

CITOLOGIA ESFOLIATIVA EM CÃES COM CERATOCONJUNTIVITE SECA

Felipe Baldo Lima¹, Arianne Pontes Oriá², Irís Daniela Santos Menezes³, Ana Cláudia Santos Raposo³, Deusdete Conceição Gomes Junior³

1. Programa de Residência Multiprofissional. Universidade Federal da Bahia (UFBA)
2. Professor Adjunto do Departamento de Anatomia, Patologias e Clínicas Veterinárias, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal da Bahia (UFBA). (arianneoria@ufba.br); Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina – Salvador –Ba. CEP 40170.110
3. Discentes do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

A Ceratoconjuntivite seca (CCS) é uma afecção relativamente comum na clínica de pequenos animais, sobretudo em cães e é causada pela deficiência do filme lacrimal pré-corneano. O seu diagnóstico é rotineiramente realizado através do Teste Lacrimal de Schirmer (TLS1), contudo, poucas são as descrições relativas às alterações conjuntivais a nível celular suscitadas por esta enfermidade. Dessa maneira, objetivou-se avaliar através de citologia por esfoliação, as modificações ocorridas na conjuntiva de cães portadores de CCS não medicados, e compará-las com as de cães clinicamente saudáveis. Foram utilizados 20 cães, 10 hígidos e 10 com CCS. A escova interdental cônica, utilizada como instrumento de coleta, mostrou-se de fácil manipulação; não ocorreram danos iatrogênicos e nenhum dos animais demonstrou desconforto durante e após a coleta. Nas amostras foi encontrada grande riqueza celular com preservação das características morfológicas. Os tipos celulares predominantes em cães portadores de CCS foram as células escamosas, neutrófilos e plasmócitos. As características descritas neste estudo poderão auxiliar no diagnóstico da CCS em cães e contribuir para avaliação terapêutica destes animais.

PALAVRAS-CHAVE: CCS, escova interdental, teste de Schirmer.

EXFOLIATIVE CYTOLOGY IN DOGS WITH KERATOCONJUNCTIVITIS SICCA

ABSTRACT

Keratoconjunctivitis sicca (KCS) is a relatively common disorder in small animal practice, especially in dogs and it is caused by a pre-corneal tear film deficiency. The diagnosis is routinely performed by the Schirmer Tear Test (TLS1), however there are scarce descriptions concerning the cellular conjunctival changes produced by this disease. Thus, the changes occurred in the conjunctiva of unmedicated dogs with KCS was evaluated by exfoliation cytology and compared with those of healthy dogs. 20 dogs, 10 healthy and 10 with KCS were used. The conic interdental brush, used as a data collection instrument proved to be easy to handle, no iatrogenic damage were observed and none of the animals showed discomfort during and after

collection. The samples showed highly rich cellular types with cell morphology preservation. Squamous cells, neutrophils and plasma cells were the predominant cell types in dogs with KCS. The characteristics described in this study may aid in the diagnosis of KCS in dogs and can contribute to therapeutic evaluation of these animals.

KEYWORDS: interdental brush, KCS, Schirmer tear test

INTRODUÇÃO

A deficiência da fração aquosa do filme lacrimal promove enfermidades ao olho, já que a lágrima é responsável pela manutenção da integridade da córnea, por remover detritos e carrear nutrientes (ALMEIDA et al., 2004; GHAFARI et al., 2012; TRBOLOVA & GHAFARI, 2012). A ceratoconjuntivite seca (CCS), também conhecida como “olho seco”, trata-se de uma afecção ocasionada pela deficiência quali-quantitativa do filme lacrimal pré-corneano, que apresenta-se, em geral, de forma bilateral (ALMEIDA et al., 2004). Trata-se da combinação de alterações que afetam a glândula lacrimal principal e a glândula da membrana nictitante com etiopatogenia desconhecida, sugestionada pela literatura como ocasionada por alterações imunomediadas, hipoplasia ou atrofia glandular (ALMEIDA et al., 2004; BERDOULAY et al., 2005). Outras causas incluem as iatrogenias, como a remoção da glândula da membrana nictitante, drogas lacrimotóxicas, tais como as sulfonamidas e a atropina, senilidade e doenças metabólicas (PETERSON-JONES & CRISPIN, 2006; BUSNARDO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2010).

O diagnóstico é balizado nos sinais clínicos e no teste lacrimal de Schirmer (TLS) (BERDOULAY et al., 2005), que é classificado em TLS I (mais rotineiramente utilizado) que afere a secreção basal e reflexa da lágrima, e o TLS II, que mensura a produção basal e residual da lágrima, este diferenciado pelo uso de anestésico local (TROST et al., 2007). Outras formas complementares de diagnóstico do CCS são a avaliação qualitativa da lágrima através do teste de osmolaridade, que preconiza a detecção da quantidade de cátions e aniões presentes no filme lacrimal (LOURENÇO, 2013), e o teste de ruptura do filme lacrimal, com a utilização do corante rosa bengala (BRASIL et al., 2005).

A citologia conjuntival pode ser utilizada como ferramenta complementar ao diagnóstico da CCS e auxiliar na busca da etiologia (BORGES et al., 2012) e implementação da terapêutica oftálmica. Todavia, a interpretação do exame citológico da mucosa conjuntival alterada necessita de um padrão normal para que se possa efetuar a comparação (BORGES et al., 2012).

Os instrumentos mais utilizados para coletadas amostras citológicas da conjuntiva palpebral são as zaragatoas, a espátula Kimura, a lâmina de bisturi e a escova para coleta citológica (escova cervical). Dentre estes, a escova revelou-se como boa opção, nos quesitos relacionados à quantidade, integridade e distribuição celular na lâmina de microscopia, devido à formação de monocamadas dentro de um campo único, o que proporciona maior riqueza celular (PETERSON-JONES & CRISPIN, 2006).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo verificar os achados citológicos da conjuntiva de cães portadores de CCS e compará-los com os de cães clinicamente saudáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos de pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA (protocolo 24/

2012). Outrossim, seguiram as orientações bioéticas preconizados pela Association for Research in Vision and Ophthalmology - ARVO (National Institutes of Health Publications No 85-23: Revised 1985) sobre o uso de animais em pesquisa.

Foram utilizados 20 cães, de ambos os sexos, sem raça definida, com faixa etária de seis meses a cinco anos, oriundos do Serviço de Oftalmologia do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os animais foram divididos em dois grupos: 10 indivíduos clinicamente sadios (Grupo 1) e 10 portadores de CCS, com Schirmer inferior a 10mm e presença de sinais como olho vermelho, secreção mucóide a muco-purulenta, neovascularização e/ou pigmentação da córnea (Grupo 2). Todos os animais foram submetidos à avaliação oftálmica com auxílio de fonte de luz e de magnificação após a realização do teste de Schirmer e exame do segmento posterior, para observação de eventuais anormalidades, na inexistência de opacificação dos meios transparentes. Foram excluídos do estudo animais em uso de qualquer medicação tópica ocular.

Para a avaliação da produção lacrimal foi consignado o Teste da lágrima de Schirmer (TLS 1) (Ophthalmos, São Paulo, Brasil). As tiras foram inseridas no saco conjuntival ventral de ambos os olhos por 60 segundos, removidas e lidas imediatamente.

A coleta de amostras celulares para avaliação citológica foi realizada após anestesia tópica com colírio anestésico a base de proximetacaína (Anestalcon®, Alcon, São Paulo, Brasil). Em animais portadores de CCS, realizou-se remoção do excesso de secreção, quando presente, com auxílio de gaze estéril. Após 30 segundos, a pálpebra inferior foi levemente tracionada para exposição da conjuntiva palpebral e as amostras coletadas com auxílio de escovas interdentais estéreis (escova interdental cônica Bitufo®, Itupava, Brasil), através de movimentos rotatórios sobre a conjuntiva palpebral (Figura 1).



FIGURA 1 – Macrofotografia da citologia esfoliativa conjuntival com auxílio de escova interdental em cão sadio (A) e em cão com CCS (B)

As amostras coletadas foram distribuídas sobre a superfície de lâminas de vidro e encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Medicina Veterinária da UFBA para processamento de rotina, com a utilização do corante Panótico rápido.

A contagem diferencial foi realizada em objetiva de 100x. Agrupamentos celulares e elementos degenerados ou danificados foram evitados. As bactérias foram também quantificadas da mesma forma e classificadas em extra e intracelulares. O achado recebeu classificação quali-quantitativa, onde (0) representou a ausência, (-) raríssimas ou raras, (+) discreta, (++) moderada e (+++) intensa celularidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O TLS1 dos animais clinicamente sadios encontravam-se dentro dos valores de normalidade estabelecidos por MARTIN (2010), com variação entre 15-25 mm/min. Todos os animais com CCS apresentaram TLS = 0 mm/min. Lesões oculares estavam presentes nos cães portadores da CCS, com evidente visualização do ressecamento ocular, secreção mucopurulenta, pigmentação corneana, episclerite, quemose e úlcera de córnea.

A escolha da escova interdental como instrumento de coleta para a citologia por esfoliação foi fundamentada no seu tamanho reduzido e por possuir cerdas de nylon que repelem à carga negativa da membrana das células epiteliais, e possibilitam a obtenção de amostras com alta celularidade e preservação morfológica. Em adição, trata de material que possui baixo custo e é de fácil esterilização e manuseio (BORGES et al., 2012; HONSHO et al., 2012; VENÂNCIO et al., 2012).

Relatos anteriores afirmam a ocorrência de desconforto durante o procedimento de coleta citológica (BORGES et al., 2012; HONSHO et al., 2012 e VENANCIO et al., 2012), entretanto, os animais submetidos ao presente estudo não demonstraram sinais de incomodo. VENÂNCIO et al. (2012) descreveram o blefaroespasma e a ceratite ulcerativa como alterações pós-coleta em estudo realizado com gatos. Contudo, as intercorrências relatadas podem, possivelmente, estar relacionadas ao instrumento de coleta utilizado, já que os trabalhos citados valeram-se da escova de citologia cervical, que apresenta tamanho maior comparativamente a escova interdental cônica, utilizada no presente estudo.

A descrição dos achados citológicos dos grupos 1 (Tabela 1) e 2 (Tabela 2) são descritos nas tabelas a seguir:

TABELA 1 - Descrição quali-quantitativa dos achados citológicos de animais clinicamente sadios (Grupo 1).

Animais	Amostras	CE	CC	N	CESC	L	E	M	ER	BE
01	OE	+	0	0	+	0	0	0	0	-
	OD	+	-	0	+	0	0	0	0	+
02	OE	++	0	0	+	0	0	0	0	-
	OD	++	0	-	+	0	0	0	0	-
03	OE	+++	-	0	+	0	0	0	0	-
	OD	++	-	-	+	0	0	0	0	-
04	OE	-	0	0	-	0	0	0	0	+
	OD	-	0	0	-	0	0	0	0	-
05	OE	+	0	-	-	0	0	0	-	-
	OD	+	-	0	-	-	0	0	0	-
06	OE	-	0	0	-	0	0	0	0	++
	OD	-	0	0	0	0	0	0	0	-
07	OE	+	-	-	-	0	-	0	0	-
	OD	+	0	-	-	0	0	0	0	+
08	OE	+	-	-	-	0	0	0	0	-
	OD	+	-	++	-	0	0	0	-	-
09	OE	+	-	-	0	0	0	0	0	-
	OD	+	-	0	0	0	0	0	0	-
10	OE	-	0	-	-	0	0	0	0	-
	OD	-	0	0	-	0	0	0	0	-

CE: Células escamosas; CC: Células Colunares (ou caliciformes); N: Neutrófilos; CESC: Células epiteliais superficiais ceratinizadas; L: Linfócitos; E: Eosinófilos; M: Macrófagos; ER: Eritrócitos; BE: Bactérias; OE: Olho esquerdo; OD: Olho direito. (0) Ausência de achados; (-) rara a raríssima quantidade; (+) quantidade discreta; (++) quantidade moderada; (+++) quantidade intensa

TABELA 2 - Descrição quali-quantitativa dos achados citológicos de animais portadores de CCS (Grupo 2).

Animais	Amostras	CE	CC	N	CESC	L	E	M	ER	BE
01	OE	++	-	+++	-	+	0	-	-	+
	OD	+++	0	+++	+	++	0	-	++	++
02	OE	+	-	+	++	+	0	+	0	-
	OD	+	0	++	-	+	0	0	-	-
03	OE	+++	-	+++	-	++	0	-	+	-
	OD	+++*	-	+	-	-	0	-	0	-
04	OE	++	+	++	+	+	0	-	0	-
	OD	++*	-	+++	+++	-	0	0	0	+++
05	OE	++	0	+++	-	++	0	0	-	+
	OD	++	0	+++	+	-	0	0	0	+++
06	OE	++	-	+++	+	+	-	+	+	+
	OD	++	0	+++	-	-	0	0	-	+++
07	OE	+++*	-	+++	+	-	0	0	-	++
	OD	+++*	0	+++	+	-	0	0	-	++
08	OE	++	+	+++	+	-	0	0	0	-
	OD	++*	+	+++	+	-	0	0	0	-
09	OE	+++	-	+++	+	-	0	0	0	+++
	OD	+++	-	+++	+	-	0	0	0	+++
10	OE	+	++	+++	+	+	0	+	0	+
	OD	+	+	++	+	+++	0	+	0	+

CE: Células escamosas; CC: Células Colunares; N: Neutrófilos; CESC: Células epiteliais superficiais ceratinizadas; L: Linfócitos; E: Eosinófilos; M: Macrófagos; ER: Eritrócitos; BE: Bactérias; OE: Olho esquerdo; OD: Olho direito. (0) Ausência de achados; (-) rara a raríssima quantidade; (+) quantidade discreta; (++) quantidade moderada; (+++) quantidade intensa; (*) Células pigmentadas

Células epiteliais estavam presentes em todas as amostras. Este achado já havia sido descrito por BOLZAN et al. (2005) ao avaliarem o padrão celular da conjuntiva bulbar de cães normais através da citologia de impressão. Acredita-se que a presença deste tipo celular em cães com CCS, em quantidade mais significativa quando comparado aos cães clinicamente normais, pode sugerir uma reação tecidual perante o excessivo ressecamento ocular. De acordo com RITO (2009) as células epiteliais constituem a primeira camada celular da conjuntiva, presentes em todas as amostras citológicas e caso não sejam encontradas, torna-se evidente que colheita não foi adequada.

Células epiteliais superficiais ceratinizadas foram visibilizadas de forma rara em 33% das lâminas de cães clinicamente normais avaliados por BOLZAN et al. (2005). No presente estudo este tipo celular esteve presente em todas as amostras e variaram de padrão ausente a discreto em cães clinicamente saudáveis, e raro a intenso em cães com CCS.

A presença de células escamosas em quantidade variável nas amostras pode ter ocorrido pela passagem da escova na região tarsal ou conjuntiva bulbar, onde o epitélio é estratificado escamoso (KÜEHNEL, 2003).

Não foi encontrada presença de células calciformes nos achados, fato este

que corrobora com os dados de VENÂNCIO e colaboradores (2012) que descreveram a ausência deste padrão celular na conjuntiva palpebral ou da membrana nictitante de gatos. Em um estudo com felinos, HONSHO et al. (2012) relataram a baixa quantidade de células caliciformes na conjuntiva da membrana nictitante e afirmaram que estas células são encontradas em maior abundância no fórnice conjuntival. Células caliciformes ocorreram em 60% das amostras nos estudos de BOLZAN e colaboradores (2005), no entanto, RITO (2009) salientou que este tipo celular pode ou não estar presente em amostras de citologia conjuntival.

É descrito na literatura a identificação de neutrófilos, eosinófilos e monócitos em pequenas quantidades em cães clinicamente normais (BOLZAN et al., 2005; VENÂNCIO et al., 2012). VENÂNCIO e colaboradores (2012) afirmaram que a presença destes leucócitos, em quantidade reduzida, em animais sem afecções oftálmicas devem ser desconsiderados. Entretanto, nos animais portadores de CCS, a presença abundante de neutrófilos e plasmócitos condizem com os achados da semiotécnica oftálmica onde a ocorrência de secreção mucopurulenta estava presente nos animais afetados (ORIÁ et al., 2013).

Segundo RASKIN (2003) a predominância de neutrófilos encontrada nas amostras classifica-a como amostra inflamatória; já os plasmócitos indicam processos inflamatórios denominados linfocítico-plasmocitários. Nos animais do presente estudo foi notada a associação destes tipos celulares e a presença de plasmócitos em grande quantidade e, este fato, pode estar relacionado com a cronicidade do processo (RASKIN, 2003; RITO, 2009) (Figura 2).

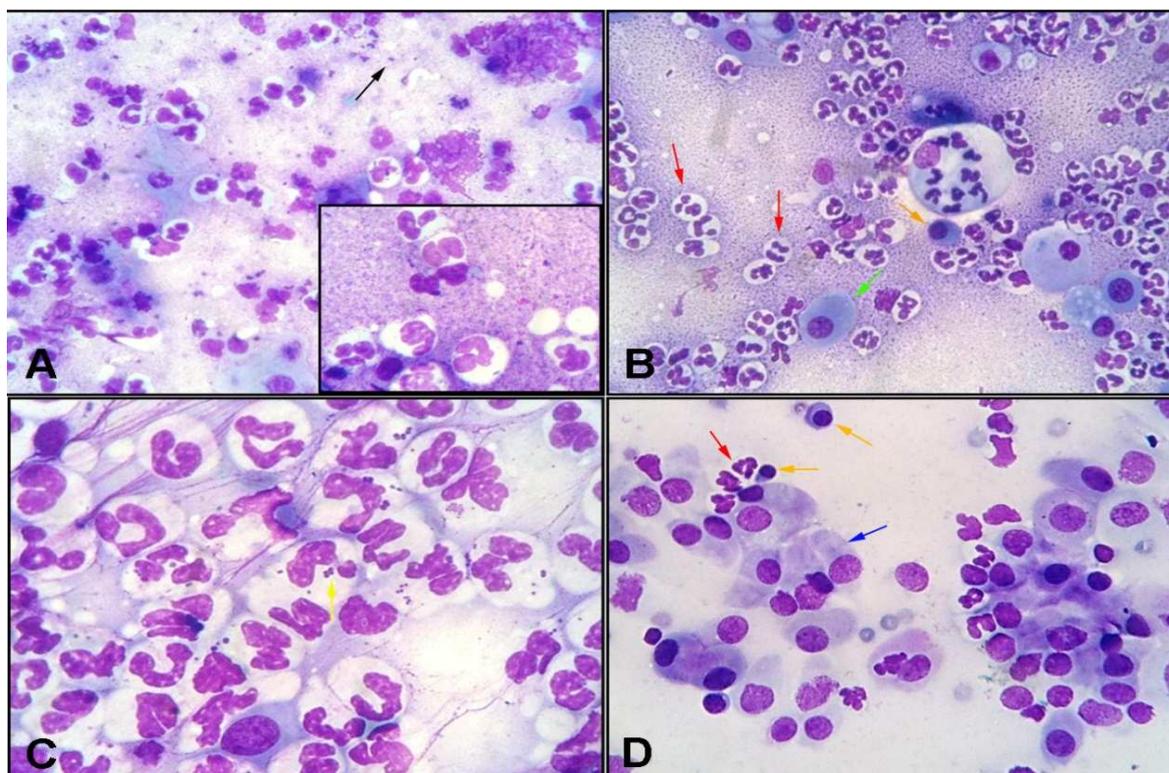


FIGURA 2 - Fotomicrografia de citologia esfoliativa da conjuntiva de cães portadores de ceratoconjuntivite seca. Notar: Numerosos neutrófilos e bactérias extracitoplasmáticas (seta preta) (A); plasmócitos (seta laranja), neutrófilos (seta vermelha) e células escamosas (seta verde) (B); Numerosos neutrófilos e bactérias intracitoplasmáticas (seta amarela) (C); Células colunares (seta azul), plasmócitos (seta laranja) e neutrófilos (seta vermelha) (D). (Panótico rápido. 100x).

CONCLUSÃO

A citologia conjuntival com uso de escova interdental mostrou-se um exame complementar de fácil execução, baixo custo e de grande utilidade na rotina ambulatorial veterinária, como método de diagnóstico complementar da ceratoconjuntivite seca, o que propicia o seu uso para nortear tratamentos adequados, com base no tipo celular predominante, fato que é evidenciado mediante a descrição dos diferentes achados citológicos dos animais clinicamente sadios quando comparados aos animais portadores de CCS.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. E., MAMEDE, F. V., ORTIZ, J. P. D., LAUS, J. L. Iatrogenic keratoconjunctivitis sicca in a dog. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 921-924, 2004.

BERDOULAY, A., ENGLISN, R. V., NADELSTEIN, B. Efeito tópico da suspensão aquosa de tacrolimus 0,02% na produção lacrimal em cães com ceratoconjuntivite seca. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 8, p. 225-232, 2005.

BOLZAN, A. A., BRUNELLI, A. T. J., CASTRO, M. B., SOUZA, M. A., SOUZA, J. L., LAUS, J. L. Conjunctival impression cytology in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 401-405, 2005.

BORGES, R. F., CARDOSO, K. C. F., BOLZAN, A. A., MOMO, C., HONSHO, C. S. Estudo comparativo de métodos de coleta e coloração para citologia conjuntival em cães normais. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 19, n. 3, p. 381-391, 2012.

BRASIL, A. V. O. M., BRASIL, O. F. M., VIEIRA, R. P., VAISMAN, M., AMARAL FILHO, O. M. B. Análise do filme lacrimal e sua relação com a largura da fenda palpebral e a exoftalmia na oftalmopatia de Graves. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 68, n. 5, p. 615-618, 2005.

BUSNARDO, C. A., EURIDES, D., BAUNGARTEN, L. B., SILVA, L. A. F., BELETTI, M. E., GUIMARÃES, E. C., ALVES, L. B., OLIVEIRA, B. J. N. A., SOUZA, L. A., NADRI, A. B., GONÇALVES, G. F. Produção de lágrima após exérese parcial da glândula lacrimal principal de cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n. 2, p. 171-176, 2010.

GHAFFARI, M. S., HAJIKHANI, R., SAHEBJAM, F., AKBAREIN, H., GDEZARDY. Intraocular pressure and Schirmer tear test result in clinically normal eared hedgehogs (*Hemiechimus auritus*) reference values. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 206-209, 2012.

HONSHO, C. S., SANTOS, F. A., DIAS, F. G. G., MOMO, C., SOUZA, F. F. Avaliação comparativa de dois métodos de citologia conjuntival em felinos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 2616, 2012.

KÜEHNEL, W. **Color atlas of cytology, histology, and microscopic anatomy**. 4. ed., New York: Thieme, p. 542, 2003.

LOURENÇO, M. G. M. P. C. **Avaliação da osmolaridade da lágrima em cães**

atópicos com conjuntivite alérgica. 78f. 2013. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.

MARTIN, C. L. **Anamnesis and the Ophthalmic Examination.** London:Manson Publishing Ltd, p. 15, 2010.

MONTEIRO, M. V. B., SANTOS, M. P., COSTA, C. T. C., WHITEMAN, C. W., MONTEIRO, F. O.B. Cinomose canino nos animais domésticos e silvestres. **Revista de Ciências Agrárias- Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Amazônia, v. 53, n. 2, p. 216-223, 2010.

ORIÁ, A. P., PINNA, M. H., FURTADO, M. A., PINHEIRO, A. C. O., GOMES JUNIOR, D. C., COSTA NETO, J. M. Microbiota conjuntival em cães clinicamente sadios e cães com ceratoconjuntivite seca. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 14, n. 4, p. 495-500, 2013.

PETERSON-JONES, S., CRISPIN, S. **Small animal ophthalmology**, 2 ed., England: Bsava, p. 78-143, 2006.

RASKIN, R. **Atlas de citologia de cães e gatos.** São Paulo: Roca, p. 365-369, 2003.

RITO, I. Q. S. **Utilização da citologia conjuntival no diagnóstico de doenças oculares.** 100f. 2009. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.

TRBOLOVA, A., GHAFARI, M.S. Reference values for Schirmer tear test I and II in clinically normal pigs. **Veterinary Ophthalmology**, Oxford, v.15, p.180-182, 2012.

TROST, K., SKALICKY, M., NELL, B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. **Veterinary Ophthalmology**, Áustria, v. 10, n. 3, p. 143-146, 2007.

VENÂNCIO, S. A. S., VIEIRA, A. B., ALENCAR, N. X., SOARES, A. M. B. Avaliação da técnica de esfoliação com escova citológica para coleta de células conjuntivais em gatos sadio: comparação entre a face palpebral da membrana nictitante e conjuntiva palpebral. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 11, p. 1199-1204, 2012.