

Avaliação da presença de células caliciformes na córnea humana

Evaluation of the presence of goblet cells on the human corneal surface

Jeison de Nadai Barros¹
Vera Lucia Degaspere Mascaro²
José Álvaro Pereira Gomes³
Luciene Barbosa de Sousa⁴
Ana Luisa Hofling-Lima⁵

RESUMO

Objetivo: Analisar pela citologia de impressão a presença de células caliciformes na superfície de córneas com sinais clínicos de conjuntivalização. **Métodos:** Foram realizados exames de citologia de impressão do epitélio córneo-conjuntival em 65 olhos de 65 pacientes com sinais clínicos de conjuntivalização com ou sem tratamento cirúrgico prévio. Os pacientes foram divididos em dois grupos segundo a história anterior de cirurgia de reconstrução da superfície ocular com transplante de limbo e membrana amniótica de tal forma que no grupo I foram estudados 49 pacientes sem cirurgia prévia e no grupo II estudaram-se 16 pacientes após cirurgia para reconstrução da superfície e com sinais de conjuntivalização recorrente. As amostras foram colhidas do olho afetado entre fevereiro de 2000 e fevereiro de 2002 no Laboratório de Doenças Externas Oculares do Departamento de Oftalmologia da UNIFESP. Definiu-se que o diagnóstico de deficiência límbica era confirmado por citologia de impressão quando uma ou mais células caliciformes íntegras eram encontradas na superfície da córnea. **Resultados:** No grupo I uma ou mais células caliciformes foram evidenciadas na superfície da córnea em 21 olhos (42,85%). No grupo II foi possível detectá-las na superfície da córnea em 9 pacientes (56,25%). **Conclusão:** A presença de células caliciformes na superfície da córnea detectada no exame de citologia de impressão em pacientes com conjuntivalização pode confirmar o diagnóstico de deficiência de limbo no local pesquisado, porém, a ausência destas células não exclui o diagnóstico.

Descritores: Limbo da córnea/citologia; Conjuntiva/citologia; Células caliciformes; Células epiteliais; Neovascularização patológica/patologia; Técnicas citológicas; Técnicas de diagnóstico oftalmológico

INTRODUÇÃO

Evidências recentes indicam que uma fração das células epiteliais basais do limbo corresponde às células epiteliais germinativas límbicas. Estas células são responsáveis pela manutenção das características do epitélio da córnea⁽¹⁾. Estudos experimentais e clínicos mostram que a remoção das células epiteliais germinativas resulta em crescimento epitelial conjuntival sobre a córnea (conjuntivalização), e com concomitante vascularização e inflamação⁽²⁻³⁾.

A demonstração de células caliciformes da conjuntiva sobre a superfície da córnea pelo exame de citologia de impressão evidencia a deficiência do limbo⁽⁴⁻⁵⁾. A origem conjuntival do epitélio que recobre a córnea nesses casos pode ser comprovada por coloração imunofluorescente com anticorpos monoclonais (imunohistoquímica)⁽²⁻³⁾ e pela detecção de células caliciformes por meio da citologia de impressão. Este método de biópsia não invasivo primeiramente descrito⁽⁶⁾ em 1977, pode ser também útil em outras

Trabalho realizado no Departamento de Oftalmologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

¹ Tecnólogo Oftálmico do Laboratório de Doenças Externas Oculares da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

² Encarregada do Setor de Córnea e Doenças Externas do Hospital do Servidor Público Estadual I.A.M.S.P.E - FMO e Colaboradora nos Setores de Patologia Externa e Córnea e no Laboratório de Doenças Externas Oculares da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

³ Doutor em Oftalmologia, Colaborador do Setor de Patologia Externa e Córnea da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

⁴ Doutora em Oftalmologia, Chefe do Setor de Patologia Externa e Córnea da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

⁵ Livre-docente, Chefe do Departamento de Oftalmologia e do Laboratório de Doenças Externas Oculares da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

Endereço para correspondência: Jeison de Nadai Barros, Rua Itapeva, 56/101 - São Paulo (SP) CEP 01332-000 E-mail: jbarros@oftalmo.epm.br

Recebido para publicação em 05.12.2002

Versão revisada recebida em 08.05.2003

Aprovação em 09.05.2003

Nota Editorial: Pela análise deste trabalho e por sua anuência na divulgação desta nota, agradecemos aos Drs. João Orlando Ribeiro Gonçalves e João Agostini Neto.

situações que requerem o exame das células superficiais do epitélio na avaliação do olho seco⁽⁷⁾, metaplasia escamosa⁽⁸⁾, contagem de células calciformes em casos de hipovitaminose A⁽⁹⁾ e avaliação da superfície ocular em usuários de lentes de contato⁽¹⁰⁾.

Este estudo teve como objetivo analisar o padrão da citologia de impressão na superfície de córneas com suspeita de deficiência de limbo, especialmente quanto à presença de células calciformes na região da córnea.

MÉTODOS

Um total de 65 olhos de 65 pacientes submetidos à citologia de impressão perilábica realizadas no Laboratório de Doenças Externas Oculares do Departamento de Oftalmologia da UNIFESP foram estudados. Os pacientes avaliados apresentavam alterações de superfície ocular graves e crônicas. Os espécimes foram obtidos dos olhos afetados com suspeita clínica de deficiência límbica entre fevereiro de 2000 e fevereiro de 2002. Os pacientes que apresentavam conjuntivalização foram distribuídos em 2 grupos. O grupo I compreendeu 49 pacientes com suspeita de deficiência de células germinativas do limbo e que não tinham sido submetidos à reconstrução da superfície ocular. O grupo II englobou 16 pacientes com sinais clínicos de conjuntivalização recorrente após cirurgia para reconstrução da superfície ocular com transplante de limbo e/ou membrana amniótica.

Quanto ao sexo, no grupo I, 33 pacientes (67,35%) eram do sexo masculino e 16 (32,65%) do sexo feminino com idade média de $45,6 \pm 17,50$ anos variando de 3 a 74 anos, e do grupo II todos eram do sexo masculino e idade média $36,37 \pm 17,68$ anos, variando de 2 a 73 anos.

Amostras da camada epitelial córneo-conjuntival para estudo pelo método de citologia de impressão foram obtidas após anestesia tópica e aplicação de papel filtro de acetato de celulose esterilizado na região perilábica do olho com conjuntivalização. O filtro da Millipore Corporation com poro de 0,45 micra, cortado manualmente com dimensões aproximadas

de 5mm de largura x 7mm de altura, com ápice, base e abertura lateral foi posicionado com uma pinça aplicando-se a ponta do papel (ápice) sobre a córnea, a abertura no limbo e a base sobre a conjuntiva. Após pressão por 5 segundos foi removido e imediatamente imerso em solução fixadora e posteriormente corado com ácido periódico de Schiff (PAS), hematoxilina e Papanicolaou modificado, conforme técnica padronizada⁽¹¹⁻¹²⁾. Cada amostra em papel filtro contendo células da superfície ocular foi analisada com microscópio óptico. Foi considerada amostra adequada para inclusão no estudo, o filtro com pelo menos 1/3 de sua superfície preenchida com células epiteliais. O filtro foi protegido do contato com a lágrima pois quando umidecido sua adesão é prejudicada. Nos casos em que o contato com a lágrima foi inevitável a colheita das amostras foi feita com outro papel filtro seco e foi considerado como positivo o paciente com pelo menos uma amostra citológica positiva para células calciformes na córnea.

O diagnóstico de deficiência límbica foi definido pela presença de uma ou mais células calciformes íntegras na superfície da córnea⁽⁴⁻⁵⁾.

RESULTADOS

No grupo I (Tabela 1), composto de 49 pacientes sem história anterior de cirurgia de reconstrução da superfície, o diagnóstico de deficiência límbica foi detectado em 21 olhos (42,85%). No grupo II (Tabela 2), com 16 pacientes com sinais de conjuntivalização recorrente após cirurgia para reconstrução da superfície, foi possível detectar células calciformes na superfície da córnea em 9 pacientes (56,25%).

Dos pacientes do grupo I com diagnóstico de deficiência límbica, 9 (18,37%) apresentavam história de queimadura química, 5 pacientes apresentavam outra etiologia provável da falência de limbo, como síndrome de Stevens-Johnson (n=1, 2,04%), pterígio (n=3, 6,12%) e papiloma (n=1, 2,04%) e 7 pacientes (14,29%) não tiveram diagnóstico definido.

Em relação à etiologia da deficiência límbica do grupo I nos pacientes com citologia negativa para células calciformes na

Tabela 1. Distribuição dos pacientes com diagnóstico clínico de deficiência de células germinativas do limbo que não foram submetidos a reconstrução de superfície ocular, segundo a etiologia provável da deficiência límbica

Etiologia provável	Células calciformes presentes na córnea	Células calciformes ausentes na córnea	Total
Queimaduras químicas	9 (18,37%)	8 (16,33%)	17 (34,70%)
Queimaduras térmicas	0	2 (4,08%)	2 (4,08%)
Síndrome de Stevens-Johnson	1 (2,04%)	3 (6,12%)	4 (8,16%)
Pterígio	3 (6,12%)	4 (8,16%)	7 (14,29%)
Papiloma	1 (2,04%)	0	1 (2,04%)
Coloboma de íris	0	1 (2,04%)	1 (2,04%)
Penfigóide ocular cicatricial	0	1 (2,04%)	1 (2,04%)
Pseudopenfigóide ocular	0	1 (2,04%)	1 (2,04%)
Sem diagnóstico definido	7 (14,29%)	8 (16,33%)	15 (30,61%)
Total	21 (42,85%)	28 (57,15%)	49 (100%)

Tabela 2. Distribuição dos pacientes com sinais clínicos de conjuntivalização recorrentes após cirurgia para reconstrução da superfície ocular, segundo a etiologia provável da deficiência límbica

Etiologia provável	Células caliciformes presentes na córnea	Células caliciformes ausentes na córnea	Total
Queimaduras químicas	6 (37,50%)	7 (43,75%)	13 (81,25%)
Queimaduras térmicas	1 (6,25%)	0	1 (6,25%)
Síndrome de Stevens-Johnson	1 (6,25%)	0	1 (6,25%)
Aniridia	1 (6,25%)	0	1 (6,25%)
Total	9 (56,25%)	7 (43,75%)	16 (100%)

córnea incluíram-se casos de queimadura química (n=8, 16,33%) e térmica (n=2, 4,08%), pterígio (n=4, 8,16%), síndrome de Stevens-Johnson (n=3, 6,12%), coloboma de íris (n=1, 2,04%), pseudopenfigóide ocular (n=1, 2,04%) e penfigóide ocular cicatricial (n=1, 2,04%). Oito (16,33%) pacientes não tiveram diagnóstico clínico definido.

Conforme a tabela 2, que representa o grupo II, nove (56,25%) pacientes tiveram a evidência no exame de citologia de impressão da deficiência de limbo após cirurgia de reconstrução da superfície ocular. Neste grupo, um paciente (6,25%) teve recorrência dos sinais de conjuntivalização após queimadura térmica, seis (37,50%) após queimadura química, um paciente (6,25%) apresentava aniridia e outro (6,25%) síndrome de Stevens-Johnson. Não foram observadas células caliciformes na córnea em 7 (43,75%) pacientes com sinais de conjuntivalização após cirurgia para reconstrução de superfície devido à queimadura química.

Alguns resultados da citologia de impressão mostraram características morfológicas de metaplasia escamosa e até queratinização. Em 20 olhos (57,14%) de um total de 35 (28 sem cirurgia e 7 com cirurgia) que tiveram citologia negativa para células caliciformes na superfície da córnea, não foram encontradas células caliciformes também na conjuntiva pesquisada. Nesses casos, além da ausência de células caliciformes, a citologia de impressão revelou células epiteliais com perda da coesão intercelular e citoplasma mais abundante em relação ao tamanho do núcleo; algumas células eram poligonais e apresentavam bordos citoplasmáticos dobrados. Por vezes observou-se cariopícnose, células anucleadas degeneradas e células epiteliais esparsas eosinofílicas queratinizadas.

Em 12 amostras com resultado citológico negativo para células caliciformes na córnea foi possível observar presença de mucina nessa região.

DISCUSSÃO

Este trabalho confirma que a deficiência das células germinativas do limbo, observada em estudos experimentais através da remoção de tecido epitelial do limbo em coelhos⁽²⁻³⁾, também pode ser verificada em córneas humanas, portadoras de sinais clínicos de conjuntivalização.

A suspeita clínica da deficiência límbica deve ser corretamente avaliada no pré-operatório de transplante de córnea

pela frequência com que se observa o insucesso da cirurgia em casos de deficiência límbica sem tratamento⁽¹³⁻¹⁴⁾.

De acordo com outros autores⁽¹³⁾, o critério diagnóstico mais confiável da deficiência de limbo é a presença de células caliciformes na superfície da córnea. A presença de uma única célula califorme na córnea é suficiente para a confirmação do diagnóstico clínico⁽⁴⁻⁵⁾, critério também considerado neste trabalho.

Considerando-se todos os pacientes incluídos em nosso estudo, observa-se uma positividade média de 49,55% para células caliciformes na córnea. A maior positividade de deficiência límbica foi no Grupo II que são casos de falência de limbo recorrente após cirurgia para reconstrução da superfície ocular com transplante de limbo e/ou membrana amniótica humana preservada com 56,25% do que no Grupo I com 42,85%. Conclui-se, portanto, que embora a cirurgia proposta para tratamento de deficiência límbica seja aplicada por muitos cirurgiões, em alguns casos, esta deficiência não é totalmente corrigida por meio de uma única cirurgia⁽¹⁵⁾. A superfície ocular reconstruída deve apresentar um epitélio mais favorável para a remoção adequada de células superficiais pela citologia de impressão, o que poderia explicar neste estudo o maior número de casos de deficiência de limbo confirmados citologicamente no grupo II.

Em 35 olhos, 50,45% (28 do grupo I e 7 do grupo II), dos pacientes com suspeita clínica de conjuntivalização não foram observadas células caliciformes na superfície da córnea, não havendo a evidência citológica da deficiência de limbo. Nossos resultados diferem do observado por outros autores⁽⁴⁾ provavelmente pelas diferenças de diagnósticos clínicos e de critérios diagnósticos. Tais autores⁽⁴⁾ obtiveram resultado citológico positivo para células caliciformes na córnea em 94 amostras de um total de 134 (70,14%) analisadas retrospectivamente e obtidas num período de 10 anos, considerando-se não só a presença de células caliciformes íntegras na córnea, como também a presença de grânulos de mucina livres das células como positivo para deficiência límbica. Consideramos apenas a presença destas células íntegras, e se fosse considerada a presença destes grânulos como um achado para confirmação diagnóstica, provavelmente o diagnóstico seria confirmado em um maior número de casos. Além disso, aqueles autores⁽⁴⁾ usaram filtro de nitrocelulose na colheita e o usado em nossa técnica é de acetato de celulose, o que poderia implicar em diferentes quantidades de células superficiais removidas. Es-

tudos futuros podem ser úteis na comparação da celularidade obtida com estes dois tipos de papel filtro.

Em nosso estudo, em 20 amostras (57,14%) do grupo de 35 em que não foram encontradas células caliciformes na córnea, também não haviam células caliciformes na região de conjuntiva avaliada, devido a metaplasia escamosa. Isto representa a gravidade da alteração de superfície ocular destes casos, em que encontramos até fibrose, como outro autor⁽¹⁴⁾, e explica que se pode ter metaplasia escamosa grave e aí não mais será percebida nenhuma célula caliciforme. Acreditamos que a fibrose não permite uma adesão suficiente do papel filtro para a remoção adequada de células superficiais. A ausência de células caliciformes pode também ser esperada diante da falta de condições ambientais para a normal proliferação das mesmas. Há relatos⁽¹⁶⁾ de que superfícies de conjuntiva alterada frequentemente são cobertas por células epiteliais com metaplasia escamosa, que inclui importante redução ou ausência da população de células caliciformes, como em casos de penfigóide ocular cicatricial, síndrome de Stevens-Johnson e ceratoconjuntivite sicca.

Além desses fatores, nem todos os sinais clínicos suspeitos de conjuntivalização foram avaliados pelo mesmo grupo com um mesmo critério de inclusão pré-determinado. A destruição na superfície ocular poderia em alguns casos não ser difusa o suficiente para causar perda total das células germinativas do limbo. A citologia de impressão pode também não ter sido sensível na detecção da deficiência límbica em todos os pacientes que apresentavam clinicamente várias fases de evolução da conjuntivalização e também a falência de limbo poderia ser incompleta ou parcial.

Em 41,67% (n=5) das 12 amostras com resultado citológico negativo para células caliciformes na córnea e com mucina não se evidenciaram células caliciformes também na área de conjuntiva avaliada. Esta mucina, livre das células, poderia ter duas origens: a de células caliciformes presentes em regiões da conjuntiva não pesquisadas ou outra fonte secretora que não corresponda às células caliciformes. Esta hipótese é corroborada por autores⁽¹⁷⁻¹⁸⁾ que afirmam que o conteúdo de mucina do filme lacrimal pode não estar correlacionado à densidade de células caliciformes na conjuntiva, e nestas situações, este último é o melhor indicador de alterações da superfície ocular.

O diagnóstico clínico de deficiência de limbo e o diagnóstico laboratorial pela citologia de impressão são importantes no planejamento da reconstrução da superfície ocular, especialmente antes de um possível transplante de córnea. Em pacientes com acometimento bilateral e assimétrico, a citologia de impressão pode ser útil também para se determinar a gravidade da destruição do limbo no olho menos afetado.

CONCLUSÕES

A presença de células caliciformes na superfície da córnea detectada no exame de citologia de impressão em pacientes

com conjuntivalização pode confirmar o diagnóstico de deficiência de limbo no local pesquisado, porém, a ausência destas células não exclui o diagnóstico.

ABSTRACT

Purpose: To analyze by impression cytology the presence of goblet cells on corneal surfaces with conjunctivalization.

Methods: Corneal-conjunctival impression cytology was performed in 65 eyes of 65 patients who had clinical signs of conjunctivalization with or without previous ocular surgery. Patients were classified into two groups according to previous history of ocular surface reconstructive surgery associated with limbal transplantation and human amniotic membrane. In group I, 49 patients without previous ocular surgery were evaluated and in group II 16 patients were included after ocular surface reconstructive surgery with conjunctivalization recurrence. Samples were obtained in the affected eye between February 2000 and February 2002 at the UNIFESP's External Eye Disease Laboratory. Limbal deficiency was detected when one or more goblets cells were found on the corneal surface. **Results:** In group I one or more goblet cells were found on the corneal surface of 21 eyes (42.85%). In group II goblet cells were found on the corneal surface of 9 patients (56.25%). **Conclusion:** Presence of goblet cells on the corneal surface detected by impression cytology in patients with conjunctivalization can confirm limbal stem cell deficiency, however, its absence does not exclude the diagnosis.

Keywords: Limbus corneae/cytology; Conjunctiva/cytology; Goblet cells; Epithelial cells; Cytological techniques; Diagnostic techniques ophthalmological

REFERÊNCIAS

1. Tseng SCG. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989;3(Pt 2): 141-57.
2. Chen JY, Tseng SCG. Abnormal corneal epithelial wound healing in partial thickness removal of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32: 2219-33.
3. Huang AJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:96-105.
4. Puangsrichareern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-85.
5. Sridhar MS, Vemuganti GK, Bansal AK, Rao GN. Impression cytology-proven corneal stem cell deficiency in patients after surgeries involving the limbus. *Cornea* 2001;20:145-8.
6. Egbert PR, Lauber S, Maurice DM. A simple conjunctival biopsy. *Am J Ophthalmol* 1977;84:798-801.
7. Nelson JD, Havener VR, Cameron JD. Cellulose acetate impressions of the ocular surface: dry eye states. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1869-72.
8. Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology* 1985;92:728-33.
9. Amedee-Manesme O, Luzeau R, Wittepen JR, Hanck A, Sommer A. Impression cytology detects subclinical vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr* 1988;47: 875-8.
10. Adar S, Kanpolat A, Sürücü S, Ucakhan OO. Conjunctival impression cytology in patients wearing contact lenses. *Cornea* 1997;16:289-94.

11. Barros JN, Mascaro VLDM, Gomes JAP, Freitas D, Hofling-Lima AL. Cito-
logia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e coloração. Arq
Bras Oftalmol 2001;64:127-31.
12. Barros JN, Mascaro VLDM, Gomes JAP, Freitas D, Hofling-Lima AL. Cito-
logia de impressão na avaliação da superfície ocular. In: 14º Congresso de
Prevenção da Cegueira e Reabilitação Visual; 2000 Set 6-9, Natal, Brasil;
2000. p.53
13. Tseng SC, Chen JJ, Huang AJ. Classification of conjunctival surgeries for
corneal disease based on stem cell concept. Ophthalmol Clin North Am 1990;
3:595-610.
14. Gomes JAP. Atualização no tratamento das ceratoconjuntivites cicatriciais.
Arq Bras Oftalmol 2000;63:91-6.
15. Prabhasawat P, Tseng SC. Impression cytology study of epithelial phenotype
of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. Arch
Ophthalmol 1997;115:1360-7.
16. Nelson JD, Wright JC. Conjunctival goblet cell densities in ocular surface
disorders. Arch Ophthalmol 1984;102:1049-51.
17. Friend J, Kiorpes T, Thoft RA. Conjunctival goblet cell frequency after alkali
injury is not accurately reflected by aqueous tear mucin content. Invest
Ophthalmol Vis Sci 1983;24:612-8.
18. Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA. Goblet cell density in ocular
surface disease. A better indicator than tear mucin. Arch Ophthalmol
1983;101:1284-7.

VIII Congresso Internacional de Catarata e Cirurgia Refrativa

**Centro de Convenções de Pernambuco
OLINDA - PE**

21 a 24 de abril de 2004

PROMOÇÃO:

Sociedade Brasileira de Catarata e Implantes Intra-oculares
Sociedade Brasileira de Cirurgia Refrativa

INFORMAÇÕES:

Tel.: (81) 3442-1940 - Tel./fax: (81) 3265-7419

e-mails: sbcii@uol.com.br ou catarata@hotlink.com.br

home pages: www.catarata-refrativa.com.br e www.sbcii.com.br