la grandezza di tali elementi. Isolati vacuoli di grosse dimensioni possono comprimere il nucleo contro il margine delle cellule e deformato. I vacuoli citoplasmatici ( ve ne possono essere contemporaneamente di grandi e di piccoli) non hanno alcuna tendenza a confluire. Essi assumono una lieve tinta eosinofila o basofila e non sono mai del tutto incolori. Si tratta di una alterazione fisica dei colloidi citoplasmatici che va tenuta ben distinta dai vacuoli lipoidei o acquosi, quali si vedono nell'idrope cellulare. A differenza di quanto avviene per i vacuoli da processi flogistici, quelli della reazione da raggi non hanno di solito una distribuzione perinucleare, ma si trovano disseminati asimmetricamente nel citoplasma. L'aumento della grandezza delle cellule non dipende dalla vacuolizzazione ed è da interpretare come una conseguenza della disturbata divisione cellulare.

Il citoplasma delle cellule irradiate presenta una pseudoeosinofilia o una amfifilia. Esso assume frequentemente una tonalità brunastra o rosso-bruna ed è denso e meno trasparente che non negli elementi danneggiati. Le forme cellulari possono presentare delle irregolarità e assumere aspetti e dimensioni bizzarre. I limiti cellulari sono in genere netti; se però sussistono contemporaneamente delle alterazioni flogistico- degenerative, essi possono anche essere poco netti e slavati; ciò avviene anzi sovente nelle cellule immature danneggiate da raggi. La vulnerabilità della membrana cellulare degli elementi irradiati è dimostrata dai prolungamenti citoplasmatici che evidentemente si formano nel momento in cui le cellule vengono distese sul porta- oggetti.

Le alterazioni del nucleo si manifestano di solito solo alcuni giorni dopo i primi segni della reazione da raggi. I nuclei sono palesemente ingranditi, prevalentemente rotondi o ovalari. La bi- o la plurinuclearità è frequente. Però la struttura nucleare si mantiene quasi normale, vale a dire finemente granulare o reticolare, eventualmente con modeste apposizioni di sostanza cromatinica sul lato interno dell'involucro nucleare. Negli elementi immaturi dell'epitelio pavimentoso o in caso di contemporaneità con influssi flogistici si arriva frequentemente a lesioni degenerative. In tal caso i nuclei appaiono "rigonfi" con struttura sbiadita (cariolisi) oppure si manifesta una condensazione della cromatina (cariopicnosi).

Il segno distintivo caratteristico della reazione da raggi è costituito dal fatto che l'ingrandimento del nucleo si accompagna ad un aumento del citoplasma. Non si arriva quindi a un sensibile spostamento del rapporto nucleo-citoplasma a favore del nucleo, come avviene nelle cellule dei carcinomi, dei carcinomi in situ o delle displasie; cellule e nuclei aumentano in misura proporzionale. La minuta granulazione della cromatina nucleare e la mancanza di una ipercromia consentono in genere la distinzione delle cellule neoplastiche maligne nonostante la non rara mostruosità morfologica.

Le cellule parabasali sono le prime che mostrano un cambiamento, una fine vacuolizzazione che si può trovare dal secondo giorno in poi, più frequentemente dal nono giorno dall'inizio della radiazione. Nelle grandi cellule parabasali si possono visualizzare i depositi di glicogeno con il metodo istochimico (PAS, Best). Singoli o multipli vacuoli possono dislocare il nucleo dal centro alla periferia della cellula e deformare la struttura originale ovalare del nucleo a forma di fagiolo (anello con sigillo). La vacuolizzazione si può trovare anche in cellule atrofiche parabasali non irradiate, ma in modo considerevole è caratteristica nei casi da radiazioni. Nei casi di quadri da post-radiazioni sono frequenti fenomeni di fagocitosi e cannibalismo/engouffment di cellule dello stesso tipo. Il termine "cellule ad occhio d'uccello" è descritto per indicare l'incorporazione di una cellula in altre. Il criterio che permette di distinguere le cellule parabasali vacuolizzate dagli istiociti è il seguente:

- 1) il bordo delle cellule parabasali è completamente distinto, mentre quello degli istiociti è indistinto;
- 2) il citoplasma delle cellule parabasali è finemente vacuolizzato ma non è così schiumoso e trasparente come negli istiociti;
- 3) il nucleo delle cellule parabasali è di forma ovalare anziché a forma di fagiolo. Visto il restringimento dei nuclei si forma un alone perinucleare;
- 4) il nucleo delle cellule parabasali è originariamente vacuolizzato al centro invece che alla periferia, come nell'istocita. Alcune volte gli istiociti giganti possono essere mal interpretati come cellule squamose multinucleate e viceversa. Le cellule parabasali mostrano un proporzionale ingrossamento del citoplasma (macrocitosi) e nucleare (macrocariosi), mentre diminuisce la cianofilia citoplasmatica e la densità della cromatina nucleare.

Bi e multinucleazioni (da sei a più nuclei) è un fenomeno comune nelle radiazioni. Può capitare che i nuclei si separino mentre il citoplasma rimane compatto. L'aumento del citoplasma di solito corrisponde al numero dei nuclei, cosicché il rapporto N/C rimane come quello di una cellula parabasale benigna. In altri casi i nuclei possono essere in carioressi e cariolisi.

Qualche volta l'alone perinucleare è dovuto dal restringimento nucleare. La presenza di un vacuolo perinucleare non deforma il nucleo, ma è segno di degenerazione citoplasmatica. Nei quadri di post-radiazione, le cellule parabasali, intermedie e superficiali non cambiano taglia e forma, nonostante il restringimento della membrana nucleare. Con il persistere delle radiazioni, dopo anni, è normale trovare cellule di forme bizzarre.

Nelle cellule tumorali si svolgono, per azione da raggi, modificazioni sostanzialmente uguali a quelle degli elementi piatti. Nelle cellule tumorali sussiste, anche senza che esse vengano irradiate, una grande variabilità morfologica; perciò è estremamente difficile valutare quanto è dovuto alla sola malignità e quanto è invece condizionato dalle radiazioni.

Infatti i caratteri dell'aumento di grandezza dei nuclei, della deformazione delle cellule e dei nuclei, dei processi degenerativi con cariolisi o cariopicnosi, della vacuolizzazione citoplasmatica possono sussistere nelle cellule di strisci di donne non irradiate ed essere un segno della malignità delle cellule stesse. Se si ha la possibilità di confronto con i preparati antecedenti al trattamento radiante, si nota che l'irradiazione induce nelle cellule tumorali un ulteriore aumento delle loro dimensioni e delle loro bizzarre deformazioni.

La vacuolizzazione si accentua in modo straordinario e si vedono sovente degli sfumati complessi cellulari similinciziali. Gli elementi possono assumere forme fantastiche e mostruose. Al posto di un nucleo unico si possono trovare parecchi frammenti ipercromici sparsi nel citoplasma. Spesso vi è una immigrazione leucocitaria. Sovente le cellule non sono più riconoscibili come tali e ne rimangono soltanto dei frammenti. A differenza delle cellule normali dell'epitelio ghiandolare, quelle degli adenocarcinomi dell'endometrio e dell'endocervice presentano, dopo trattamento con radiazioni ionizzanti, chiari segni di lesioni da raggi.