

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas**

**Citologia de Impressão Conjuntival em Voluntários
Saudáveis**

**Autor: Andressa Prestes Stolz
Orientador: Sérgio Kwitko
Dissertação de Mestrado
2009**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Citologia de Impressão Conjuntival em Voluntários Saudáveis

Autor: Andressa Prestes Stolz
Orientador: Sérgio Kwitko
Dissertação de Mestrado
2009

AGRADECIMENTOS

Seria impossível nomear todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a execução desta pesquisa. Entretanto, alguns agradecimentos são fundamentais:

- ✓ Ao Prof. Sérgio Kwitko pela inspiração profissional, incentivo e confiança, não só durante a realização desta dissertação, mas em minha formação profissional e atuação no mercado de trabalho.
- ✓ Ao Prof. Samuel Rymer por abrir caminhos e dar suporte durante esta pesquisa.
- ✓ À Prof^ª. Diane Marinho, pelo exemplo feminino na oftalmologia.
- ✓ Ao tecnólogo Jeison de Nadai Barros, pelos ensinamentos sinceros que fundamentaram este estudo.
- ✓ Ao colega Felipe Mallmann, por sua participação em todas as etapas desta pesquisa.
- ✓ Ao colega Otávio de Azevedo Magalhães, então acadêmico de medicina, pelo auxílio na captação de pacientes e coleta de dados.
- ✓ À colega Alessandra de Amorim Gobbi, então acadêmica de medicina, pelo engajamento nos esforços iniciais do projeto de pesquisa.
- ✓ A Sra. Neiva Copetti, do laboratório de pesquisa, por sua disposição e interesse no aprendizado das novas técnicas de coloração e preparo das lâminas.
- ✓ A Sra. Marília Menezes da Silva, pelo apoio logístico e amigo desde a época da residência em oftalmologia.
- ✓ Aos voluntários que participaram deste estudo, sem os quais a pesquisa não seria possível.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo exemplo de persistência e dedicação e por viabilizarem com muito esforço minha formação.

Ao meu amor, Guilherme, que me torna uma pessoa melhor. Afinal, agora será “depois da tese”...

SUMÁRIO

Introdução.....	07
Revisão da Literatura	
Citologia de Impressão.....	08
Técnica do exame – coleta e coloração	09
Interpretando os resultados: Epitélio conjuntival normal – padrão histológico	10
Interpretando os resultados: Epitélio conjuntival normal – padrão citológico	13
Correlação entre Citologia de Impressão e demais exames da superfície ocular.....	18
Aplicabilidade	19
Referências bibliográficas	20
Objetivos	23
Artigo Original – Português	
Resumo	24
Introdução	25
Materiais e Métodos	26
Análise Estatística	29
Resultados	30
Discussão	38
Referências bibliográficas	44
Artigo Original – Inglês	
Abstract	47
Introduction	48
Material e Methods	49
Statistical analysis.....	52
Results	53

Discussion	61
References	66
Anexos	
Consentimento livre e esclarecido do paciente participante.....	69
Ficha de avaliação da citologia de impressão à microscopia óptica	70
Roteiro/Ficha de exames clínicos dos pacientes.....	71

INTRODUÇÃO

O conhecimento das características do epitélio conjuntival normal é importante no diagnóstico e na reabilitação visual de pacientes com doenças da superfície ocular.¹ A análise histológica por meio de biópsia constitui um método bastante invasivo e de difícil aplicabilidade clínica. Já a avaliação citológica, por meio da citologia de impressão (CI), é um método fácil e não invasivo² que complementa a avaliação clínica feita pelos exames biomicroscópicos e pela aferição de sintomas.^{1, 3} Além disso, a existência de um teste capaz de identificar o dano estrutural/celular possivelmente causador de sintomas e associado às alterações da superfície ocular identificadas pelos exames clínicos seria de fundamental relevância na comprovação diagnóstica de diversas doenças da superfície ocular.⁴

REVISÃO DA LITERATURA

Citologia de Impressão

A citologia de impressão foi empregada pela primeira vez em 1954, na França, no estudo da neoplasia escamosa córneo-escleral.⁵ Em 1977, Egbert, Lauber e Maurice, utilizaram a citologia de impressão para o estudo das células conjuntivais caliciformes em pacientes com olho seco.⁶ Na década de 80, a técnica difundiu-se e começou a ser utilizada em diversas doenças oculares como ceratoconjuntivite sicca, penfigóide ocular cicatricial, deficiência de vitamina A e mucopolissacaridoses.²

O grande diferencial da citologia de impressão em relação à técnica de citologia por raspado é a análise de células ainda viáveis, não descamadas, das camadas superficiais do epitélio (1-3 camadas) com a preservação da morfologia celular e da relação intercelular original.^{2, 7, 8} Além disso, comparado à análise anatomopatológica, a citologia de impressão possibilita o estudo de uma ampla superfície, limitada apenas pelo tamanho do papel filtro, desde que o interesse esteja nas camadas epiteliais superficiais e não nas camadas basais do epitélio.⁹

A análise quantitativa e qualitativa das células córneo-conjuntivais, propiciada pela citologia, permitiu o estudo de metaplasias,^{1, 2} displasias e neoplasias.¹⁰ Essa técnica é útil também na identificação de tecidos,^{11, 12} na análise imunocitoquímica com marcadores de citoqueratinas específicas,⁹ no isolamento de patógenos (herpes simples, adenovírus, varicela zoster,¹³ acanthamoeba)¹⁴ e, mais recentemente, na obtenção de mRNA,¹⁵ células para fenotipagem ou proteínas para Western Blot.^{9, 16}

Técnica do exame – coleta e coloração

A técnica consiste na remoção das camadas superficiais do epitélio mantendo a topografia original do tecido. Existem duas formas de fazê-la: diretamente com a adesão deste

epitélio na superfície que será analisada, ou indiretamente, com a adesão das células em uma membrana que será processada antes da análise. Na técnica direta, pouco utilizada, uma superfície plástica¹⁷ ou uma lâmina de vidro estéril com tratamento não alcalino¹⁸ deve ser encostada na superfície ocular para que haja adesão das camadas superficiais epiteliais. Já na forma indireta, padrão ouro, as células epiteliais aderem em um material poroso (membrana filtrante) que é pressionado contra a superfície ocular, sendo então avaliadas ainda presas nesta nova superfície, que passa por um processamento específico. Diversos tipos de membranas filtrantes naturais, como o tradicional acetato de celulose, ou sintéticas, como o nylon¹⁹ podem ser usadas. O tipo de papel filtro e a técnica da coleta dependem do seu objetivo.⁷ O tamanho dos poros e o tratamento do papel filtro também interferem nos resultados: poros maiores coletam mais células mas os detalhes celulares não são tão bem preservados enquanto poros menores e o uso de surfactante captam menos células.²⁰ A maioria dos autores utiliza papéis sem surfactante e com poros entre 0,22 e 0,45 μm .^{7, 20}

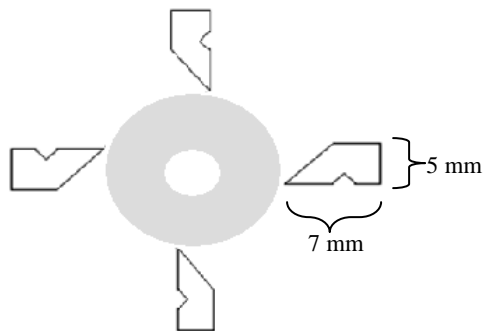
A aplicação do papel filtro na superfície ocular pode ser feita com o auxílio de pinça ou com dispositivos específicos contendo a membrana montada em um suporte para facilitar a técnica.^{13, 21}

A coloração das amostras pode ser feita com diferentes corantes, como ácido periódico de Schiff (PAS) e Papanicolaou (EA 36),³ mas a etapa fundamental para a análise posterior por microscopia óptica é o clareamento do papel filtro. Esse procedimento, conhecido como diafanização, torna o papel transparente, permitindo o exame citológico, mas destruindo os antígenos de superfície, necessários em análises imunohistoquímicas. Por esta razão, para este tipo de análise, modificações da técnica ou outros filtros, como o Biopore ou a membrana de nitrocelulose, são utilizados.^{7, 13}

Descrevemos a técnica empregada em nosso estudo, que foi publicada em pormenores por Barros *et al.*²²

Cinco minutos⁴ após anestesia tópica com 2 gotas de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon® 0,5%, Alcon, São Paulo, Brasil) no fundo de saco inferior, são coletadas amostras de citologia de impressão das conjuntivas superior, inferior, nasal e temporal de ambos os olhos, conforme a figura 1. Foi utilizado papel filtro com poro de 0,45 µm (Millipore HAWP304, Millipore Corporation, Bedford, EUA) recortado conforme a figura 1 e esterilizado em óxido de etileno, permitindo o seu estocamento. O papel foi aplicado com pinça de extremidade suave e pressionado em toda a extensão com auxílio de um cotonete por 2-5 segundos.³

Figura 1: Coleta das amostras nos sítios conjuntivais superior, nasal, inferior e temporal.



Adaptado de Barros *et al*²²

Feita a remoção com pinça por *peeling* e colocado cada fragmento dentro de um tubo de ensaio, totalmente imerso em solução contendo álcool etílico 70%, formaldeído 37% e ácido acético glacial (20:1:1).²²

A técnica de coloração usou PAS, hematoxilina e Papanicolaou modificado, com algumas alterações.²² O procedimento inicia com a remoção do papel com pinça e colocação em cassete próprio para coloração histológica (com 48 lugares e 7 x 7 mm), facilitando os diversos banhos nas diferentes soluções. Após reidratação em álcool etílico 70%, por 2 minutos, o papel é submerso em água da torneira 20 vezes e em água destilada 20 vezes. Segue-se imersão em solução de ácido periódico 0,5% por 2 minutos e após, submersão em água destilada 20 vezes. Então, imersão em solução reagente Schiff 1:3 com água destilada

por 2 minutos e submerso em água da torneira 20 vezes. Prossegue-se com imersão em solução metabissulfito de sódio 0,5% por 2 minutos e então, lava-se 20 vezes com água da torneira. A seguir, deixa-se em solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto e faz-se 20 submersões em água da torneira. Mais 2 minutos de banho em solução “água tap de Scott” (1000 ml água torneira + 2 gramas de bicarbonato de sódio + 10 gramas de sulfato de magnésio) e 20 submersões em água da torneira. Deixa-se 30 segundos em álcool etílico 95% e em solução Orange G 6 puro por 2 minutos. Prossequimos com imersão por 3 minutos em álcool etílico 95% e por 2 minutos em EA 36. Após, deixa-se em álcool etílico 95% por 10 minutos. Desidrata-se com álcool absoluto 2 minutos e após, deixa-se em nova solução de álcool absoluto por mais 3 minutos. Realiza-se diafanização por meio de soluções virgens de xilol, por 7 e 8 minutos para obter a transparência do papel filtro.

Finalmente, são posicionados os 8 papéis de cada paciente em uma lâmina, com epitélio para cima, cobertos com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) e com 1 lamínula para cada olho. A lâmina é identificada com as iniciais do paciente e a data da coleta; as lamínulas com o olho (OD e OE) e os fragmentos com o sítio (S, N, I e T).

Interpretando os resultados

Epitélio conjuntival normal – Padrão Histológico

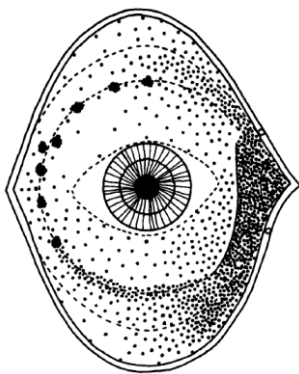
O epitélio conjuntival é estratificado, não queratinizado e composto por 2 tipos celulares: células epiteliais não secretoras e células caliciformes. O epitélio está organizado em 2 a 12 camadas, variando conforme a localização e a idade.²³

As células epiteliais não secretoras possuem citoplasma rico em organelas e apresentam junções intercelulares especializadas e complexos de adesão ao substrato.²³

Já as células caliciformes são as maiores produtoras de mucina do filme lacrimal. Apresentam-se isoladas ou organizadas em criptas, denominadas criptas de Henle. Sua densidade é bastante variável (1000 – 56.000 por mm² de superfície conjuntival) e dependente

da região da conjuntiva (figura 2): maior densidade na conjuntiva palpebral, junto aos pontos lacrimais (porção nasal); e depois, na conjuntiva bulbar no fórnice médio (entre o limbo e o fundo de saco), especialmente na conjuntiva bulbar protegida pelas pálpebras.^{6, 23-25} Na conjuntiva bulbar exposta, a conjuntiva nasal apresenta mais células caliciformes que a conjuntiva temporal.²⁵ Finalmente, na região perilímbica parece existir uma zona com muito poucas ou nenhuma célula caliciforme nos 360°.²⁵

Figura 2: Densidade de células caliciformes na conjuntiva. Olho direito.²⁵



Epitélio conjuntival normal – Padrão citológico

O padrão celular visto na citologia de impressão não é exatamente igual ao visto na análise histológica, pois a CI analisa apenas as camadas superficiais do epitélio conjuntival.^{2, 9} Entretanto, seus achados devem ser compatíveis com um epitélio estratificado secretor não queratinizado.

Com o emprego da citologia de impressão em doenças da superfície ocular demonstrou-se que o epitélio conjuntival normal pode sofrer modificações e se transformar em epitélio não secretor queratinizado.^{2, 8} Esta transformação patológica é chamada metaplasia escamosa.²⁶ Durante este processo dinâmico de diferenciação celular anormal, existe um espectro contínuo de alterações citológicas, que cursa com redução e até ausência de células caliciformes e envolve mudanças progressivas na morfologia das células epiteliais não secretoras.³

De forma geral, a análise da CI conjuntival sob microscopia ótica abrange alguns parâmetros principais, como: (1) qualidade das células epiteliais não secretoras (tamanho, quantidade, adesão intercelular, relação núcleo:citoplasma, aspecto nuclear); (2) densidade das células caliciformes; e (3) presença de outras células (células inflamatórias, microorganismos).^{2, 8, 27, 28} Assim, a avaliação da citologia de impressão por microscopia ótica permite a quantificação da metaplasia escamosa.

Existem inúmeras classificações e interpretações para a metaplasia escamosa.^{2, 3, 8, 27, 28} Nelson² dividiu a metaplasia escamosa em 4 graus, baseado na relação núcleo:citoplasma (N:C) e na densidade das células caliciformes. Tseng⁸ definiu 6 estágios usando a perda progressiva de células caliciformes, as alterações nucleares e citoplasmáticas e a queratinização. Adams, Dilly e Kirkness²⁷ propuseram 4 estágios da metaplasia, mas além da morfologia das células epiteliais não secretoras e caliciformes consideravam a presença de células inflamatórias. Calonge *et al*³ em seu extenso trabalho de revisão sobre citologia de impressão montou uma tabela comparativa entre estas classificações (tabela 1). Aragona *et al*²⁸ sugeriu um escore multiparamétrico com todos estes elementos e também anormalidades nucleares (tabela 2).

A classificação de Aragona *et al*²⁸ avalia, portanto, todos os critérios propostos na literatura e oferece uma vantagem para utilização em pesquisa: um escore quantitativo que pode também ser utilizado como categórico.

Não existe uma transposição exata entre as classificações, mas baseado em seus critérios podemos reclassificar as amostras. Em seu artigo de revisão, Calonge *et al*³ faz este exercício para uma dada amostra, como mostra a figura 3.

Tabela 1: Sistemas de graduação de citologia de impressão

		Células caliciformes			Células epiteliais não secretoras				
		Tamanho/ forma	Densidade	Coloração PAS	Tamanho/forma	Coloração citoplasma	Tamanho N	Relação N:C	Outro
Tseng, 1985	Estágio 0: epit conj normal	NE	Moderada	NE	Uniforme	Azul-verde		1:1	
	Estágio 1: red CC, sem Q	NE	Reduzida	NE	↑ leve	Azul-verde		1:2- 1:3	
	Estágio 2: aus CC, sem Q	NE	Ausente	NE	↑ moderado, achatada (escamóide)	Azul-verde até rosado		1:4	
	Estágio 3: Q leve	NE	Ausente	NE	Muito escamóide	Rosado		1:6	FC visível, picnose N
	Estágio 4: Q moderada	NE	Ausente	NE	Muito escamóide, grande	Rosado		1:8	C condensada, picnose N, Gr. hialinos
	Estágio 5: Q severa	NE	Ausente	NE	Citoplasma encolhido	NE	Ausente	NE	C condensada, picnose N
Nelson, 1988	Grau 0	Cheia, oval	Abundante	Intensa	Pequena, redonda	Eosinofílico	Grande	1:2	N basofílico
	Grau 1	Cheia, oval	Reduzida	Intensa	Levemente maior, mais poligonal	Eosinofílico	Menor	1:3	NE
	Grau 2	Menor, bordas mal definidas	Muito Reduzida	Menos intensa	Maior poligonal	Variável	Pequeno	1:4- 1:5	MN eventual
	Grau 3	NE	Raras	NE	Grande poligonal	Basofílico	Pequeno	>1:6	Picnótico
Adams, 1988	Grau 0	NE	Abundante	Intensa	Normal	NE	Normal	1:2	Boa celularidade
	Grau 1	NE	Levemente reduzida	Intensa	Maior	NE	NE	1:3	Boa celularidade
	Grau 2	NE	Reduzida	Reduzida	Maior	NE	NE	NE	Celularidade reduzida
	Grau 3	NE	Muito reduzida	Pálida	Grande, irregular	NE	Pequeno	NE	Celularidade pobre

aus, ausência; C, cromatina; CC, células caliciformes; conj, conjuntival; epit, epitélio; FC, filamento cromatina; Gr., grânulos; N, núcleo; N:C, núcleo:citoplasma; NE, não especificado; Q, queratinização; red, redução.

Adaptado de Calonge *et al.*³

Tabela 2: Sistema de Escore para citologia de impressão conjuntival de Aragona *et al.*²⁸

Parâmetro	Normal	Limítrofe	Anormal
Celularidade	0	1	2
Contato célula-célula	0	1	2
Relação núcleo/citoplasma	0 (1:2-3)	1 (1:4-5)	2 (1:≥ 6)
Cromatina nuclear	0	1 (até 1%)*	2 (> 1%)*
Distribuição célula caliciforme	0	1	2
Queratinização	0	1	2-3
Células inflamatórias	0	-	2-3
Escore total	0-3	4-6	> 6
	(classe A)	(classe B)	(classe C)

*se cromatina *snake-like*
Adaptado de Aragona *et al.*²⁸

Também podemos traçar um paralelo entre as classificações de Nelson e Aragona, como mostra a figura 4. Aparentemente, os graus 0 e 1 de Nelson seriam a classe A de Aragona (normal);²⁶ enquanto o grau 2 de Nelson, a classe B de Aragona (limítrofe); e o grau 3 de Nelson, a classe C de Aragona (anormal).

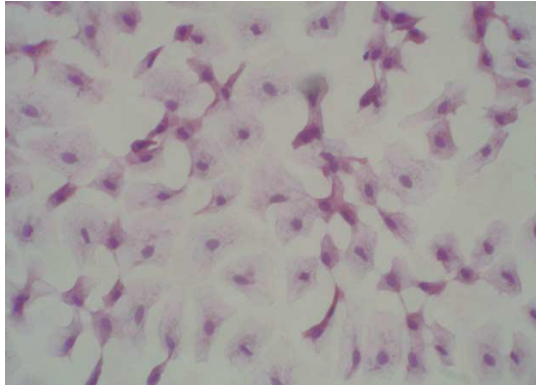


Figura 3: Amostra de citologia de impressão e sua classificação nos diferentes sistemas.

CI de paciente com olho seco por deficiência aquosa e meibomite. Observa-se ausência de células caliciformes. O citoplasma das células epiteliais é maior e a relação núcleo:citoplasma é entre 1:4 e 1:6. Corresponderia a um grau 3 de Adams, a um grau 2-3 de Nelson, a um estágio 4 de Tseng e a classe B de Aragona.

(Polyether sulfone filters and PAS-Giemsa staining, $\times 40$)

Adaptado de Calonge *et al.*³

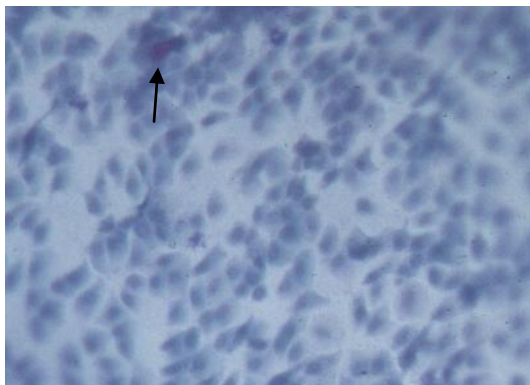


Figura 4: Amostra de citologia de impressão e sua classificação nos sistemas de Nelson² e Aragona.²⁸

CI de paciente saudável. Observa-se redução acentuada das células caliciformes (seta), relação núcleo:citoplasma entre 1:2 e 1:4, déficit de adesão intercelular e da celularidade. Corresponderia a um grau 2 de Nelson e um escore 4 de Aragona (classe B = limítrofe).

(PAS/HE/Papanicolaou MO 200x)

A descrição de anormalidades nucleares das células epiteliais não secretoras é utilizada como critério nas classificações de Nelson (“núcleos basofílicos” no grau 0, “multinucleação ocasional” no grau 2 e “picnóticos” no grau 3) e Tseng (“núcleos picnóticos” nos estágios ≥ 3). Na classificação de Aragona, por sua vez, pontua-se especificamente as anormalidades da cromatina nuclear.²⁸

Um tipo específico de alteração da cromatina nuclear, com morfologia anormal e semelhante a uma cobra, descrito como *snake-like chromatin*, foi observado em pacientes com ceratoconjuntivite sicca²⁹ e posteriormente identificado em Síndrome de Sjögren Primário,³⁰ olho seco severo,³⁰ usuários de lentes de contato³¹ e após cirurgia de catarata.³²

Essa anomalia teve sua prevalência estimada em 47% dos moradores de Copenhague entre 30-60 anos.³⁰

Os mecanismos patogênicos desta alteração da cromatina permanecem obscuros, mas o trauma palpebral direto é um dos mais fortes candidatos,^{30, 33} e justificaria a presença da alteração quase que exclusivamente na conjuntiva bulbar superior, como descrito na maioria dos estudos.

O padrão de distribuição da aberração da cromatina é em ilhas circundadas por células normais.³⁰ A descrição de sua magnitude nas amostras é feita por meio de 4 categorias: 0%, 0-1%, 1-10%, e > 10%.³⁰ Para fins de pontuação no escore de Aragona, utilizamos 1 ponto para densidade 0-1% e 2 pontos para densidades > 1% (tabela 2). Existem relatos esparsos de associação da cromatina *snake-like* com o escore da metaplasia escamosa,³⁴ mas este tema ainda foi pouco estudado.

O estudo das diversas características nas amostras de CI pode ser feito quantitativamente com o auxílio de “*grid*” calibrado, programas de computador ou análises fotográficas, bem como qualitativamente, por meio de escalas descritivas.^{8, 24, 35, 36} Para Ozkan *et al*³⁷ o método qualitativo parece mais confiável, uma vez que as amostras são representativas de pequenas áreas e mesmo dentro destas áreas observamos algumas variações nos achados. Além disso, em estudo que analisou o tamanho celular e a relação núcleo:citoplasma por planimetria, houve boa correlação entre estes achados “objetivos” e o sistema de classificação descritivo convencional.³⁶ A superioridade da análise qualitativa também é defendida na avaliação das características da cromatina nuclear.³⁰ Bjerrum *et al*³⁰ comparou as avaliações quantitativa e qualitativa para a presença de cromatina *snake-like* e concluiu que a avaliação qualitativa, descrevendo o percentual de células com a anomalia encontrado nas amostras, seria a mais apropriada.³⁰

Não existe um ponto de corte bem estabelecido e com relevância clínica definida na determinação do normal e do anormal em citologia de impressão. Já foi descrita variação do padrão citológico conforme o ritmo circadiano, sítio conjuntival avaliado e número de amostras coletadas no local.^{3, 26} Também há relatos conflitantes quanto a diferenças relacionadas a gênero,³⁸ idade³⁸ e oscilações hormonais em mulheres.³

A densidade das células caliciformes, desde as primeiras descrições de citologia de impressão, parece variar de forma significativa entre as diferentes áreas da conjuntiva,^{8, 24, 27} havendo maior concentração nas conjuntivas palpebrais inferior^{26, 35} e superior (especialmente nasal),^{6, 26} e bulbares inferior²⁶ e superior,²⁶ e menor densidade na conjuntiva bulbar interpalpebral.^{6, 26, 35}

Também diferenças no grau de metaplasia escamosa entre as diferentes regiões da conjuntiva bulbar já foram descritas, sendo atribuídas à exposição na região da fenda palpebral,³⁹ ou até mesmo ao microtrauma gerado pelo piscar na conjuntiva superior.³⁹ Na literatura, a taxa de grau zero de metaplasia na citologia de controles normais foi de 80% nos sítios temporal e nasal.⁴⁰

Aliás, a maioria das descrições da citologia conjuntival normal provém de amostras de pacientes usados como controles em estudos de citologia em condições patológicas.^{3, 31, 41} Nestes casos, a comprovação da “normalidade” dos olhos controles não obedece a um padrão uniforme,⁴² podendo levar a erros na descrição dos achados citológicos considerados normais⁴³ e a uma falsa correlação com resultados de exames de olho seco ou sintomatologia. A literatura específica de CI em pacientes sem doenças da superfície ocular é restrita,^{26, 38, 42,}⁴⁴ especialmente no nosso país.

Em um dos poucos estudos de pacientes saudáveis, Paschides, Petroutsos e Psilas³⁸ encontraram na citologia conjuntival do sítio superior relações núcleo:citoplasma que variaram de 1:2 até 1:6 e densidades de células caliciformes que oscilaram entre 0 e 3333 por

mm², com média de 510,7 células e um amplo desvio padrão, de 563,96 células/mm². Em outro estudo, Rivas *et al*²⁶ encontrou relações núcleo:citoplasma entre 1:1 e 1:2 na maioria das amostras bulbares e palpebrais, equivalendo ao grau 0 da classificação de Nelson; mas a relação núcleo:citoplasma foi maior que 1:3 em todas as amostras das regiões perilimbares nasal e temporal, o que equivaleria aos graus 2 e 3 de Nelson. A presença de graus leves de metaplasia escamosa em controles infantis “supostamente normais” também foi descrita.⁴⁵

Correlação entre Citologia de Impressão e demais exames da superfície ocular

A presença de metaplasia escamosa da conjuntiva em olhos secos indica uma estreita relação entre a superfície epitelial ocular e o filme lacrimal.⁴⁶

Assim, tentou-se correlacionar, sem resultado, escores da coloração com rosa bengala com o grau de metaplasia escamosa em pacientes com ceratoconjuntivite sicca, hipovitaminose A e penfigóide ocular cicatricial.² Em pacientes com acne rosácea também não houve associação, embora os estágios da citologia de impressão fossem proporcionais à severidade da meibomite.⁴⁷ Também não foi encontrada associação entre o exame de Schirmer I e a metaplasia escamosa.²

Em pacientes com fator de risco ocupacional (*Sick Building Syndrome*), foi demonstrada associação entre sintomatologia de olho seco, citologia de impressão e tempo de ruptura do filme lacrimal.⁴¹

Sabe-se, entretanto, que de forma geral os exames de superfície ocular isoladamente apresentam associação débil entre si ou com sintomatologia.^{48, 49}

Aplicabilidade

Como vimos, existem inúmeras aplicações clínicas e de pesquisa para a citologia de impressão, entretanto ela ainda não se tornou uma rotina diagnóstica na maioria dos centros devido ao gasto de tempo e mudança na rotina tradicional dos exames, tanto para os oftalmologistas quanto para os patologistas. Entretanto, a possibilidade de obter múltiplas

amostras da superfície ocular, com mínimo desconforto para o paciente, torna este um método ideal para a investigação das doenças da superfície ocular quando o diagnóstico não é óbvio clinicamente ou quando precisamos de fundamentação ou documentação. A citologia de impressão também é ferramenta de pesquisa.⁷

Para que se possa implementar o exame na rotina de centros especializados, é necessária a padronização da técnica do exame e a familiaridade da equipe de coleta e preparo das amostras com o procedimento; bem como da equipe de análise microscópica com as características normais do padrão citológico naquela população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dogru M, Katakami C, Nakagawa N, Tetsumoto K, Yamamoto M. Impression cytology in atopic dermatitis. *Ophthalmology* 1998;105:1478-84.
2. Nelson JD. Impression cytology. *Cornea* 1988;7:71-81.
3. Calonge M, Diebold Y, Saez V, et al. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp Eye Res* 2004;78:457-72.
4. Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Surv Ophthalmol* 2001;45 Suppl 2:S221-6.
5. Larmande A, Timsit E. [Importance of cytodiagnosis in ophthalmology: preliminary report of 8 cases of tumors of the sclero-corneal limbus.]. *Bull Soc Ophthalmol Fr* 1954;5:415-9.
6. Egbert PR, Lauber S, Maurice DM. A simple conjunctival biopsy. *Am J Ophthalmol* 1977;84:798-801.
7. Singh R, Joseph A, Umapathy T, Tint NL, Dua HS. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol* 2005;89:1655-9.
8. Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology* 1985;92:728-33.
9. Dart J. Impression cytology of the ocular surface--research tool or routine clinical investigation? *Br J Ophthalmol* 1997;81:930.
10. Nolan GR, Hirst LW. Impression cytology in the diagnosis of ocular surface squamous neoplasia. *Br J Ophthalmol* 2001;85:888.
11. Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-85.
12. Espana EM, Grueterich M, Romano AC, Touhami A, Tseng SC. Idiopathic limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002;109:2004-10.
13. Thiel MA, Bossart W, Bernauer W. Improved impression cytology techniques for the immunopathological diagnosis of superficial viral infections. *Br J Ophthalmol* 1997;81:984-8.
14. Barros Jde N, Mascaro VL, Lowen M, Martins MC, Foronda A. [Diagnosis of *Acanthamoeba* corneal infection by impression cytology: case report]. *Arq Bras Oftalmol* 2007;70:343-6.
15. Corrales RM, Galarreta DJ, Herreras JM, Calonge M, Chaves FJ. [Normal human conjunctival epithelium expresses MUC13, MUC15, MUC16 and MUC17 mucin genes]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2003;78:375-81.
16. Donisi PM, Rama P, Fasolo A, Ponzin D. Analysis of limbal stem cell deficiency by corneal impression cytology. *Cornea* 2003;22:533-8.
17. Thatcher RW, Darougar S, Jones BR. Conjunctival impression cytology. *Arch Ophthalmol* 1977;95:678-81.
18. Athmanathan S, Bandlapally SR, Rao GN. Collection of corneal impression cytology directly on a sterile glass slide for the detection of viral antigen: an inexpensive and simple technique for the diagnosis of HSV epithelial keratitis - a pilot study. *BMC Ophthalmol* 2001;1:3.
19. Meena MK, Khuteta A, Saxena H. Nylon paper: an alternative to cellulose acetate paper for use in conjunctival impression cytology. *Br J Ophthalmol* 2005;89:1223-4.
20. Martinez AJ, Mills MB, Jaceldo KB, et al. Standardization of conjunctival impression cytology. *Cornea* 1995;14:515-22.
21. Simon MW, Miller D, Pflugfelder SC, Murchison JF, Huang AJ, Atherton SS. Comparison of immunocytology to tissue culture for diagnosis of presumed herpesvirus dendritic epithelial keratitis. *Ophthalmology* 1992;99:1408-13.
22. Barros J, Mascaro V, Gomes J, Freitas D, Lima A. Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e de coloração. *Arq Bras Oftalmol* 2001;64:127-31.

23. Hart WM. Adler's Physiology of the Eye: clinical application, 9th ed ed. St. Louis: George S. Stamathis, 1992:888.
24. Nelson JD, Wright JC. Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disease. Arch Ophthalmol 1984;102:1049-51.
25. Kessing SV. Mucous gland system of the conjunctiva. A quantitative normal anatomical study. Acta Ophthalmol (Copenh) 1968:Suppl 95:1+.
26. Rivas L, Oroza MA, Perez-Esteban A, Murube-del-Castillo J. Topographical distribution of ocular surface cells by the use of impression cytology. Acta Ophthalmol (Copenh) 1991;69:371-6.
27. Adams GG, Dilly PN, Kirkness CM. Monitoring ocular disease by impression cytology. Eye 1988;2 (Pt 5):506-16.
28. Aragona P, Romeo GF, Puzzolo D, Micali A, Ferreri G. Impression cytology of the conjunctival epithelium in patients with vernal conjunctivitis. Eye 1996;10 (Pt 1):82-5.
29. Marner K. 'Snake-like' appearance of nuclear chromatin in conjunctival epithelial cells from patients with keratoconjunctivitis sicca. Acta Ophthalmol (Copenh) 1980;58:849-53.
30. Bjerrum KB. Snake-like chromatin in conjunctival cells of a population aged 30-60 years from Copenhagen City. Acta Ophthalmol Scand 1998;76:294-8.
31. Adar S, Kanpolat A, Surucu S, Ucakhan OO. Conjunctival impression cytology in patients wearing contact lenses. Cornea 1997;16:289-94.
32. Tsubota K, Yamada M, Kajiwara K, Ugajin S, Hasegawa T, Kobayashi TK. Cytologic evaluation of conjunctival epithelium after cataract surgery. Cornea 1992;11:418-26.
33. Cher I. Blink-related microtrauma: when the ocular surface harms itself. Clin Experiment Ophthalmol 2003;31:183-90.
34. Sengor T, Gurdal C, Kirimlioglu H, Irkec M, Aydin S. Colour-coded mapping technique in impression cytology - findings in soft contact lens wearers and patients with other external eye diseases. Ophthalmologica 2002;216:155-8.
35. Nelson JD, Havener VR, Cameron JD. Cellulose acetate impressions of the ocular surface. Dry eye states. Arch Ophthalmol 1983;101:1869-72.
36. Doughty MJ, Blades K, Button NF, Wilson G. Further analysis of the size and shape of cells obtained by impression cytology from the exposed portion of the human bulbar conjunctiva. Ophthalmic Physiol Opt 2000;20:391-400.
37. Ozkan SB, Soylev MF, Vahapoglu H, Can D, Arsan AK, Duman S. Evaluation of conjunctival morphology in thyroid associated eye disease by use of impression cytology. Acta Ophthalmol Scand 1997;75:145-7.
38. Paschides CA, Petroustos G, Psilas K. Correlation of conjunctival impression cytology results with lacrimal function and age. Acta Ophthalmol (Copenh) 1991;69:422-5.
39. Murube J, Rivas L. Impression cytology on conjunctiva and cornea in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. Eur J Ophthalmol 2003;13:115-27.
40. Arici MK, Arici DS, Topalkara A, Guler C. Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. Clin Experiment Ophthalmol 2000;28:113-7.
41. Fenga C, Aragona P, Cacciola A, et al. Ocular discomfort and conjunctival alterations in operating room workers. A single-institution pilot study. Int Arch Occup Environ Health 2001;74:123-8.
42. Gadkari SS, Adrianwala SD, Prayag AS, Khilnani P, Mehta NJ, Shaha NA. Conjunctival impression cytology--a study of normal conjunctiva. J Postgrad Med 1992;38:21-3, 22A-22B.
43. Chan CM, Liu YP, Tan DT. Ocular surface changes in pterygium. Cornea 2002;21:38-42.

44. Connor CG, Flockencier LL, Hall CW. The influence of gender on the ocular surface. *J Am Optom Assoc* 1999;70:182-6.
45. Wittpenn JR, Tseng SC, Sommer A. Detection of early xerophthalmia by impression cytology. *Arch Ophthalmol* 1986;104:237-9.
46. Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea* 1998;17:38-56.
47. Yaylali V, Ozyurt C. Comparison of tear function tests and impression cytology with the ocular findings in acne rosacea. *Eur J Ophthalmol* 2002;12:11-7.
48. Wright JC, Meger GE. A review of the Schirmer test for tear production. *Arch Ophthalmol* 1962;67:564-5.
49. Schein OD, Tielsch JM, Munoz B, Bandeen-Roche K, West S. Relation between signs and symptoms of dry eye in the elderly. A population-based perspective. *Ophthalmology* 1997;104:1395-401.

OBJETIVOS

1. Padronizar a técnica do exame de citologia de impressão conjuntival em nosso serviço;
2. Descrever os achados citológicos conjuntivais de voluntários sem doenças de superfície ocular, utilizando-se a quantificação da metaplasia escamosa conjuntival;
3. Avaliar se existe correlação entre os resultados dos testes clínicos da superfície ocular (tingimento e função lacrimal) e/ou sintomatologia com o padrão da citologia de impressão;

Citologia de impressão conjuntival em voluntários saudáveis

RESUMO

Objetivo: descrever os achados de citologia de impressão em voluntários saudáveis e correlacioná-los com testes de olho seco e sintomatologia. **Métodos:** coleta de citologia de impressão (CI) da conjuntiva superior, inferior, nasal e temporal após anamnese, questionário de sintomas (QU) e exames clínicos biomicroscópicos, teste de Schirmer (TS), tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL), escores de fluoresceína (EF) e rosa bengala (ERB).

Resultados: Foram examinados 78 olhos de 39 pacientes (30 mulheres, 85% brancos). Idade média foi de 36 anos (16-71 anos). Oitenta e cinco por cento dos pacientes eram assintomáticos no QU. TRFL médio foi de 13,6 segundos (70% \geq 10 s), TS médio foi 19,2 mm (76% \geq 6 mm), ERB foi 0-3 em 87%, EF foi zero em 75%. Biomicroscopia apresentou resultado normal em 65% dos olhos. CI foi normal em: 81% superior, 57% nasal, 87% inferior, 75% temporal. Foi encontrado padrão de cromatina *snake-like* em 15% das amostras superiores. Houve pouca correlação entre os testes clínicos, questionário e achados citológicos. A citologia de impressão do sítio nasal e a presença de cromatina *snake-like* associaram-se com alguns testes da superfície ocular, sintomas e com a idade dos pacientes.

Conclusão: Nosso estudo encontrou 30% de testes clínicos anormais, sintomas e achados citológicos alterados (anormal e limítrofe) neste grupo de indivíduos normais. Os achados da conjuntiva bulbar da área de fenda e superior são os que mais apresentam alterações. Entretanto, apesar de algumas associações significativas, não houve correlação conclusiva entre testes, sintomas e citologia de impressão.

Descritores: citologia de impressão, olho seco, metaplasia escamosa, superfície ocular, questionário, sintomas, cromatina *snake-like*.

INTRODUÇÃO

A avaliação da superfície ocular e o conhecimento das características do epitélio córneo-conjuntival normal são importantes para diagnóstico e reabilitação visual de pacientes com doenças da superfície ocular.¹

A superfície pode ser avaliada por meio de testes clínicos de tingimento por corantes específicos, por exames da função lacrimal e pela avaliação direta das células do tecido córneo-conjuntival. A análise histológica por meio de biópsia constitui um método bastante invasivo e de difícil aplicabilidade clínica. Já a avaliação citológica, por meio da citologia de impressão, é um método fácil e não invasivo,² que complementa a avaliação clínica feita pelos exames biomicroscópicos e pela aferição de sintomas.^{1,3}

O objetivo deste estudo foi determinar, por meio da citologia de impressão, o padrão citológico conjuntival em voluntários saudáveis. O grupo também foi avaliado quanto à presença de sintomas e resultados dos demais exames de superfície ocular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo transversal de voluntários entre 16 e 75 anos de idade, oriundos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A amostra incluiu acompanhantes de pacientes do Departamento de Oftalmologia, membros da equipe e estudantes de medicina que freqüentaram o serviço.

Os voluntários não poderiam ter diagnóstico prévio de doenças da superfície ocular ou doença sistêmica classicamente associada a alterações da superfície ocular, além de não usarem medicações tópicas ou lentes de contato. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado livre e esclarecido aprovado pelo comitê de ética da instituição (anexo I).

Cinco minutos após a realização dos demais exames de superfície ocular (descritos a seguir), sob anestesia tópica com 2 gotas de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon® 0,5%, Alcon, São Paulo, Brasil) no fundo de saco inferior, foram coletadas amostras de citologia de impressão da conjuntiva superior, inferior, nasal e temporal de ambos os olhos dos pacientes, conforme técnica descrita por Barros *et al.*⁴ Foi utilizado papel filtro com poro de 0,45 µm (Millipore HAWP304, Millipore Corporation, Bedford, EUA).

A leitura da citologia foi feita por microscopia óptica, por médico “cego” para o resultado do exame clínico do paciente. Apenas amostras com celularidade representando mais de 70% da área do filtro de papel foram válidas para análise. A classificação de metaplasia escamosa utilizada foi a de Aragona *et al.*^{5, 6} que compreende 3 grupos: “A” citologia normal; “B” citologia limítrofe; e “C” citologia anormal. Essa categorização provém de um escore quantitativo da análise de 7 parâmetros, como visto na tabela 1 (anexo II). A presença de cromatina nuclear com morfologia anormal, sob a forma de *snake-like*, foi avaliada em relação ao percentual de células apresentando esta anomalia e classificada em categorias: até 5

células, 0-1%, 1-10%, e > 10%, conforme proposto anteriormente⁷ e integrada na quantificação da metaplasia (tabela 1).

Tabela 1. Sistema de classificação da citologia de impressão

Parâmetro	Normal	Limítrofe	Anormal
Celularidade	0	1	2
Contato célula-célula	0	1	2
Relação núcleo/citoplasma	0 (1:2-3)	1 (1:4-5)	2 (1:≥ 6)
Cromatina nuclear	0	1 (até 1%)*	2 (> 1%)*
Distribuição célula caliciforme	0	1	2
Queratinização	0	1	2-3
Células inflamatórias	0	-	2-3
Score total	0-3 (classe A)	4-6 (classe B)	> 6 (classe C)

*se cromatina *snake-like*
Adaptado de Aragona *et al*^{5,6}

A avaliação da superfície ocular dos pacientes iniciava com a anamnese e a aplicação de questionário de sintomas oculares. O *Salisbury Eye Evaluation Questionnaire*^{8, 9} contém perguntas sobre seis sintomas, a saber: Você sente os olhos secos? Você tem a sensação de areia nos olhos? Você tem sensação de queimação nos olhos? Os seus olhos ficam vermelhos? Você percebe formação de crostas nos cílios? Os seus olhos ficam grudados pela manhã? A intensidade destes sintomas é quantificada em: nunca, raramente, às vezes, frequentemente ou sempre. Consideramos positivas as respostas frequentemente e sempre. Os pacientes com 1 ou mais respostas positivas foram considerados sintomáticos.

A seguir, eram realizados, por outro examinador, os testes clínicos, do menos ao mais invasivo (anexo III).¹⁰

A biomicroscopia avaliou a presença de alterações palpebrais e córneo-conjuntivais (meibomite, blefarite, conjuntivite, pterígio, pingüecula, ceratoconjuntivite límbica superior, simbléfaro, neovascularização corneana, etc). O teste de tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) com fluoresceína foi realizado a seguir, utilizando-se bastão umedecido de fluoresceína (Ophthalmos, São Paulo, Brasil), conforme técnica proposta anteriormente.¹¹ A média de três medidas foi utilizada, sendo considerada normal quando ≥ 10 segundos.¹²⁻¹⁵

Em seguida, quantificou-se a intensidade de tingimento da superfície corneana pela fluoresceína, utilizando-se uma escala de zero a 3 pontos: zero – sem corar; um – corando menos de 1/3 da córnea; dois – corando menos de 2/3 da córnea; três – corando mais de 2/3 da córnea.¹³ Foram considerados como normais os escores zero e um.¹⁶ Passados 5 minutos do teste anterior, após normalização do menisco lacrimal,¹⁰ foi realizado o teste de Schirmer I sem anestésico, com os olhos fechados, para avaliação da produção lacrimal basal e reflexa.¹⁷ O umedecimento da fita (Ophthalmos, São Paulo, Brasil), quantificado após 5 minutos,^{10, 13, 17} foi considerado normal quando > 5 mm.¹⁸ A seguir, após colocação de 1 gota de colírio anestésico (cloridrato de proximetacaína 0,5%), foi medido o tingimento córneo-conjuntival com 20 µl de rosa bengala 1%¹³ e classificado em escore de 0-9 pontos, conforme proposto por Bijsterveld.¹⁹ Neste escore, soma-se a pontuação obtida pelo tingimento em três regiões da superfície ocular: conjuntiva bulbar medial, córnea e conjuntiva bulbar temporal; sendo que o tingimento de pontos isolados equivale a 1 ponto, o tingimento de pontos agrupados a 2 e o de pontos coalescentes a 3, em cada região.¹⁹ Consideramos normais escores até 3 (0, 1, 2 e 3).^{18, 20}

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). As variáveis foram analisadas na sua forma quantitativa e também qualitativa após categorização.

O coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman (ρ) foi utilizado para avaliar a relação entre os resultados quantitativos da citologia e dos testes de função lacrimal e tingimento. A análise das variáveis qualitativas foi feita pelo teste quiquadrado e a concordância entre os exames foi descrita pelo coeficiente *kappa* (k). O teste não paramétrico de Mann-whitney foi utilizado para associação das variáveis categóricas com as quantitativas.

O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

Foram examinados 80 olhos de 40 voluntários saudáveis, sendo que 1 paciente foi excluído por apresentar pterígio < 0,5 mm em um dos olhos. A amostra incluiu então 78 olhos de 39 pacientes (30 mulheres), com idade média de 35,7 anos (DP 14,6; 16 - 71 anos). Trinta e três pacientes (84,6%) eram brancos, 5,1 % negros e 10,3 % mulatos.

A anamnese identificou 6 pacientes (15,4%) hipertensos e 5 pacientes (12,9%) com outras doenças (depressão, asma), mas nenhum em uso de medicação classicamente associada a alterações na superfície ocular. Nenhum paciente era tabagista.

A avaliação biomicroscópica conjuntival foi normal bilateralmente em todos os olhos incluídos.

As bordas palpebrais estavam absolutamente normais em 51 olhos (65,4%), sendo que dos 27 demais, 24 apresentavam graus leves de meibomite, 1 blefarite leve e 2 olhos possuíam papiloma na margem palpebral. Essas alterações dos bordos palpebrais não se correlacionaram com nenhum dos exames de superfície ocular, com sintomas ou com o resultado da citologia de impressão.

Em relação ao questionário de sintomas, 84,6% foram assintomáticos (nenhum sintoma frequentemente ou sempre), enquanto 5 pacientes apresentaram uma resposta positiva e 1 paciente apresentou três respostas positivas (tabela 2). Não houve associação entre o resultado do questionário e os valores médios dos testes de TRFL, Schirmer, tingimento com rosa bengala ou fluoresceína (tabela 3).

Não houve associação destes testes com a idade dos pacientes (tabela 3).

Os resultados dos testes TRFL, teste de Schirmer e escores de tingimento encontram-se na figura 1.

Tabela 2: Prevalência de sintomas (porcentagem) (n = 39 pacientes)

Sintoma	Nunca	Raramente	Às vezes	Frequentemente	Sempre
Olhos secos	79,5	5,1	15,4	0	0
Sensação de areia	61,5	25,6	7,7	2,6	2,6
Queimação	66,7	20,5	7,7	0	5,1
Olhos vermelhos	41	30,8	23,1	5,1	0
Crostas nos cílios	92,3	2,6	2,6	0	2,6
Olhos grudados	92,3	2,6	2,6	0	2,6

Tabela 3: Resultados dos exames por olho conforme perfil de sintomas e idade

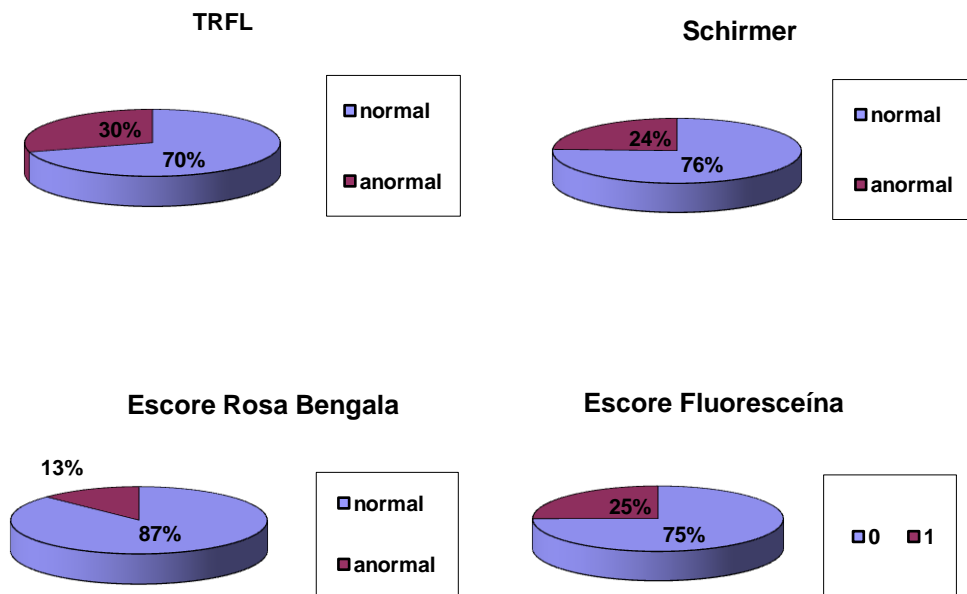
	Assintomáticos n = 66	Sintomáticos n = 12	Total n = 78	> 40 anos n = 26
Idade média (anos)	35,8 ± 15	36,2 ± 12,5	35,7 ± 14,6	-
TRFL médio (segundos)	14,0 ± 6,7	11,1 ± 4,3	13,6 ± 6,5	13,6 ± 6,3
Escore fluoresceína (mediana)	0	0	0	0
Escore Rosa Bengala (mediana)	0	0	1	2
Teste de Schirmer médio (mm)	19,0 ± 13,5	20,3 ± 12,2	19,2 ± 12,9	16,8 ± 12,4

TRFL, tempo de ruptura do filme lacrimal

Considerando-se apenas os 4 exames da superfície ocular, tanto a concordância entre os testes como a sua correlação foram bastante fracas, mas significativas em algumas comparações, como descrito a seguir.

Houve correlação do exame de TRFL com o teste de Schirmer (ρ 0,405, $P < 0,001$). A mediana do Schirmer nos olhos com TRFL normal foi de 26 mm, contra 6,5 mm nos olhos com TRFL < 10 segundos ($P < 0,001$). A concordância entre os testes foi fraca, mas significativa (k 0,29, $P = 0,011$).

Figura 1: resultados dos exames TRFL, teste de Schirmer e escores de tingimento.



Também houve correlação significativa entre o TRFL e o tingimento por fluoresceína ($\rho = 0,35$, $P = 0,002$), ou seja, quanto menor o tingimento pelo corante maior o TRFL. A média de TRFL foi de 14,8 segundos nos olhos com escore de fluoresceína zero *versus* 9,9 segundos nos olhos com escore 1 de tingimento por fluoresceína ($P = 0,003$). A concordância entre os exames foi significativa ($k = 0,415$, $P < 0,001$).

O teste de Schirmer, além da correlação com o TRFL, correlacionou-se também com o tingimento por Rosa Bengala ($\rho = -0,34$, $P = 0,002$). Entretanto, não houve concordância estatisticamente significativa entre os testes. A mediana do Schirmer nos olhos com TRB normal foi de 23 mm, contra 7,5 mm nos olhos com $TRB \geq 4$ ($P = 0,066$).

Citologia de impressão:

A coleta da citologia de impressão resultou em amostras adequadas para análise em 82,7% dos casos, sendo 72 amostras superiores, 60 nasais, 67 inferiores e 59 temporais. Em relação às amostras válidas, a citologia de impressão foi normal em 80,6% das amostras superiores, 56,7% nasais, 86,6% inferiores e 74,6% temporais; limítrofe em 16,7% das amostras

superiores, 30% nasais, 10,4% inferiores e 20,3% temporais; e anormal em 2,8% das amostras superiores, 13,3% nasais, 3% inferiores e 5,1% temporais (figura 2). Os escores da CI encontram-se na tabela 4.

Figura 2. Classificação da Citologia de impressão conforme o sítio avaliado

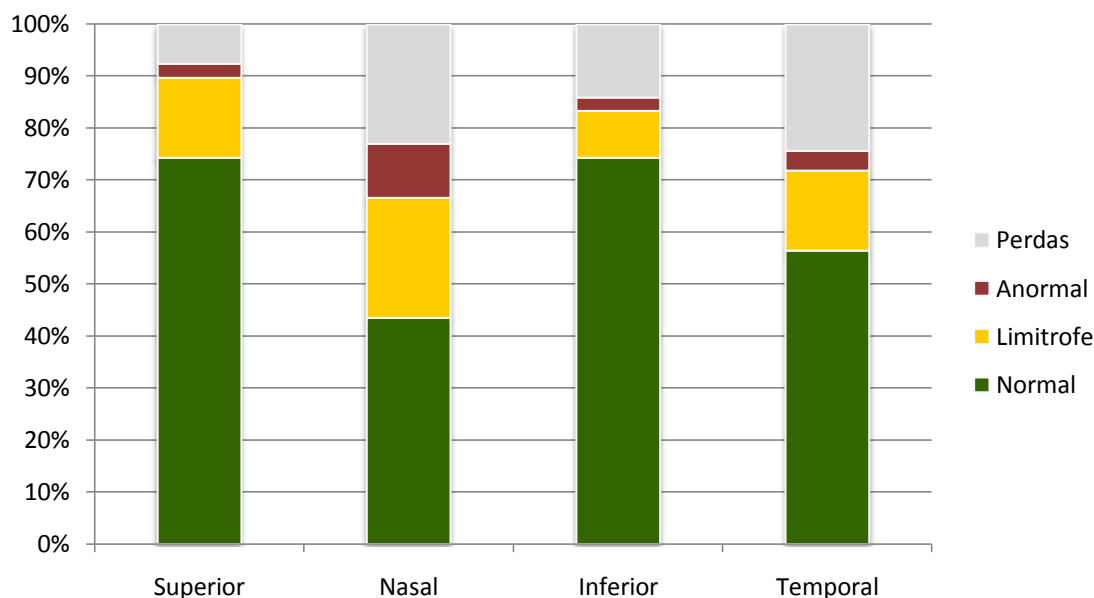


Tabela 4. Escores da Citologia de Impressão

	Mediana	Mínimo	Máximo	Escore 0 e 1 (% do total)
Sítio Superior	1	0	8	63,9%
Sítio Nasal	3	0	10	35%
Sítio Inferior	1	0	8	55,2%
Sítio Temporal	2	0	9	40,7%

Dos sete parâmetros avaliados, os mais comumente alterados em todos os sítios foram a densidade de células caliciformes e a coesão celular. Nos sítios nasal e temporal também a celularidade e a relação N:C estavam frequentemente afetadas. Observamos na figura 3B e 3C, exemplos de perda progressiva de coesão celular, redução do número de células caliciformes e aumento da relação N:C. Nenhuma amostra conteve células inflamatórias.

Não houve correlação clinicamente significativa entre a idade e o resultado da citologia nos diferentes sítios analisados.

O escore da citologia do sítio nasal teve correlação positiva fraca com os demais sítios – superior (ρ 0,31; $P = 0,021$), inferior (ρ 0,48; $P < 0,001$) e temporal (ρ 0,49; $P < 0,001$).

Em relação à presença de cromatina *snake-like*, a prevalência foi de 11/72 (15,3%) das amostras superiores, sendo que a anomalia acometia até 1% das células em 4 amostras, entre 1-10% das células em 2 amostras e $> 10\%$ das células em 5 amostras (vide figura 3D e E). Apenas 2 amostras contendo a aberração em pequeno percentual (até 1%) foram encontradas no sítio temporal. Observamos que quando presentes, as células contendo a anomalia distribuíam-se ao longo de faixas ou “ilhas” no tecido, cercadas por células normais, como demonstra a figura 3E. O percentual de cromatina *snake-like* superior correlacionou-se com o grau de metaplasia escamosa neste sítio (ρ 0,42 $P < 0,001$) e no sítio nasal (ρ 0,36 $P = 0,008$). A presença de cromatina *snake-like* mostrou associação com a idade dos pacientes, sendo a idade média nos olhos com amostras com a aberração 41,5 anos *versus* 33,6 anos nos olhos sem a alteração ($P = 0,024$). Houve correlação entre a presença de cromatina *snake-like* e o teste de Schirmer (ρ -0,3 $P = 0,01$), sendo que a mediana do Schirmer foi 25 mm nos olhos sem a aberração, contra 9 mm nos olhos com a aberração ($P = 0,012$). Entretanto, não houve associação dos testes com o percentual da anomalia.

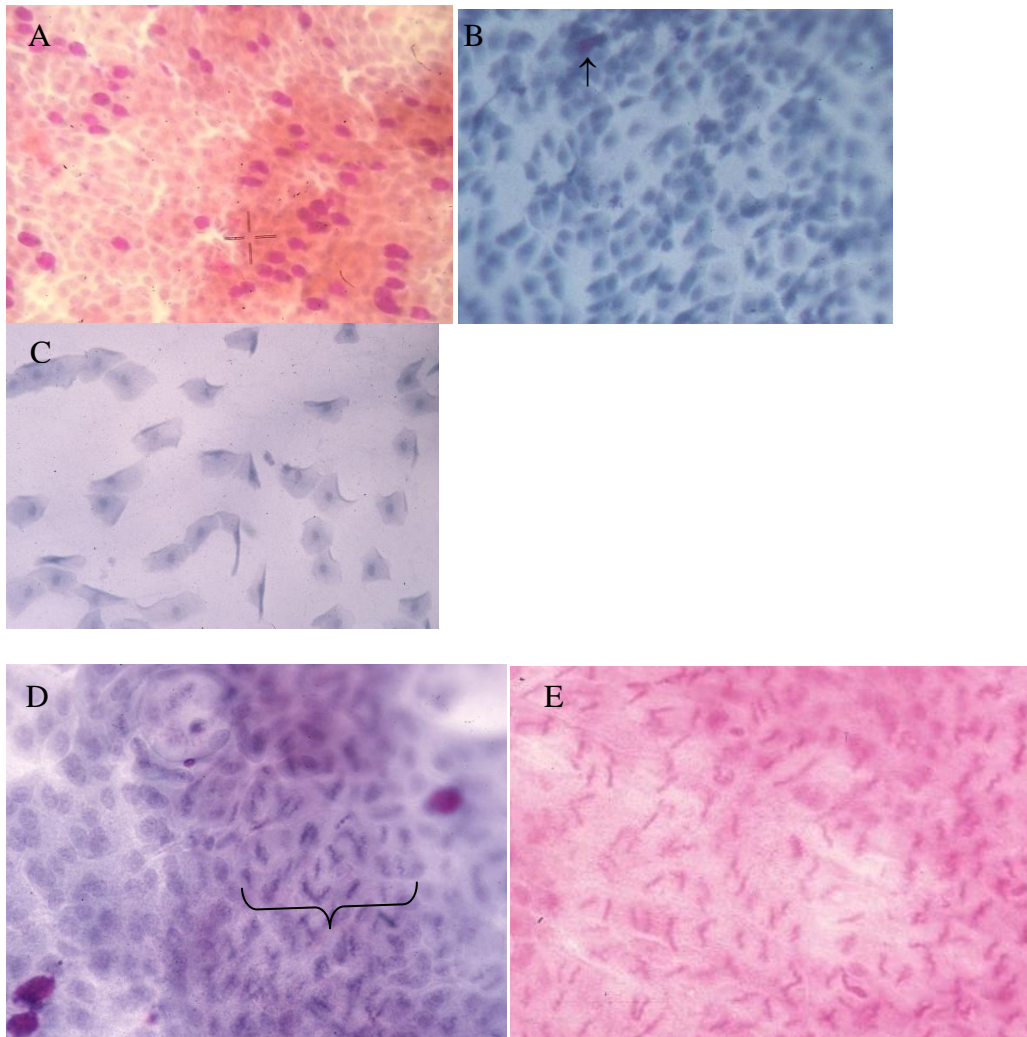
Associação com exames de superfície ocular

A avaliação citológica nasal associou-se com o teste de Schirmer, com o TRFL e com o tingimento por RB; enquanto a citologia temporal associou-se apenas com o teste de Schirmer. Veja a seguir.

O escore da CI no sítio nasal correlacionou-se com o teste de Schirmer (ρ -0,41, $P = 0,001$). A concordância entre os testes foi fraca mas significativa (k 0,41, $P = 0,001$). A

mediana do Schirmer foi 27 mm nos olhos com citologia normal *versus* 9 mm nos olhos com citologia limítrofe ou anormal ($P < 0,001$).

Figura 3: Amostras de citologia



A. Citologia normal, B. Citologia limítrofe, seta em célula caliciforme, C. Citologia anormal (amostras sítio superior, PAS/HE/Papanicolaou MO 200x), D. Amostra com cromatina *snake-like* entre 1-10%, chave indicando a faixa de células acometidas e E. Amostra com cromatina *snake-like* > 10% (amostras sítio superior, PAS/HE/Papanicolaou MO 400x).

O escore de CI no sítio nasal associou-se com o teste de tingimento com rosa bengala, sendo que o escore mediano da CI no sítio nasal foi 2 para os olhos com RB normal contra escore 5 nos olhos com $RB \geq 4$ mm ($P = 0,007$). A concordância entre os testes foi fraca mas significativa ($k = 0,26$, $P = 0,045$).

Considerando-se a classe citológica de metaplasia escamosa das amostras, a CI nos sítios nasal e temporal associaram-se com os escores do teste de TRFL e de Schirmer, respectivamente. O TRFL médio nos olhos com CI nasal normal foi 14,5 segundos *versus* 11,8 segundos nos com CI nasal limítrofe e anormal ($P = 0,032$). A mediana do Schirmer nos olhos com CI temporal normal foi 24 mm *versus* 6,5 mm nos olhos com CI temporal limítrofe e anormal ($P = 0,019$). Não houve concordância entre os testes.

O escore da citologia nos sítios nasal e temporal se associou com a presença de sintomas (tabela 5).

Tabela 5: Escores da Citologia de Impressão em relação à presença de sintomatologia

	Assintomáticos n = 66	Sintomáticos n = 12	P
Escore Superior - mediana	1	2	0,12
Escore Nasal - mediana	2	4	0,04
Escore Inferior - mediana	1	1	0,7
Escore Temporal - mediana	2	3	0,05

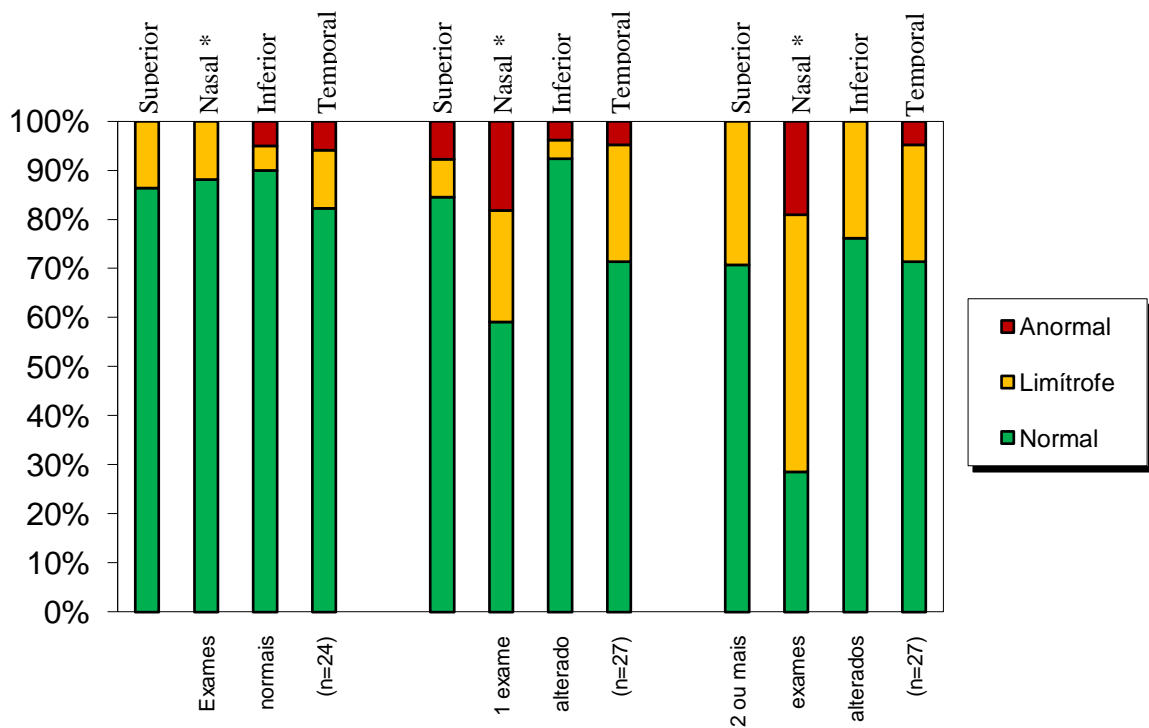
Considerando-se os 6 exames da avaliação clínica (exame biomicroscópico, questionário, TRFL, Teste de Schirmer, Tingimento com RB e Tingimento com Fluoresceína), dos 78 olhos da amostra, 24 olhos apresentaram todos os exames normais; 27 olhos um exame alterado; e 27 olhos dois ou mais exames alterados.

Houve correlação positiva entre o escore da citologia do sítio nasal e o número de exames alterados, ou seja, quanto maior o número de exames alterados, maior a pontuação no escore

da citologia neste sítio (ρ 0,46, $P < 0,001$). A mediana do escore da citologia para o sítio nasal foi de 2 em olhos com até 1 exame alterado *versus* 4 nos olhos com 2 ou mais exames alterados ($P = 0,009$).

Nos outros sítios conjuntivais avaliados, não houve correlação entre o escore da citologia e o número de exames alterados.

Figura 4: Citologia de impressão (amostras válidas) nos diferentes sítios amostrais para os 6 exames clínicos combinados



* Linear-by-linear association 0,001

DISCUSSÃO

No processo de transformação do epitélio conjuntival normal em epitélio conjuntival queratinizado, ocorrem uma série de mudanças metaplásicas. A metaplasia escamosa conjuntival possui inúmeras classificações e interpretações³ e parece não haver um ponto de corte exato no espectro metaplásico que separe o normal do doente. O padrão citológico conjuntival “normal” por sua vez não é unânime, e existem poucos estudos de citologia de impressão em pacientes sem doenças da superfície ocular.³ Também as alterações de cromatina das células epiteliais conjuntivais permanecem pouco estudadas.

Descrevemos os achados citológicos encontrados em uma população saudável. A classificação de Aragona *et al*⁵ foi utilizada por avaliar todos os critérios propostos na literatura³ e fornecer tanto um escore quantitativo como categórico. Não existe uma transposição exata entre as classificações de Nelson² e Aragona⁵ mas, aparentemente, os graus 0 e 1 de Nelson seriam a classe A de Aragona, enquanto o grau 2 de Nelson seria a classe B de Aragona e o grau 3 de Nelson a classe C de Aragona.

Nosso estudo demonstrou um percentual relativamente alto de resultados alterados nos testes de avaliação da superfície ocular de pacientes saudáveis. Esse achado vale tanto para os testes clínicos e questionário (0-30%) como para a citologia de impressão (3-13%).

A citologia foi normal em 57% e 75% das amostras nasal e temporal, respectivamente, sendo uma taxa de normalidade maior encontrada nas conjuntivas superior (81%) e inferior (87%), áreas não expostas da conjuntiva. Diferenças no grau de metaplasia escamosa entre as regiões da conjuntiva bulbar já haviam sido descritas, sendo atribuídas à exposição na região da fenda palpebral²¹ e ao microtrauma gerado pelo piscar na conjuntiva superior.²² Arici *et al*²³ estudando 30 olhos de um grupo controle encontrou o grau zero de Nelson em 80% das amostras temporal e nasal inferior, sendo que os restantes apresentaram grau 1 de

metaplasia.²³ Já na conjuntiva tarsal superior de voluntários normais foi encontrado grau 0 de Nelson em 86,7%, sendo que o restante apresentava grau 1.²⁴ Neste estudo houve correlação do escore citológico com a idade dos pacientes,²⁴ associação não encontrada na nossa amostra.

Em um estudo de pacientes saudáveis, Paschides, Petroustos e Psilas²¹ encontraram na citologia conjuntival do sítio superior relações núcleo:citoplasma que variaram de 1:2 até 1:6 e densidades de células calciforme por mm² que oscilaram entre 0-3333, com média 510,7 e amplo desvio padrão, de 563,96 células/mm². Considerando-se a classificação de Nelson, certamente estas amostras seriam classificadas como graus 1, 2 ou 3. Em outro estudo, Rivas *et al*²⁵ encontrou relações núcleo:citoplasma entre 1:1 e 1:2 na maioria das amostras bulbares e palpebrais, equivalendo aos graus 0 e 1 da classificação de Nelson; mas a relação núcleo:citoplasma foi maior que 1:3 em todas as amostras das regiões perilimbares nasal e temporal, o que equivaleria aos graus 2 e 3 de Nelson. Assim, acreditamos que um achado importante do nosso estudo de prevalência, e que corrobora estas descrições mais detalhadas da literatura, é a variabilidade do padrão citológico do epitélio conjuntival normal.

Encontramos a alteração de cromatina nuclear conhecida como *snake-like* em 15% das amostras citológicas do sítio superior. Esse tipo de alteração, descrito inicialmente em pacientes com ceratoconjuntivite sicca²⁶ e associado posteriormente à Síndrome de Sjögren primário,²⁷ olho seco severo,²⁷ uso de lentes de contato²⁸ e após cirurgia de catarata,²⁹ teve sua prevalência estimada em 47% dos moradores de Copenhague entre 30-60 anos.²⁷ Observem que encontramos associação da anomalia com a idade dos pacientes, sendo a idade média dos pacientes com cromatina *snake-like* de 41,5 anos. O fato de nossa amostra ser composta por pacientes mais jovens que a do estudo em Copenhague pode explicar a menor prevalência da alteração. Os mecanismos patogênicos desta anomalia da cromatina permanecem obscuros, mas o trauma palpebral direto é um dos mais fortes candidatos,^{27, 30} e justificaria a presença da

alteração quase que exclusivamente na conjuntiva bulbar superior e aumentando com a idade, fatos corroborados em nosso estudo.

O padrão de distribuição da aberração da cromatina encontrado em nosso estudo, em ilhas circundadas por células normais, confere com a literatura.^{26, 27} A associação que encontramos entre a presença de cromatina *snake-like* e o escore da citologia é relatada na literatura em casos isolados.³¹ Entretanto, esta relação está sujeita a um viés, já que a presença da aberração da cromatina faz parte dos parâmetros de avaliação da metaplasia escamosa pela classificação de Aragona.

Uma das maiores expectativas em relação à citologia de impressão sempre foi a de que ela seria capaz de identificar o dano estrutural/citológico secundário a disfunções da superfície ocular e causador da sintomatologia. Assim, mesmo em se tratando de uma população saudável, esperávamos que houvesse concordância do padrão citológico com o resultado dos testes clínicos da superfície ocular e com o questionário.

A associação que encontramos dos escores de metaplasia nasal e temporal com a presença de sintomatologia parece bastante lógica, já que clinicamente, alterações na área de fenda costumam apresentar mais sintomas que quando nas áreas cobertas da conjuntiva. Lemp,³² contudo, não encontrou esta associação.

Contrariando as expectativas, o padrão citológico dos olhos com exames clínicos normais não foi estatisticamente diferente daqueles com os exames alterados, a não ser por uma associação fraca entre a presença de metaplasia escamosa no sítio nasal com os testes TRFL, teste de Schirmer e tingimento com RB. No sítio temporal também houve tênue associação com o teste de Schirmer. Entretanto, o tamanho limitado, a baixa prevalência de sintomas e o fato de se tratar de uma amostra saudável podem obscurecer associações mais fortes.

Alguns estudos não demonstraram associação do grau de metaplasia escamosa com os testes de Schirmer,³² tingimento com fluoresceína³² ou tingimento com rosa bengala.^{2, 32, 33} Entretanto Paschides, Petroustos e Psilas²¹ encontraram associação entre elementos específicos da análise citológica epitelial de células caliciformes do sítio superior com exames de superfície ocular, a saber: relação núcleo:citoplasma variando conforme o teste de Schirmer e o TRFL e a densidade de células caliciformes conforme o tingimento com rosa bengala. Embora estes achados não sejam unânimes,³⁴ esta última associação corrobora a interpretação atual de que o corante rosa Bengala é um indicador de falta de cobertura da superfície ocular por mucina.³⁵

Em relação à associação que descrevemos em nosso estudo, da cromatina *snake-like* com o teste de Schirmer, a literatura não refere associação direta, entretanto, em pacientes com síndrome de Sjögren primário, doença caracterizada por alteração no teste de Schirmer, a cromatina *snake-like* é um achado muito freqüente,⁷ chegando a envolver praticamente todas as células epiteliais conjuntivais nos casos mais graves. Não foi encontrada em nossa população ou por outros autores²⁷ associação da cromatina *snake-like* com os demais testes clínicos da superfície ocular ou com sintomas.

Uma grande limitação do recrutamento amostral por voluntariado é a possibilidade de não se obter representatividade de uma população real de pessoas saudáveis. Além disso, em nosso estudo houve desproporção entre homens e mulheres. Entretanto, os nossos resultados para todos os testes clínicos da superfície ocular coincidem com os descritos na literatura.

A avaliação das bordas palpebrais foi normal em 65,4% da amostra, estando compatível com controles de estudos de olho seco.³⁶

O TRFL médio da nossa amostra foi $13,6 \pm 6,3$ segundos (3-32 segundos). Em estudo de pacientes normais foram encontradas médias entre 10-44 segundos¹¹ e, mais recentemente, em

controles normais, médias de 12,5 a 14,7 (3-30 segundos).^{12, 37} Setenta por cento dos olhos avaliados apresentaram TRFL normal, taxa equivalente a apresentada na literatura.^{1, 38}

O teste de Schirmer I médio no nosso estudo foi de $19,2 \pm 12,9$ mm (0 a > 35 mm), onde 76% dos olhos foram > 5 mm. A média encontrada em controles normais na literatura varia de 11,9 a 16,6 mm;^{12, 37} sendo a prevalência do exame normal de 67% em controles normais¹ e 54% em estudo populacional em idosos.⁸

Os exames de tingimento também se comportaram conforme o esperado. A coloração com fluoresceína demonstrou apenas olhos com escores grau zero e 1, sendo que 75% apresentaram escore zero. Em relação à coloração com rosa bengala, 87% dos olhos apresentaram tingimento normal, enquanto 48,1% dos olhos apresentaram escore zero, estando de acordo com estudos epidemiológicos.^{8, 37, 38}

Estes achados corroboram a tese de que a sensibilidade e a especificidade dos testes clínicos de avaliação da superfície ocular são variáveis e, via de regra, baixas.^{8, 18, 39} Consequentemente, o uso destes testes individualmente parece inadequado para o diagnóstico de certeza de doenças da superfície ocular^{32, 40} e da mesma forma, a caracterização como “normal” se faz difícil. Neste contexto, a combinação dois ou mais testes tem sido sugeridos como recurso diagnóstico.

Surpreendentemente, em nosso estudo de voluntários saudáveis, apenas 24 olhos (31%) apresentaram todos os 4 exames clínicos, biomicroscopia e questionário “normais”. Além disso, houve correlação apenas entre alguns testes. Houve associação entre os testes de Schirmer e TRFL, testes que avaliam a camada aquosa do filme lacrimal;¹¹ o TRFL e escore de fluoresceína também correlacionaram-se, o que pode ser explicado, pois a quebra na adesão intercelular corada pela fluoresceína⁴¹ pode ter ocorrido com a exposição da camada epitelial pela evaporação da camada aquosa; finalmente, o teste de Schirmer e o tingimento

por rosa bengala também mostraram associação. Contudo, é bem relatada a falta de concordância entre os diversos exames de superfície ocular.^{8, 33, 37}

A presença de sintomatologia é considerada um dos alicerces no diagnóstico de diversas doenças da superfície ocular,^{32, 36, 37, 40} além de ter grande impacto na qualidade de vida.⁴² Em nossa amostra de voluntários saudáveis, o questionário foi normal em 85% dos pacientes, semelhante à população americana,⁴³ e sem associação com nenhum dos exames de superfície ocular tradicionais. Essa dissociação sinais-sintomas também é bem documentada na literatura.^{8, 17, 37, 40}

Finalmente, concluímos que apesar das limitações amostrais de nosso estudo, a semelhança do perfil dos exames de superfície ocular destes olhos com os olhos descritos como normais na literatura nos leva a crer que de fato seja uma amostra representativa do normal; que o padrão citológico de olhos saudáveis, quanto à metaplasia escamosa conjuntival, é na sua maioria considerado “normal” pelas classificações de Nelson² e Aragona,⁵ mas que sua variabilidade parece ser tão ampla quanto à dos próprios exames de superfície ocular tradicionais; e que achados como a presença de cromatina *snake-like* ainda precisam ser melhor estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dogru M, Katakami C, Nakagawa N, Tetsumoto K, Yamamoto M. Impression cytology in atopic dermatitis. *Ophthalmology* 1998;105:1478-84.
2. Nelson JD. Impression cytology. *Cornea* 1988;7:71-81.
3. Calonge M, Diebold Y, Saez V, et al. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp Eye Res* 2004;78:457-72.
4. Barros J, Mascaro V, Gomes J, Freitas D, Lima A. Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e de coloração. *Arq Bras Oftalmol* 2001;64:127-31.
5. Aragona P, Romeo GF, Puzzolo D, Micali A, Ferreri G. Impression cytology of the conjunctival epithelium in patients with vernal conjunctivitis. *Eye* 1996;10 (Pt 1):82-5.
6. Fenga C, Aragona P, Cacciola A, et al. Ocular discomfort and conjunctival alterations in operating room workers. A single-institution pilot study. *Int Arch Occup Environ Health* 2001;74:123-8.
7. Bjerrum KB. Test and symptoms in keratoconjunctivitis sicca and their correlation. *Acta Ophthalmol Scand* 1996;74:436-41.
8. Schein OD, Tielsch JM, Munoz B, Bandeen-Roche K, West S. Relation between signs and symptoms of dry eye in the elderly. A population-based perspective. *Ophthalmology* 1997;104:1395-401.
9. Bandeen-Roche K, Munoz B, Tielsch JM, West SK, Schein OD. Self-reported assessment of dry eye in a population-based setting. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2469-75.
10. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea* 2003;22:640-50.
11. Lemp MA. Breakup of the tear film. *Int Ophthalmol Clin* 1973;13:97-102.
12. Dogru M, Karakaya H, Ozcetin H, et al. Tear function and ocular surface changes in keratoconus. *Ophthalmology* 2003;110:1110-8.
13. Horwath-Winter J, Berghold A, Schmut O, et al. Evaluation of the clinical course of dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1364-8.
14. Korb DR, Greiner JV, Herman J. Comparison of fluorescein break-up time measurement reproducibility using standard fluorescein strips versus the Dry Eye Test (DET) method. *Cornea* 2001;20:811-5.
15. Dogru M, Okada N, Asano-Kato N, et al. Alterations of the ocular surface epithelial mucins 1, 2, 4 and the tear functions in patients with atopic keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1556-65.
16. Design and conduct of clinical trials: report of the Clinical Trials Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:153-62.
17. Wright JC, Meger GE. A review of the Schirmer test for tear production. *Arch Ophthalmol* 1962;67:564-5.
18. Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:108-52.
19. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 1969;82:10-4.
20. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554-8.

21. Paschides CA, Petroustos G, Psilas K. Correlation of conjunctival impression cytology results with lacrimal function and age. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1991;69:422-5.
22. Murube J, Rivas L. Impression cytology on conjunctiva and cornea in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *Eur J Ophthalmol* 2003;13:115-27.
23. Arici MK, Arici DS, Topalkara A, Guler C. Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. *Clin Experiment Ophthalmol* 2000;28:113-7.
24. Gadkari SS, Adrianwala SD, Prayag AS, Khilnani P, Mehta NJ, Shaha NA. Conjunctival impression cytology--a study of normal conjunctiva. *J Postgrad Med* 1992;38:21-3, 22A-22B.
25. Rivas L, Oroza MA, Perez-Esteban A, Murube-del-Castillo J. Topographical distribution of ocular surface cells by the use of impression cytology. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1991;69:371-6.
26. Marner K. 'Snake-like' appearance of nuclear chromatin in conjunctival epithelial cells from patients with keratoconjunctivitis sicca. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1980;58:849-53.
27. Bjerrum KB. Snake-like chromatin in conjunctival cells of a population aged 30-60 years from Copenhagen City. *Acta Ophthalmol Scand* 1998;76:294-8.
28. Adar S, Kanpolat A, Surucu S, Ucakhan OO. Conjunctival impression cytology in patients wearing contact lenses. *Cornea* 1997;16:289-94.
29. Tsubota K, Yamada M, Kajiwara K, Ugajin S, Hasegawa T, Kobayashi TK. Cytologic evaluation of conjunctival epithelium after cataract surgery. *Cornea* 1992;11:418-26.
30. Cher I. Blink-related microtrauma: when the ocular surface harms itself. *Clin Experiment Ophthalmol* 2003;31:183-90.
31. Sengor T, Gurdal C, Kirimlioglu H, Irkec M, Aydin S. Colour-coded mapping technique in impression cytology - findings in soft contact lens wearers and patients with other external eye diseases. *Ophthalmologica* 2002;216:155-8.
32. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *Clao J* 1995;21:221-32.
33. Yaylali V, Ozyurt C. Comparison of tear function tests and impression cytology with the ocular findings in acne rosacea. *Eur J Ophthalmol* 2002;12:11-7.
34. Yeo AC, Carkeet A, Carney LG, Yap MK. Relationship between goblet cell density and tear function tests. *Ophthalmic Physiol Opt* 2003;23:87-94.
35. Feenstra RP, Tseng SC. What is actually stained by rose bengal? *Arch Ophthalmol* 1992;110:984-93.
36. Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea* 1998;17:38-56.
37. McCarty CA, Bansal AK, Livingston PM, Stanislavsky YL, Taylor HR. The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia. *Ophthalmology* 1998;105:1114-9.
38. Paschides CA, Kitsios G, Karakostas KX, Psillas C, Moutsopoulos HM. Evaluation of tear break-up time, Schirmer's-I test and rose bengal staining as confirmatory tests for keratoconjunctivitis sicca. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:155-7.
39. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:75-92.
40. Begley CG, Chalmers RL, Abetz L, et al. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4753-61.
41. Feenstra RP, Tseng SC. Comparison of fluorescein and rose bengal staining. *Ophthalmology* 1992;99:605-17.

42. Schiffman RM, Walt JG, Jacobsen G, Doyle JJ, Lebovics G, Sumner W. Utility assessment among patients with dry eye disease. *Ophthalmology* 2003;110:1412-9.
43. Begley CG, Chalmers RL, Mitchell GL, et al. Characterization of ocular surface symptoms from optometric practices in North America. *Cornea* 2001;20:610-8.

Conjunctival Impression Cytology in healthy volunteers

ABSTRACT

Purpose: To describe conjunctival findings of impression cytology in healthy volunteers and to correlate to dry eye tests and symptoms. **Methods:** superior, inferior, nasal and temporal bulbar conjunctivae impression cytology, symptoms questionnaire, slit lamp examination, Schirmer test (ST), tear film break-up time (TFBUT), fluorescein staining (FS) and rose Bengal staining (RBS) were evaluated. **Results:** 78 eyes of 39 patients (30 female, 85% white) were examined. Mean age was 36 years (16-71 years). Eighty-five percent of patients were asymptomatic in questionnaire. Mean TFBUT was 13.6 seconds (70% \geq 10 sec), ST median was 19.2 mm (76% \geq 6 mm), RBS grade was 0-3 in 87%, FS was 0 in 75%. Slit lamp examination did not reveal any alteration in 65% of the eyes. Impression cytology showed normal aspect in: 81% superior, 57% nasal, 87% inferior, and 75% temporal. Snake-like chromatin pattern was present in 15% of superior samples. There were few correlations among clinical tests, questionnaire result and cytological findings. Nasal impression cytology results and snake-like chromatin were associated with some ocular surface exams, symptoms and age of patients. **Conclusion:** Our study identified prevalence of 30% of abnormal clinical tests, symptoms, and altered cytological findings (abnormal and borderline) in this group of normal subjects. Impression cytology findings of exposed bulbar conjunctiva and superior conjunctiva are more often altered. Despite a few associations among tests, there was no conclusive correlation among these tests, symptoms and impression cytology results.

Keywords: impression cytology, dry eye, squamous metaplasia, ocular surface, questionnaire, symptoms, snake-like chromatin.

INTRODUCTION

Ocular surface study and knowledge of the characteristics of normal corneal and conjunctival epithelium are important in diagnoses and visual rehabilitation of patients with ocular surface diseases.¹

The ocular surface can be evaluated by staining tests with specific dyes, tear function tests and direct assessment of conjunctival and corneal cells. Histological analysis through biopsy is a very invasive and clinically inapplicable technique. On the other hand, cytological analysis through impression cytology, is a simple and noninvasive method² that complements the clinical assessment made by slit lamp tests and symptoms questionnaire.^{1,3}

The aim of this study was to describe the conjunctival epithelial cytological pattern of healthy volunteers using impression cytology. Symptoms and ocular surface characteristics were also assessed by performing a set of clinical tests (tear function and staining tests) and dry eye questionnaire.

MATERIAL AND METHODS

This prevalence clinical study included healthy volunteers (by self report) aged 16 to 75 years old, recruited from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The group consisted of patient's contactants, medical students and staff members of the Ophthalmology Department. Subjects were excluded if they had a history of ocular surface disorder or any systemic disease affecting the ocular tissues, if they wore contact lenses or if they were on topical eye medications. The study was approved by the institutional ethics committee and an informed consent was obtained from each patient (find enclosed – I).

Five minutes after the other ocular surface examinations were done (described later), impression cytology specimens were obtained from the superior, inferior, nasal and temporal bulbar conjunctiva, under topical anaesthesia with 2 drops of 0.5% proximetacaine (0.5% Anestalcon®, Alcon, São Paulo, Brazil) applied to the lower conjunctival sac, according to the method described by Barros *et al.*⁴ We used Millipore filters with pore size of 0.45 µm (Millipore HAWP304, Millipore Corporation, Bedford, EUA).

Impression cytology specimens were evaluated and graded under a light microscope by an investigator blinded to clinical examination results. Only specimens showing more than 70% of the area covered by cells were graded. The method described by Aragona *et al.*^{5,6} was used to assign each specimen one of 3 grades for conjunctival epithelial squamous metaplasia: “A” normal; “B” borderline; and “C” abnormal. This categorization in classes is made on the basis of a total score, result of a quantitative scoring system which considers 7 parameters, as seen in table 1 (find enclosed – II). The presence of cells with nuclear chromatin condensation, typical snake-like shape, was described and the area constituted by cells with snake-like chromatin (SLC) was estimated as a percentage of the total cell area: 0%, 0-1%, 1-10%, and > 10%⁷ and considered for metaplasia scoring (table 1).

Table 1. Scoring system for conjunctival impression cytology

Parameters	Normal	Borderline	Abnormal
Cellularity	0	1	2
Cell-to-cell contact	0	1	2
Nucleus/cytoplasm ratio	0 (1:2-3)	1 (1:4-5)	2 (1:≥ 6)
Nuclear chromatin	0	1 (≤ 1%)*	2 (> 1%)*
Goblet cell distribution	0	1	2
Keratinisation	0	1	2-3
Inflammatory cells	0	-	2-3
Total Score	0-3 (class A)	4-6 (class B)	> 6 (class C)

*if snake-like chromatin
Adapted from Aragona *et al*.^{5,6}

The protocol of procedures was started with history and ocular symptoms. The Salisbury Eye Evaluation Questionnaire^{8,9} consists of 6 questions, as follows: Do your eyes ever feel dry? Do you ever feel a gritty or sandy sensation in your eye? Do your eyes ever have a burning sensation? Are your eyes ever red? Do you notice much crusting on your lashes? Do your eyes ever get stuck shut in the morning? The severity of symptoms is graded as: never, rarely, sometimes, often, or all of the time. Patients with at least 1 symptom occurring at least often were considered symptomatic.

Next, clinical tests were performed by other investigator, from the least invasive to the most invasive (find enclosed – III).¹⁰

Slit lamp examination looking for ocular surface or eyelid abnormalities (meibomian gland disorder, blepharitis, conjunctivitis, pterygium, pinguecula, superior limbic keratoconjunctivitis, symblepharon, corneal neovascularization, etc). Fluorescein tear film break-up time (TFBUT) was done next, according to a previously described technique, using moistened fluorescein strips (Ophthalmos, São Paulo, Brazil).¹¹ The mean value of three measurements was recorded, and values equal or over 10 seconds were considered normal.¹²⁻
¹⁵ Corneal surface fluorescein staining (FS) was recorded according to the following scoring system: 0 – no staining; 1 – staining less than one third; 2 – staining less than two thirds; 3 – staining more than two thirds.¹³ Scores 0 and 1 were considered normal.¹⁶ Five minutes later,

after restoration of tear meniscus height,¹⁰ Schirmer I test (ST) without anesthesia was performed on closed eyes, to assess reflex and basal tear production.¹⁷ Readings were reported in millimeters of wetting of filter paper (Ophthalmos, São Paulo, Brazil) for 5 minutes,^{10, 13, 17} and measurements > 5 mm were regarded as normal.¹⁸ Rose Bengal ocular surface staining (RBS) was performed by adding 1 drop (about 20 µl) of 1% rose Bengal solution to the bulbar conjunctival after anesthesia with 1 drop of 0.5% proximetacaine (0.5% Anestalcon®, Alcon, São Paulo, Brazil).¹³ Staining scores ranged from 0 to 9 points, according to the Van Bijsterveld scoring system.¹⁹ In this system we consider staining of three ocular surface regions: nasal bulbar conjunctiva, cornea, and temporal bulbar conjunctiva; each region is given a score of 0 to 3: 0 for no staining, 1 for mild staining, 2 for moderate staining and 3 for marked staining; and the regional scores are summed to give the total score.¹⁹ A score ≤ 3 (0, 1, 2 e 3) was considered normal.^{18, 20}

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were performed with SPSS software version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Variables were analyzed quantitatively and qualitatively after classification.

Spearman's rho (ρ) non-parametric correlation coefficient was used for the evaluation of the relationship between cytological scores and tear function and staining tests scores. For qualitative statistical analysis the Chi-square test was applied and for agreement between tests, Kappa coefficient statistics (k) was used. Mann-Whitney non-parametric test was used for the evaluation of the relationship between quantitative and qualitative variables.

A value of $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Eighty eyes of 40 healthy volunteers were examined. One patient was excluded because of unilateral pterygium < 0.5 mm. The sample included 78 eyes of 39 patients (30 were female), mean age was 35.7 years (SD 14.6; 16 - 71 years). Thirty three (84.6%) patients were white, 5.1% black and 10.3 % mulatto.

History identified 6 (15.4%) patients with systemic arterial hypertension, and 5 patients (12.9%) had other diseases (depression, asthma), but none of them were taking any drug associated with ocular adverse effects. None of the patients had a history of cigarette smoking.

Slit lamp biomicroscopy of the conjunctiva was normal in all eyes included.

Slit lamp biomicroscopy of the eyelid margins was normal in 51 eyes (65.4%), 24 eyes revealed mild meibomian gland disorder, one eye mild blepharitis, and 2 eyes eyelid papilloma. There was no correlation among these eyelid abnormalities and cytological or clinical tests findings or with symptoms.

The questionnaire data showed that 84.6% of subjects did not report symptoms often or all of the time, while 5 subjects had one positive answer and one had 3 positive answers (table 2). There was no association between the questionnaire data and the mean values of TFBUT, ST, RBS and FS (table 3).

There was no association among the mean values of TFBUT, Schirmer test, RBS, FS and age (table 3).

TFBUT, ST and staining tests results are shown in figure 1.

Analyzing these 4 clinical ocular surface tests we could identify some statistical significant correlations and some agreement in between tests. However, as we will describe, although these relations are in general in the expected directions, they are weak.

Table 2: Symptoms prevalence (percentage) (n = 39 patients)

Symptom	Never	Rarely	Sometimes	Often	All of the time
Dry eye	79.5	5.1	15.4	0	0
Sandy sensation	61.5	25.6	7.7	2.6	2.6
Burning sensation	66.7	20.5	7.7	0	5.1
Red eye	41	30.8	23.1	5.1	0
Crusting on lashes	92.3	2.6	2.6	0	2.6
Stuck eyes	92.3	2.6	2.6	0	2.6

Table 3: Exams data by symptoms and age strata

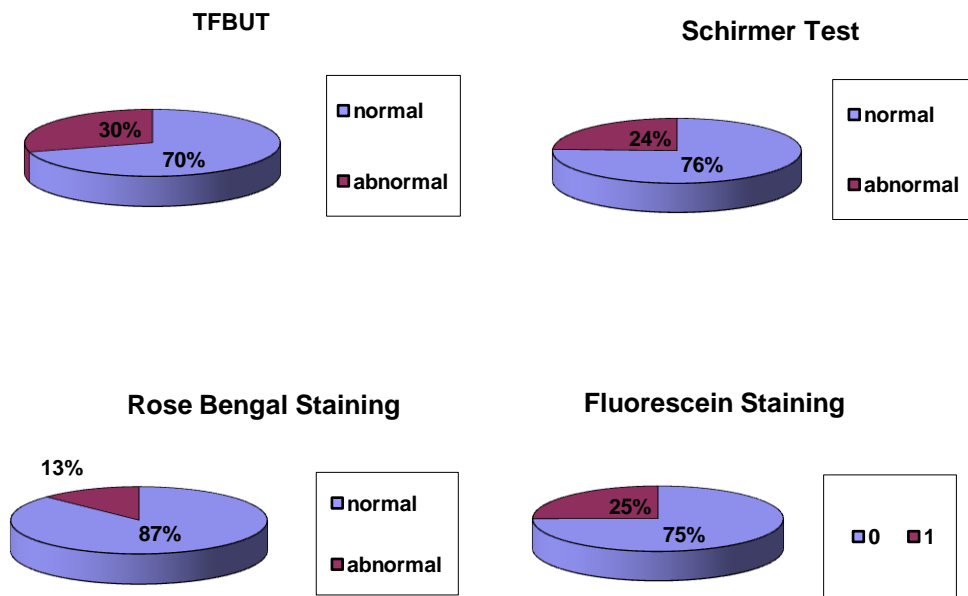
	Asymptomatic n = 66	Symptomatic n = 12	Total n = 78	> 40 years n = 26
Mean age (years)	35.8 ± 15	36.2 ± 12.5	35.7 ± 14.6	-
Mean TFBUT (seconds)	14.0 ± 6.7	11.1 ± 4.3	13.6 ± 6.5	13.6 ± 6.3
FS score (median)	0	0	0	0
RBS score (median)	0	0	1	2
Mean ST, (mm)	19.0 ± 13.5	20.3 ± 12.2	19.2 ± 12.9	16.8 ± 12.4

TFBUT, tear film break-up time; FS, fluorescein staining; RBS, rose Bengal staining; ST, Schirmer test.

There was a positive correlation between TFBUT and the ST (ρ 0.405, $P < 0.001$). The median ST value in eyes with normal TFBUT was 26 mm, against 6.5 mm in eyes with TFBUT < 10 seconds ($P < 0.001$). The agreement between these tests was weak but statistically significant (k 0.29, $P = 0.011$).

The TFBUT showed also a statistically significant negative correlation with the FS (ρ -0.35, $P = 0.002$), therefore, with lower staining scores we had higher TFBUT. The mean TFBUT value was 14.8 seconds in eyes with the FS score 0 compared with 9.9 seconds in eyes with the FS score 1 ($P = 0.003$). The agreement between these tests was significant (k 0.415, $P < 0.001$).

Figure 1: Tear film break-up time (TFBUT), Schirmer test and staining score results.



The ST, in addition to the relation with TFBUT, showed a statistically significant negative correlation with the RBS (ρ -0.34, $P = 0.002$). However, there was no significant agreement between these tests. The ST median was 23 mm in eyes with normal RBS and was 7.5 mm in eyes with $RBS \geq 4$ ($P = 0.066$).

Impression Cytology

Conjunctival imprints were appropriate for analysis 82.7% of specimens, 72 of superior conjunctiva, 60 of nasal, 67 inferior and 59 of temporal sampling. Considering these valid specimens, 80.6% of superior samples was classified as normal cytology, 56.7% of nasal, 86.6% of inferior and 74.6% of temporal samples; borderline cytological classification was shown by 16.7% of superior samples, 30% of nasal, 10.4% of inferior and 20.3% of temporal samples; and were regarded as abnormal 2.8% of superior samples, 13.3% of nasal, 3% of inferior and 5.1% of temporal (figure 2). IC scores are described in table 4.

Figure 2. Impression Cytology classification by topographical sampling

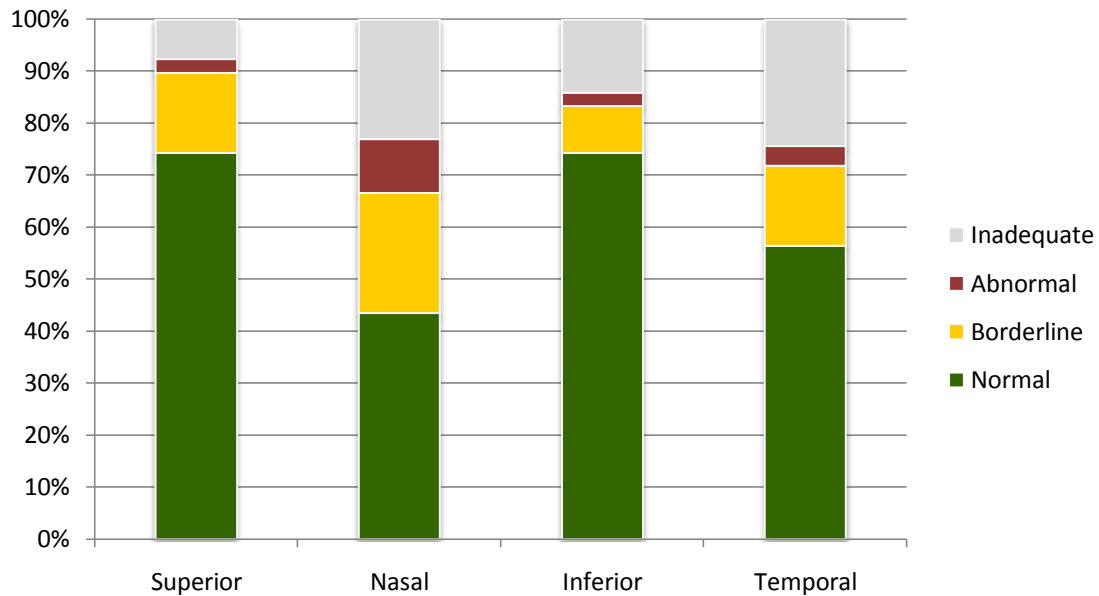


Table 4. Impression cytology scores

	Median	Minimum	Maximum	Scores 0 + 1 (% of total)
Superior	1	0	8	63.9%
Nasal	3	0	10	35%
Inferior	1	0	8	55.2%
Temporal	2	0	9	40.7%

Of the seven cytological parameters investigated, the most common alterations were demonstrated for goblet cell distribution and cell-to-cell connections in all topographies. The specimens obtained from nasal and temporal bulbar conjunctiva also shown cellularity and nucleus/cytoplasm ratio commonly affected. Figures 3B and 3C illustrate progressive loss of cell-to-cell connections, goblet cell reduction and alteration of nucleus/cytoplasm ratio. No specimen contained inflammatory cells.

The cytological results showed no correlation with age for all topographies.

Nasal impression cytology scores showed a statistically significant positive correlation with the other topographic cytology scores – superior (ρ 0.31; $P = 0.021$), inferior (ρ 0.48; $P < 0.001$) and temporal (ρ 0.49; $P < 0.001$).

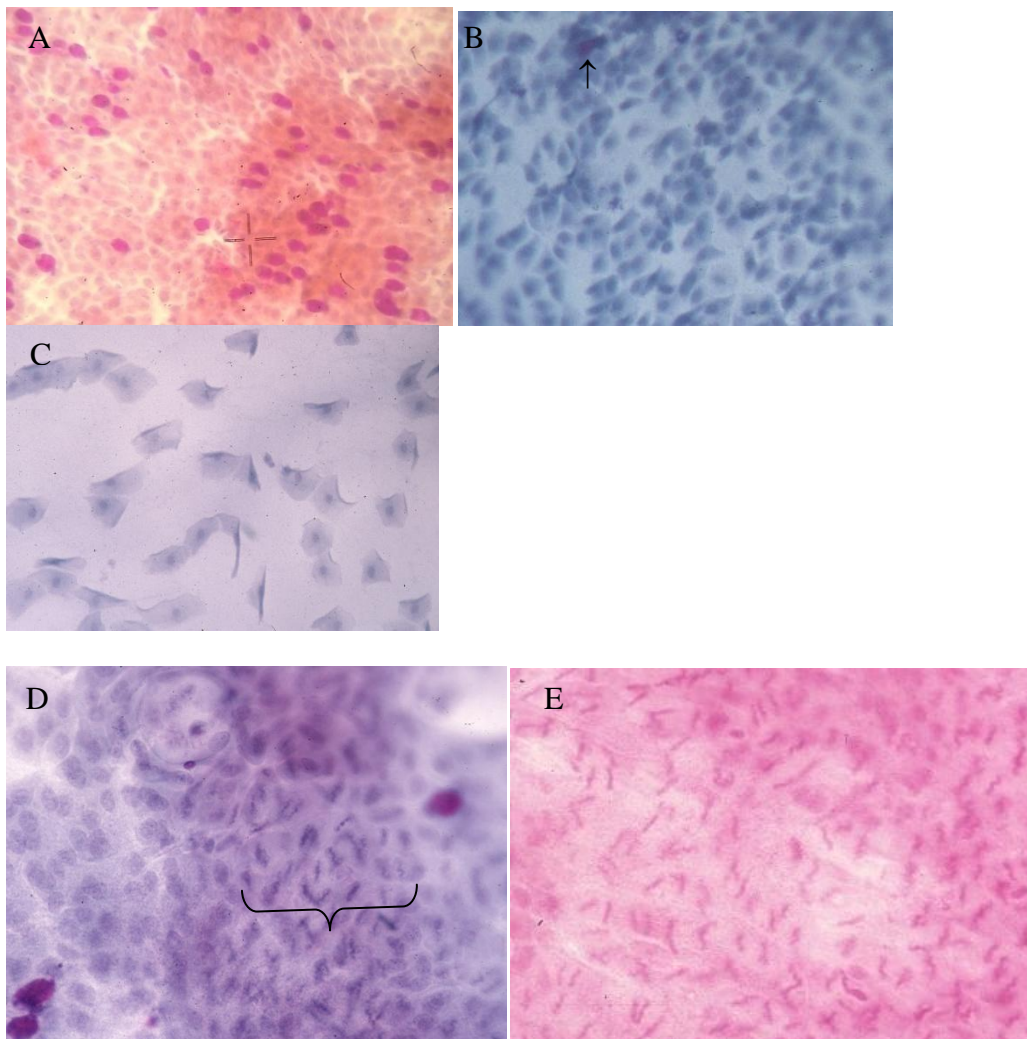
With regard to the presence of cells with snake-like chromatin condensations, the prevalence in our group was shown to be 11/72 (15.3%) of superior specimens. In 4 specimens the percentage of total cell area containing SLC was $< 1\%$; 2 specimens contained SLC in 1-10% of the cells; and in 5 specimens SLC was occupying more than 10% of total cell area (figures 3D and E). Only other 2 specimens of temporal conjunctiva showed this nuclear anomaly in a few cells ($> 1\%$). We noticed a specific distribution pattern of the cells containing SLC in tracks or “islands”, surrounded by normal epithelial cells (figure 3E). SLC density in superior conjunctiva showed a statistically significant positive correlation with the cytological squamous metaplastic score in this topography (ρ 0.42 $P < 0.001$) and in nasal conjunctiva (ρ 0.36 $P = 0.008$). The presence of SLC showed association with patients age, and the mean age of patients with the anomaly was 41.5 years compared with 33.6 years in eyes without ($P = 0.024$). There was a negative correlation between SLC presence and ST (ρ -0.3 $P = 0.01$), so that ST median was 25 mm for the eyes with no SLC against 9 mm for eyes with SLC ($P = 0.012$). However, for the tear film tests there was no statistical difference regarding the extension of the anomaly.

Association with ocular surface tests

A significant association was found between nasal cytology and ST, TFBUT and RBS; and temporal cytology was associated with ST.

The nasal impression cytology scores had a statistically significant negative correlation with the ST (ρ -0.41, $P = 0.001$). The agreement between these tests was weak but significant (k 0.41, $P = 0.001$). The median ST score was 27 mm in eyes with normal cytology compared with 9 mm in eyes with borderline or abnormal cytology ($P < 0.001$).

Figure 3: Illustrative impression cytology specimens



A. Normal Cytology, B. Borderline Cytology, arrow indicating goblet cell, C. Abnormal Cytology (superior conjunctiva, PAS/HE/Papanicolaou OM 200x), D. 1-10% Snake-like chromatin containing sample, sign indicating a track of anomalous nuclear cells and E. > 10% Snake-like chromatin containing sample (superior conjunctiva, PAS/HE/Papanicolaou OM 400x).

A significant association was found between the RBS test and nasal cytological scores, and the median nasal IC score was 2 in eyes with normal staining compared with 5 in eyes with $RBS \geq 4$ mm ($P = 0.007$). The agreement between these tests was weak but significant ($k = 0.26$, $P = 0.045$).

When the specimens were considered according to their cytological class, a significant association was found between nasal and temporal cytological classification and TFBUT and ST scores, respectively. Mean TFBUT score in eyes with normal nasal IC was 14.5 seconds compared with 11.8 seconds in eyes with borderline and abnormal nasal IC ($P = 0.032$). The median ST score in the eyes with normal temporal IC was 24 mm compared with 6.5 mm in the eyes with borderline and abnormal temporal IC ($P = 0.019$). There was no agreement between tests.

Nasal and temporal IC scores showed significant association with symptoms (table 5).

Table 5: Impression cytology scores by symptoms

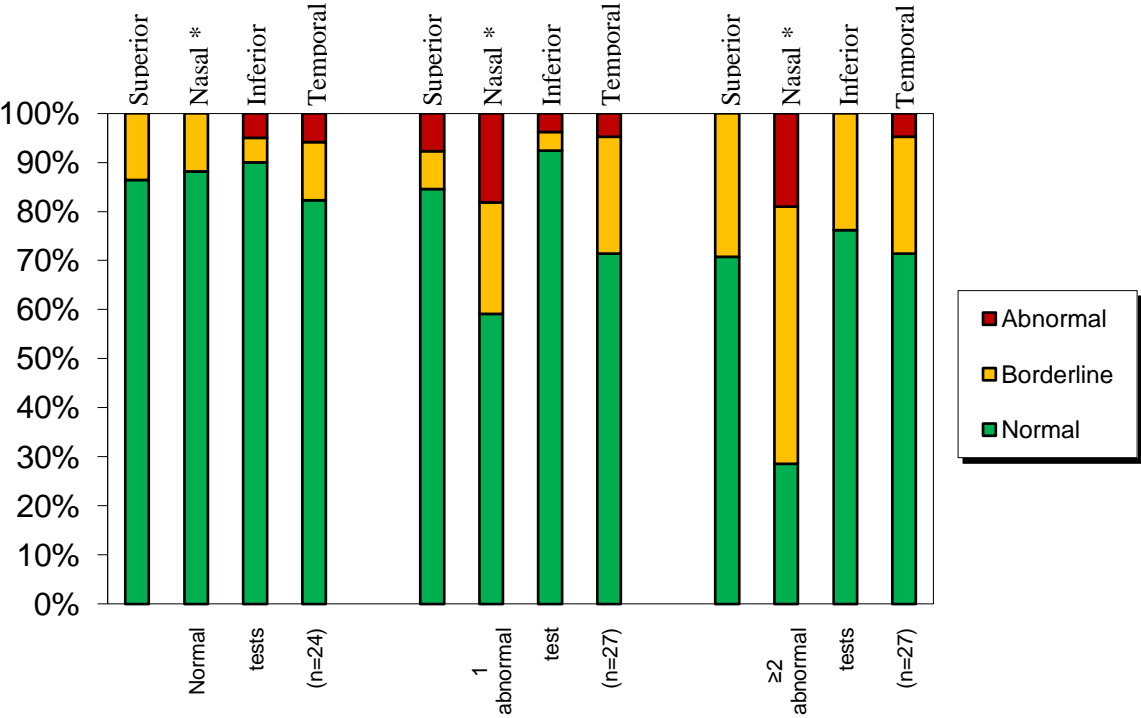
	Asymptomatic n = 66	Symptomatic n = 12	P
Superior score – media	1	2	0.12
Nasal score – median	2	4	0.04
Inferior score – median	1	1	0.7
Temporal score – median	2	3	0.05

When all 6 clinical tests (slit lamp biomicroscopy, questionnaire, TFBUT, ST, FS and RBS) were considered together, out of the 78 eyes studied, 24 showed only normal tests, 27 showed one abnormal test and 27 eyes showed at least two abnormal tests.

The nasal IC score showed a statistically significant positive correlation with the number of abnormal tests (out of 6), therefore, with higher number of abnormal test results, we had higher IC nasal scores ($\rho 0.46$, $P < 0.001$). The median nasal IC score in eyes with ≤ 1 abnormal test result was 2, against 4 in eyes with at least 2 abnormal test results ($P = 0.009$).

Superior, temporal and inferior IC scores showed no correlation with the number of abnormal test results.

Figure 4: Impression cytology data (valid specimens) for 6 combined clinical tests



* Linear-by-linear association 0.001

DISCUSSION

In the process of normal conjunctival epithelium transformation into keratinized epithelium several metaplastic changes take place. Many classifications have been developed for staging squamous metaplasia³ and there is no well defined cut-off point to discriminate between healthy and overt disease. There are no absolute standards for “normal” cytological conjunctival epithelial pattern, and there are only a few studies of impression cytology in normal ocular surface conditions.³ Also, snake-like condensations of nuclear chromatin of conjunctival epithelial cells remain poorly understood.

We describe cytological findings of a healthy population. The cytology was graded according to the scheme suggested by Aragona *et al.*⁵ This classification was chosen because it evaluates all features universally described in literature³ besides offering both quantitative and qualitative scores. There is no exact transposition between Nelson's² and Aragona's⁵ grading systems, but Nelson's grades 0 and 1 would be Aragona's class A, Nelson's grade 2 would be Aragona's class B and Nelson's grade 3 would be Aragona's class C.

Our data indicate that a high percentage of healthy subjects present abnormal ocular surface test results in our population. This was true for both clinical tests and questionnaire (0-30%) and also for impression cytology findings (3-13%).

Impression cytology was considered normal in 57% and 75% of nasal and temporal specimens, respectively, in contrast to higher normality rates found in superior (81%) and inferior (87%) conjunctiva, areas protected by the lids. Variations in squamous metaplasia grades according to conjunctival location were demonstrated and attributed to exposure in interpalpebral region²¹ and to the blink-related micro trauma on the superior bulbar conjunctiva.²² Arici *et al.*²³ found Nelson's grade 0 in 80% of temporal and nasal cytological specimens of a 30 eyes control group, the others showed grade 1 squamous metaplasia.²³ A

study of superior tarsal conjunctival specimens of healthy volunteers found Nelson's grade 0 in 86.7% and grade 1 in the remaining specimens.²⁴ This study showed a relationship between impression cytology grading and patients age,²⁴ association not demonstrated by our results.

In a study of normal superior bulbar conjunctiva of healthy volunteers, Paschides, Petroustos and Psilas²¹ described nucleus:cytoplasmic ratios varying from 1:2 to 1:6 and a goblet cell density range 0-3333 cells/mm², with an average of 510,7 and a wide standard deviation of 563,96 cells/mm². Using Nelson's classification, this samples would probably be shown to be grades 1, 2 and 3. In a study of healthy controls, Rivas *et al*²⁵ demonstrated nucleus:cytoplasmic ratios varying from 1:1 to 1:2 in most bulbar and tarsal conjunctival samples, shown to be Nelson's classification grades 0 and 1; interestingly, an increase in nucleus:cytoplasmic ratios, greater than 1:3, was described for nasal and temporal limbal specimens, which would represents Nelson's grades 2 and 3. Therefore, we believe that a major finding of our prevalence study, which agrees with more detailed descriptions in literature, is the variability of normal conjunctival epithelium pattern on cytology.

Regarding snake-like chromatin, we found it in 15% of our superior samples. This chromatin condensation was first described in subjects with keratoconjunctivitis sicca²⁶ and than demonstrated in primary Sjögren's syndrome,²⁷ dry eye,²⁷ contact lens wear²⁸ and after cataract surgery.²⁹ The frequency of SLC was estimated to 47% in normal persons 30–60 years living in Copenhagen.²⁷ Our results showed that SLC, in normal subjects, was associated with age of the volunteers, and the average age of patients with SLC was 41.5 years. The younger age of our sample could explain the lower frequency of this chromatin condensation compared to the Copenhagen study. The pathogenesis of SLC is still obscure, but mechanical friction between the ocular surface and the eyelid has been strongly advocated,^{27, 30} and this might explain the occurrence of this finding almost exclusively in

superior bulbar conjunctiva and it also explains the association with age (cumulative exposure), findings that were demonstrated by our study.

The SLC distribution pattern found in our cytological specimens, often grouped in “islands” surrounded by normal epithelial cells, agrees with literature descriptions.^{26, 27} Association between SLC and cytological scores, shown in our study, has already been demonstrated.³¹ However, this relation is susceptible to bias, as SLC occurrence was part of the criteria defining squamous metaplasia by our Aragona’s modified classification.

The main expectation with impression cytology was that it would be able to identify the structural/cellular damage, secondary to ocular surface dysfunction, and that contributes to symptoms. Thus, even studying a healthy population we were looking forward to find associations among cytological pattern, ocular surface tests results and questionnaire.

We demonstrated an interesting finding that impression cytology nasal and temporal scores were higher in patients reporting frequent symptoms. This observation seems logical, once in clinical practice bulbar conjunctival lesions on exposed area tend to be more bothersome than that under the eyelids. However, Lemp³² could not find this association.³²

Against expectations, impression cytology pattern showed no significant statistical difference according to ocular surface clinical tests results, although there was a weak association among squamous metaplasia of nasal specimens and TFBUT, ST and RBS and between squamous metaplasia of temporal specimens and ST. Nonetheless, the lack of significance may have been caused by small number, relatively low prevalence of symptoms and abnormalities of tests, as this was a healthy population.

Other studies have documented the lack of association among squamous metaplasia and ST,³² FS³² or RBS.^{2, 32, 33} On the other hand, Paschides, Petroustos and Psilas²¹ showed significant correlations among some cytological features of epithelial and goblet cells from superior bulbar conjunctiva and ocular surface test results: nucleus:cytoplasmic ratio varied

according to ST and TFBUT and density of goblet cells according to RBS. Although there are conflicting data,³⁴ this last association favors the current concept of rose Bengal being a sensitive indicator of deficient mucous protection of ocular surface.³⁵

Regarding SLC association to ST abnormal results that we have found, it has not been reported by other investigators, but in patients with primary Sjögren's Syndrome ST abnormality is a characteristic finding and SLC cells are highly frequent,⁷ which may in severe cases involve almost all conjunctival epithelial cells. In our population, no association was found among SLC and the other clinical tests or symptoms, as shown by Bjerrum.²⁷ Since all test-persons were volunteers we could have selected a sample unrepresentative of normal population. It also explains why there was a gender disparity. Nonetheless, all of the traditional clinical ocular tests results agree with literature data.

Prevalence of unremarkable eyelid findings on slit lamp biomicroscopy was 65.4%, in accordance with normal controls.³⁶

The mean TFBUT in our study was 13.6 ± 6.3 seconds (3-32 s), in agreement with other studies which showed values ranging from 10-44 seconds in normals,¹¹ and more recently, TFBUT means 12.5 and 14.7 (3-30 s) in healthy controls.^{12, 37} Prevalence of 75% of normal TFBUT are quite similar to literature.^{1, 38}

We found mean ST of 19.2 ± 12.9 mm (0 to > 35 mm), and 76% of eyes > 5 mm. Normal controls eyes show values ranging 11.9 to 16.6 mm^{12, 37} and previous authors have shown prevalence of 67% of normal ST in control eyes¹ and of 54% in a population-based study.⁸

Staining tests also behaved as expected. All eyes scored zero or 1 with fluorescein and 75% scored zero. Regarding to RBS, 87% of eyes were considered normal and 48.1% showed 0 score, in agreement with epidemiological studies.^{8, 37, 38}

These data are in accordance to previous reports that point to variable and poor levels of tests sensitivity and specificity.^{8, 18, 39} Consequently, none of the tests individually is adequate in diagnosing ocular surface disease^{32, 40} and “normal” definition is difficult. In this context, diagnostic tools combining two or more tests have been suggested.

Surprisingly, this healthy volunteers study identified only 24 eyes (31%) with normal results for all the 4 clinical tests, biomicroscopy and questionnaire. Moreover, only a few tests showed significant (but weak) association. That was the case of ST and TFBUT, both analyze the aqueous layer of tear film;¹¹ TFBUT and FS were also correlated, what could be explained by fluorescein staining of cell-to-cell loss of contact⁴¹ due to epithelial cell exposure secondary to aqueous evaporation; finally, ST and RBS showed association. Nonetheless it has been generally held that ocular surface signs and symptoms commonly do not agree.^{8, 33, 37} Patients subjective complaints are a very important tool in diagnosing ocular surface diseases,^{32, 36, 37, 40} and can severely reduce the patient’s quality of life.⁴² In our healthy subjects, questionnaire was considered negative in 85% of patients, quite similar to the American population,⁴³ and in agreement with literature, no significant association was found to the clinical tests performed.^{8, 17, 37, 40}

Finally, despite restrictions related to sample, coincidence of ocular surface results profile to normal eyes described previously, suggests that our patients represents normal population as a whole; cytological pattern of healthy patients, referring to conjunctival squamous metaplasia, is considered “normal” by classifications of Nelson² and Aragona,⁵ but high variability seems to be a normal characteristic, shared by the ocular surface traditional clinical tests. The role of SLC in conjunctival epithelial cells must be further established.

REFERENCES

1. Dogru M, Katakami C, Nakagawa N, Tetsumoto K, Yamamoto M. Impression cytology in atopic dermatitis. *Ophthalmology* 1998;105:1478-84.
2. Nelson JD. Impression cytology. *Cornea* 1988;7:71-81.
3. Calonge M, Diebold Y, Saez V, et al. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp Eye Res* 2004;78:457-72.
4. Barros J, Mascaro V, Gomes J, Freitas D, Lima A. Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e de coloração. *Arq Bras Oftalmol* 2001;64:127-31.
5. Aragona P, Romeo GF, Puzzolo D, Micali A, Ferreri G. Impression cytology of the conjunctival epithelium in patients with vernal conjunctivitis. *Eye* 1996;10 (Pt 1):82-5.
6. Fenga C, Aragona P, Cacciola A, et al. Ocular discomfort and conjunctival alterations in operating room workers. A single-institution pilot study. *Int Arch Occup Environ Health* 2001;74:123-8.
7. Bjerrum KB. Test and symptoms in keratoconjunctivitis sicca and their correlation. *Acta Ophthalmol Scand* 1996;74:436-41.
8. Schein OD, Tielsch JM, Munoz B, Bandeen-Roche K, West S. Relation between signs and symptoms of dry eye in the elderly. A population-based perspective. *Ophthalmology* 1997;104:1395-401.
9. Bandeen-Roche K, Munoz B, Tielsch JM, West SK, Schein OD. Self-reported assessment of dry eye in a population-based setting. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2469-75.
10. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea* 2003;22:640-50.
11. Lemp MA. Breakup of the tear film. *Int Ophthalmol Clin* 1973;13:97-102.
12. Dogru M, Karakaya H, Ozcetin H, et al. Tear function and ocular surface changes in keratoconus. *Ophthalmology* 2003;110:1110-8.
13. Horwath-Winter J, Berghold A, Schmut O, et al. Evaluation of the clinical course of dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1364-8.
14. Korb DR, Greiner JV, Herman J. Comparison of fluorescein break-up time measurement reproducibility using standard fluorescein strips versus the Dry Eye Test (DET) method. *Cornea* 2001;20:811-5.
15. Dogru M, Okada N, Asano-Kato N, et al. Alterations of the ocular surface epithelial mucins 1, 2, 4 and the tear functions in patients with atopic keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1556-65.
16. Design and conduct of clinical trials: report of the Clinical Trials Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:153-62.
17. Wright JC, Meger GE. A review of the Schirmer test for tear production. *Arch Ophthalmol* 1962;67:564-5.
18. Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:108-52.
19. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 1969;82:10-4.
20. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554-8.
21. Paschides CA, Petroustos G, Psilas K. Correlation of conjunctival impression cytology results with lacrimal function and age. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1991;69:422-5.

22. Murube J, Rivas L. Impression cytology on conjunctiva and cornea in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *Eur J Ophthalmol* 2003;13:115-27.
23. Arici MK, Arici DS, Topalkara A, Guler C. Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. *Clin Experiment Ophthalmol* 2000;28:113-7.
24. Gadkari SS, Adrianwala SD, Prayag AS, Khilnani P, Mehta NJ, Shaha NA. Conjunctival impression cytology--a study of normal conjunctiva. *J Postgrad Med* 1992;38:21-3, 22A-22B.
25. Rivas L, Oroza MA, Perez-Esteban A, Murube-del-Castillo J. Topographical distribution of ocular surface cells by the use of impression cytology. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1991;69:371-6.
26. Marnier K. 'Snake-like' appearance of nuclear chromatin in conjunctival epithelial cells from patients with keratoconjunctivitis sicca. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1980;58:849-53.
27. Bjerrum KB. Snake-like chromatin in conjunctival cells of a population aged 30-60 years from Copenhagen City. *Acta Ophthalmol Scand* 1998;76:294-8.
28. Adar S, Kanpolat A, Surucu S, Ucakhan OO. Conjunctival impression cytology in patients wearing contact lenses. *Cornea* 1997;16:289-94.
29. Tsubota K, Yamada M, Kajiwara K, Ugajin S, Hasegawa T, Kobayashi TK. Cytologic evaluation of conjunctival epithelium after cataract surgery. *Cornea* 1992;11:418-26.
30. Cher I. Blink-related microtrauma: when the ocular surface harms itself. *Clin Experiment Ophthalmol* 2003;31:183-90.
31. Sengor T, Gurdal C, Kirimlioglu H, Irkec M, Aydin S. Colour-coded mapping technique in impression cytology - findings in soft contact lens wearers and patients with other external eye diseases. *Ophthalmologica* 2002;216:155-8.
32. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *Clao J* 1995;21:221-32.
33. Yaylali V, Ozyurt C. Comparison of tear function tests and impression cytology with the ocular findings in acne rosacea. *Eur J Ophthalmol* 2002;12:11-7.
34. Yeo AC, Carkeet A, Carney LG, Yap MK. Relationship between goblet cell density and tear function tests. *Ophthalmic Physiol Opt* 2003;23:87-94.
35. Feenstra RP, Tseng SC. What is actually stained by rose bengal? *Arch Ophthalmol* 1992;110:984-93.
36. Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea* 1998;17:38-56.
37. McCarty CA, Bansal AK, Livingston PM, Stanislavsky YL, Taylor HR. The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia. *Ophthalmology* 1998;105:1114-9.
38. Paschides CA, Kitsios G, Karakostas KX, Psillas C, Moutsopoulos HM. Evaluation of tear break-up time, Schirmer's-I test and rose bengal staining as confirmatory tests for keratoconjunctivitis sicca. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:155-7.
39. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:75-92.
40. Begley CG, Chalmers RL, Abetz L, et al. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4753-61.
41. Feenstra RP, Tseng SC. Comparison of fluorescein and rose bengal staining. *Ophthalmology* 1992;99:605-17.
42. Schiffman RM, Walt JG, Jacobsen G, Doyle JJ, Lebovics G, Sumner W. Utility assessment among patients with dry eye disease. *Ophthalmology* 2003;110:1412-9.

43. Begley CG, Chalmers RL, Mitchell GL, et al. Characterization of ocular surface symptoms from optometric practices in North America. *Cornea* 2001;20:610-8.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE PARTICIPANTE

TITULO DO ESTUDO:

Citologia de Impressão em Pacientes Sem Patologia da Superfície Ocular

PESQUISADORES:

Dr. Samuel Rymer e Dra. Andressa Stolz

Telefone para contato 2101-8247. Serviço de Oftalmologia HCPA

OBJETIVO DO ESTUDO:

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar as células da superfície do seu olho através de um procedimento chamado Citologia de Impressão. Esse exame será útil para conhecermos o padrão destas células em pacientes sem doenças oculares e futuramente ajudarmos aqueles com doenças da superfície ocular, tanto no seu diagnóstico quanto na escolha do melhor tratamento. A Citologia de Impressão é um método simples e não invasivo, realizado da seguinte forma: anestesia do olho com colírio anestésico e obtenção de algumas células da superfície do olho pelo toque de um papel filtro. A análise destas células será realizada pelo Serviço de Patologia do HCPA. O procedimento será realizado pela Dra. Andressa Stolz, médica do setor de Córnea e Doenças Externas do Serviço de Oftalmologia.

RISCOS E POSSÍVEIS DESCONFORTOS:

Este procedimento poderá causar algum desconforto, tipo sensação de areia, após o exame pela retirada de células da superfície do olho.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS:

O exame de Citologia de Impressão poderá, eventualmente, diagnosticar doença ocular presente.

CONFIDENCIALIDADE:

As informações obtidas neste estudo serão armazenadas em banco de dados no HCPA para uso em pesquisas, sendo que a sua identificação será sempre preservada. Sua identidade não será revelada em apresentações ou publicações que venham a surgir a partir deste estudo.

CONSENTIMENTO:

Você poderá não participar ou sair do estudo a qualquer momento sem que isso afete o seu atendimento ou vínculo com esta instituição.

Compreendi os objetivos desta pesquisa e concordo em participar deste estudo de pesquisa.

Assinatura do paciente

Data ___/___/_____



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Protocolo de Pesquisa – Citologia de Impressão em Pacientes sem Patologia Ocular

Data coleta: ___/___/___ Coloração em ___/___/___ Qualidade coloração: B M R
Paciente: _____ Telefone: _____ Pront: _____
Sexo: F M Cor: ___ Idade: ___ anos

Olho Direito Superior (1)

Aderência: ()B>70% ()M 70-50% ()R<50%

Parâmetro	Normal	Borderline	Anormal
Celularidade	0	1	2
Adesão celular	0	1	2
Relação N/C	0	1	2
Cromatina nuclear	0	1	2
Dist cel caliciformes	0	1	2
Queratinização	0	1	2-3
Céls inflamatórias	0	---	2-3
Escore total	0-3 classe A	4-6 classe B	>6 classe C

Olho Esquerdo Superior (1)

Aderência: ()B>70% ()M 70-50% ()R<50%

Parâmetro	Normal	Borderline	Anormal
Celularidade	0	1	2
Adesão celular	0	1	2
Relação N/C	0	1	2
Cromatina nuclear	0	1	2
Dist cel caliciformes	0	1	2
Queratinização	0	1	2-3
Céls inflamatórias	0	---	2-3
Escore total	0-3 classe A	4-6 classe B	>6 classe C

Olho Direito Nasal (2)

Aderência: ()B>70% ()M 70-50% ()R<50%

Parâmetro	Normal	Borderline	Anormal
Celularidade	0	1	2
Adesão celular	0	1	2
Relação N/C	0	1	2
Cromatina nuclear	0	1	2
Dist cel caliciformes	0	1	2
Queratinização	0	1	2-3
Céls inflamatórias	0	---	2-3
Escore total	0-3 classe A	4-6 classe B	>6 classe C

Olho Esquerdo Nasal (2)

Aderência: ()B>70% ()M 70-50% ()R<50%

Parâmetro	Normal	Borderline	Anormal
Celularidade	0	1	2
Adesão celular	0	1	2
Relação N/C	0	1	2
Cromatina nuclear	0	1	2
Dist cel caliciformes	0	1	2
Queratinização	0	1	2-3
Céls inflamatórias	0	---	2-3
Escore total	0-3 classe A	4-6 classe B	>6 classe C

Olho Direito Inferior (3)

Aderência: ()B>70% ()M 70-50% ()R<50%

Parâmetro	Normal	Borderline	Anormal
Celularidade	0	1	2
Adesão celular	0	1	2
Relação N/C	0	1	2
Cromatina nuclear	0	1	2
Dist cel caliciformes	0	1	2
Queratinização	0	1	2-3
Céls inflamatórias	0	---	2-3
Escore total	0-3 classe A	4-6 classe B	>6 classe C

Olho Esquerdo Inferior (3)

Aderência: ()B>70% ()M 70-50% ()R<50%

Parâmetro	Normal	Borderline	Anormal
Celularidade	0	1	2
Adesão celular	0	1	2
Relação N/C	0	1	2
Cromatina nuclear	0	1	2
Dist cel caliciformes	0	1	2
Queratinização	0	1	2-3
Céls inflamatórias	0	---	2-3
Escore total	0-3 classe A	4-6 classe B	>6 classe C

Olho Direito Temporal (4)

Aderência: ()B>70% ()M 70-50% ()R<50%

Parâmetro	Normal	Borderline	Anormal
Celularidade	0	1	2
Adesão celular	0	1	2
Relação N/C	0	1	2
Cromatina nuclear	0	1	2
Dist cel caliciformes	0	1	2
Queratinização	0	1	2-3
Céls inflamatórias	0	---	2-3
Escore total	0-3 classe A	4-6 classe B	>6 classe C

Olho Esquerdo Temporal (4)

Aderência: ()B>70% ()M 70-50% ()R<50%

Parâmetro	Normal	Borderline	Anormal
Celularidade	0	1	2
Adesão celular	0	1	2
Relação N/C	0	1	2
Cromatina nuclear	0	1	2
Dist cel caliciformes	0	1	2
Queratinização	0	1	2-3
Céls inflamatórias	0	---	2-3
Escore total	0-3 classe A	4-6 classe B	>6 classe C



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Protocolo de Pesquisa – Citologia de Impressão em Pacientes sem Patologia Ocular

Nome: _____ Caso Nº: _____

Idade: _____ anos Sexo: F M Raça: B P M Outra: _____

Telefone: _____

Exame Palpebral e Conjuntival (normal = 1; anormal = 2) -----

OD: _____ Achado: _____ OE: _____ Achado: _____

Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal -----

OD(média): _____ segundos OE(média): _____ segundos

Score de Fluoresceína (0 – 3) -----

OD: _____ OE: _____

Teste de Schirmer I (sem anestésico) -----

OD: _____ mm/5min OE: _____ mm/5min

Score de Rosa Bengala (0 – 9) -----

OD: _____ OE: _____

Questionário de Olho Seco -----

1. Você sente que seus olhos ficam secos?
 Nunca Raramente Às vezes Frequentemente Sempre
2. Você já teve ou tem sensação de areia nos olhos?
 Nunca Raramente Às vezes Frequentemente Sempre
3. Você já teve ou tem sensação de queimação nos olhos?
 Nunca Raramente Às vezes Frequentemente Sempre
4. Seus olhos ficam vermelhos?
 Nunca Raramente Às vezes Frequentemente Sempre
5. Você nota crostas ou “caspas” nos seus cílios?
 Nunca Raramente Às vezes Frequentemente Sempre
6. Você acorda com os olhos grudados pela manhã?
 Nunca Raramente Às vezes Frequentemente Sempre

História Mórbita Progressa -----

Doenças Sistêmicas:

Tireoidopatia HAS DM Outras: _____

Doenças Oculares:

Medicações em uso -----

Ansiolíticos _____

Antidepressivos _____

Antiparkinsonianos _____

Antihistamínicos _____

Anticolinérgicos _____

Antihipertensivos _____

Diuréticos _____

Outros _____