

# Coloração *in vivo* para o diagnóstico de lesões neoplásicas e displásicas da conjuntiva<sup>+</sup>

*In vivo* staining test for the diagnosis of conjuntival neoplasms and dysplasias

Renato Augusto Neves<sup>(1)</sup>  
Carlos Eduardo Natalli Pavésio<sup>(2)</sup>  
Walton Nosé<sup>(3)</sup>  
Rubens Belfort Jr.<sup>(4)</sup>

## RESUMO

O corante nuclear azul de toluidina, tem sido utilizado com bons resultados no diagnóstico e orientação cirúrgica de diversos tumores em mucosas. Através da modificação da técnica clássica de coloração para uso em conjuntiva ocular, avaliou-se a utilização deste corante em lesões de conjuntiva, na orientação e complementação do diagnóstico clínico. Quarenta e dois pacientes com lesões de conjuntiva foram avaliados por exame biomicroscópico simples antes e depois de corados com solução aquosa de azul de toluidina a 1% e, em seguida, submetidos a biópsia excisional da lesão para comparação com o exame anátomo-patológico. Dos 42 pacientes, houve concordância em 40 deles (95%) e dois falso-positivos, explicados pela celularidade das lesões. Todos os diagnósticos de malignidade pelo exame histopatológico foram identificados pelo método do azul de toluidina. A análise estatística mostrou sensibilidade de 100%, especificidade de 94%, valor preditivo positivo de 82%, valor preditivo negativo de 100% e chance proporcional de 100%, com significância estatística determinada pelo teste de McNemar ( $p=0,25$  ou 25%). O uso deste método estaria indicado por ser simples, barato, inócuo, e não necessitar de ambiente cirúrgico ou narcose em casos disseminados e em crianças.

Além disso em casos de lesões grandes e múltiplas, sugeriria o local apropriado para biópsia.

**Palavras-chave:** Tumores de conjuntiva; Cloreto de tolônio; Corantes vitais.

## INTRODUÇÃO

A conjuntiva é sede de lesões de várias etiologias, que incluem alterações degenerativas, circulatórias, inflamatórias, e do crescimento e desenvolvimento, cujo diagnóstico diferencial, apenas pelo exame clínico é impreciso. O pleomorfismo das lesões e a semelhança entre as diversas apresentações clínicas, tornam necessárias a utilização de métodos de laboratório, como os anátomo-patológicos, para o correto diagnóstico e conduta terapêutica. Corantes utilizados em tecidos vivos são denominados corantes vitais, sendo

utilizados em diversas especialidades para o auxílio diagnóstico de lesões em diferentes locais do organismo, que incluem os tecidos oculares (Clinical..., 1982). O estudo de corantes vitais em conjuntiva e córnea teve com Norn o início de publicações onde o mesmo utilizava diferentes corantes em diversas situações clínicas, entre elas a observação e teste do aparelho lacrimal, a permeabilidade das vias e deficiências lacrimais, o endotélio corneano pós facectomia, fluoresceína e rosa bengala, e adaptação de lentes de contato (Norn, 1972). A associação de fluoresceína 1% e a rosa bengala 1% tópica

<sup>+</sup> Trabalho em parte patrocinado pelo CAPES

<sup>(1)</sup> Mestre em Oftalmologia, Pós-Graduando Nivel Doutorado, Colaborador do Setor de Córnea da Escola Paulista de Medicina (EPM)

<sup>(2)</sup> Mestre e Doutor em Oftalmologia - EPM

<sup>(3)</sup> Mestre e Doutor em Oftalmologia, Chefe do Setor de Cirurgia Refrativa - EPM

<sup>(4)</sup> Professor Titular do Departamento de Oftalmologia - EPM

Endereço para correspondência: Renato A. Neves - R. Botucatu, 822 - CEP: 04023 - S. Paulo, SP

em alterações oculares, foi utilizada em 400 olhos em São Paulo por Almada, Belfort Jr. & Schwartz (1974). Os autores observaram que o uso desta associação permite a análise das propriedades tintoriais de ambos os colírios, em diversas patologias, principalmente olho seco e na adaptação de lentes de contato.

O azul de toluidina ou cloreto de tolônio é um corante metacromático básico, classificado como nuclear, principalmente pelas suas características acidófilas (Clinical..., 1982). É utilizado desde a descrição por Richart (1963) e até hoje, como teste diagnóstico para tumores por corar seletivamente epitélio neoplásico e displásico e mapear a extensão da lesão. A descrição original, em doenças do colo uterino, incluía a aplicação do corante, em concentração de 1% em toda a área cervical e lavagem com ácido acético a 3%, após um minuto.

Collins, Hansen, Theriot (1966) estudaram a utilidade clínica desta técnica na vulva de 242 pacientes portadores de lesões, das quais 36 apresentaram teste positivo, sendo 19 com lesão maligna e 17 falso-positivos. Não houve nenhum achado falso-negativo. O teste do azul de toluidina foi também analisado em lesões orais concluindo ser o teste totalmente confiável, com ausência de resultados falso-negativos, quando comparados ao exame anátomo-patológico. Foi demonstrado também de utilidade na diferenciação de lesões tumorais na laringe, esôfago, brônquios, estômago e pênis (In vivo..., 1981).

Estudos microscópicos sugerem que o mecanismo de ação do azul de toluidina decorre da maior permeabilidade do corante em tecidos tumorais, pela desorganização histológica e aumento dos espaços intracelulares além da maior permeabilidade das membranas celulares das células tumorais pela afinidade pelo ácido nucleico e pelo aumento da razão núcleo - citoplasma celular.

Wander et al. (1985) utilizaram o azul de toluidina e o azul de metileno,

em solução aquosa em diversas concentrações, em animais, para a análise de alterações epiteliais corneanas e conjuntivais, sugerindo a utilização clínica, em lesões infecciosas e tumorais. Não há na literatura trabalho utilizando a coloração de azul de toluidina em oftalmologia em humanos.

---

#### OBJETIVOS

---

- 1) Modificar a técnica clássica de coloração com azul de toluidina para permitir o uso em oftalmologia.
- 2) Avaliar a solução de azul de toluidina no auxílio diagnóstico do tipo de lesão conjuntival, maligna, pré-maligna ou benigna e na orientação quanto à indicação da terapêutica cirúrgica ou não.

---

#### PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS

---

Quarenta e três pacientes de ambos os sexos, com idade variando de 8 a 79 anos, portadores de lesão conjuntival, provenientes do Setor de Patologia Externa do Departamento de Oftalmologia da Escola Paulista de Medicina e do Setor de Oftalmologia do Hospital A.C. Camargo (pacientes 1, 3, 9, 25, 26, 29, 38), foram estudados pelo autor de julho de 1989 a julho de 1990 e submetidos a exame ectoscópico e biomicroscópico, realizados utilizando-se lâmpada de fenda (Topcon 5E) com aumentos variáveis de 10 a 25 vezes. As lesões foram classificadas clinicamente como benignas ou malignas e especificados os seus prováveis diagnósticos (carcinoma espinocelular, pterígio, nevo, granuloma, dermóide, melanoma, etc.).

Imediatamente após o exame clínico, procedeu-se a instilação de colírio de cloridrato de proparacaína (Anestalcon®, Laboratório Alcon, São Paulo) no olho afetado do paciente e um cotonete embebido em solução aquosa de azul de toluidina a 1%, (Farmácia Dermaflora-São Paulo) foi aplicada à lesão conjuntival. Após um minuto, a solução so-

bre a lesão foi removida com um cotonete embebido em água boricada a 3% (Farmácia Dermaflora-São Paulo).

A técnica clássica de coloração com o azul de toluidina utiliza ácido acético a 1% após 1 minuto para remover a solução. Tendo estudo preliminar realizado pelo autor em 10 cobaias mostrando que a instilação ocular de ácido acético a 1% causa severa cerato-conjuntivite, foi utilizada água boricada a 3% em vez de ácido acético a 3%, pois ambas soluções apresentam pH ácido semelhante.

A positividade do teste foi definida pela persistência de coloração azul rutilante da lesão estudada, observada ao biomicroscópio, após a retirada com a água boricada. Em um período que variou de 3 a 15 dias, a lesão foi submetida à exérese cirúrgica, com margem livre. Em caso de suspeita pelo exame clínico ou pelo azul de toluidina de lesão tumoral maligna, a crioterapia da base escleral exposta foi realizada. Os fragmentos de tecido de todos os pacientes foram fixados em formol a 10% e enviados para exame histopatológico realizado no Departamento de Anatomia Patológica da Escola Paulista de Medicina ou do Hospital A.C. Camargo. O material foi processado e corado com o método da hematoxilina e eosina e, quando necessário, com colorações especiais, como o tricrômio de Masson, o P.A.S., e o mucicarmim de Meyer. As lesões foram analisadas sob microscopia óptica em aumentos que variaram de 100 a 400 vezes e classificadas em maligna, pré-maligna e benigna de acordo com a histologia e características citológicas do epitélio de revestimento.

Em dois pacientes, 23 e 39, partindo do pressuposto que o azul de toluidina colorida toda a área displásica, logo após a utilização da coloração, realizou-se exérese de toda a área corada, apesar do exame biomicroscópico sugerir uma área menor. O paciente 9 apresentava resultado de biópsia prévio de carcinoma espinocelular com mar-

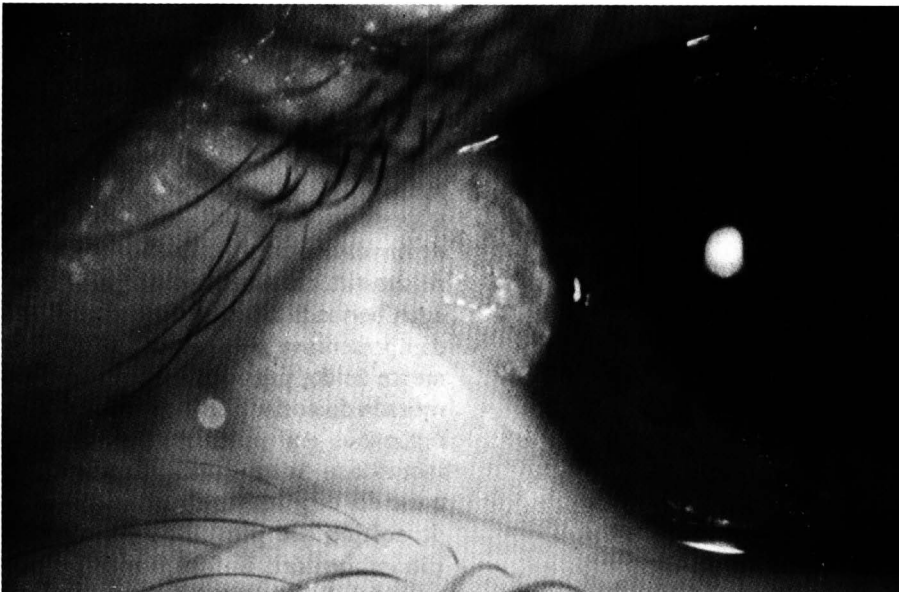


Figura 1. Carcinoma espinocelular de conjuntiva. Aspecto clínico. (Paciente 23)

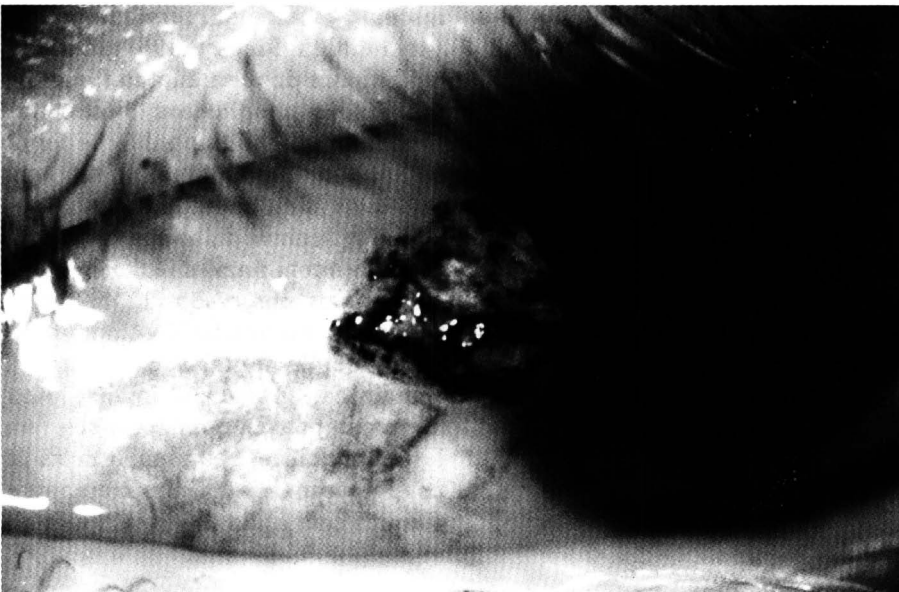


Figura 2. Carcinoma espinocelular de conjuntiva corado pelo azul de toluidina a 1%. Aspecto clínico. (Paciente 23)

gens não livres. A área excisada foi determinada de acordo com a área corada no intra-operatório. Para análise dos resultados utilizou-se o teste de McNemar para confrontar os resultados positivos e negativos dados pelo exame histopatológico e o teste do azul de

toluidina. Foi aplicado também o teste de Sensibilidade e Especificidade considerando o exame histopatológico como o "gold standard". Fixou-se em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade (Remington & Schork, 1970).

## RESULTADOS

Os resultados do diagnóstico clínico e biomicroscópico, do método proposto de coloração com o azul de toluidina e do histopatológico, estão relacionados na Tabela 1. Das 42 lesões estudadas, 33 tiveram diagnóstico clínico de lesões de caráter benigno, das quais, 29 foram confirmadas pelo teste (resultado negativo) e 4 apresentaram resultado positivo, ou seja, provável lesão maligna (pacientes 4, 6, 12 e 17). No paciente 4, a malignidade determinada pela coloração do azul de toluidina, foi confirmada pelo exame histopatológico - carcinoma espinocelular.

O paciente 6, diagnosticado como portador de pterígio, apresentou um resultado positivo pela coloração do azul de toluidina, tendo o exame histopatológico evidenciado uma queratose actínica com transformação para carcinoma "in situ".

Com relação às lesões malignas, o método mostrou-se positivo em uma lesão previamente ressecada com diagnóstico anátomo-patológico de carcinoma espinocelular com margens comprometidas (paciente 9).

No paciente número 3, o método foi usado no exame de um paciente com uma lesão recidivada previamente excisada. A biópsia realizada no local corado pelo azul de toluidina (exame positivo) evidenciou uma lesão recidivada.

Nas restantes 9 lesões, o diagnóstico clínico foi de processo maligno e o azul de toluidina foi positivo. Os resultados foram confirmados pelo exame histopatológico.

O paciente 12, portador de pterígio, teve seu diagnóstico confirmado pelo exame histopatológico, embora o resultado obtido pela coloração do azul de toluidina fosse positivo (falso-positivo). O mesmo resultado (falso-positivo) foi obtido com o paciente 17. este paciente foi diagnosticado como portador de pinguécula e o exame histopatológico evidenciou processo infla-

*Coloração in vivo para o diagnóstico de lesões neoplásicas e displásicas da conjuntiva*

**TABELA 1**

Diagnóstico biomicroscópico (DB) e histopatológico (DH) de lesões conjuntivais de 42 pacientes corados ou não pelo azul de toluidina (AT).

CASO nº	IDADE	SEXO	DB	AT	DH
01	26	M	CEC	+	CEC
02	34	F	CEC	+	CEC
03	28	F	CEC	+	CEC
04	79	F	Papiloma	+	CEC
05	19	F	Papiloma	-	Papiloma
06	78	F	Pterígio	+	Q. Act. e CEC
07	19	F	Nevo	-	Nevo
08	24	F	Granuloma	-	Granuloma
09	38	F	CEC	+	Margens comp.
10	44	F	Pterígio	-	Pterígio
11	33	M	Pterígio	-	Pterígio
12	26	F	Pterígio	+	Pterígio
13	27	M	Pinguécua	-	Pterígio
14	08	F	Nevo	-	Nevo
15	24	F	Granuloma	-	Calázio
16	30	M	Pterígio	-	Pterígio
17	15	F	Pinguécua	+	Conj. Alérgica
18	43	M	Pterígio	-	Inflam. Crônica
19	14	F	Dermóide	-	Inflam. Crônica
20	39	M	Melanoma	-	Nevo
21	77	F	Pterígio	-	Q. Act.
22	60	F	Pterígio	-	Pterígio
23	19	F	CEC	+	CEC
24	37	M	Pinguécua	-	Inflam. Crônica
25	45	M	Melanoma	+	Melanoma
26	27	M	Calázio	-	Calázio
27	49	F	Pterígio	-	Pterígio
28	55	M	Pterígio	-	Pterígio
29	29	F	Calázio	-	Calázio
30	46	F	Pterígio	-	Pterígio
31	24	M	Conjuntivite	-	Inflam. Crônica
32	25	F	Calázio	-	Calázio
33	67	M	Pterígio	-	Pterígio
34	51	F	Pterígio	-	Pterígio
35	45	M	Pterígio	-	Pterígio
36	27	F	Calázio	-	Inflam. Inspec.
37	47	M	Pterígio	-	Pterígio
38	54	F	Tumor	-	Glândula Sebácea
39	74	M	CEC	+	CEC
40	33	M	Pterígio	-	Inflam. Crônica
41	50	M	Pterígio	-	Pterígio
42	29	F	Pterígio	-	Pterígio

CEC - Carcinoma Espinocelular  
Inflam. Inspec - Inflamação Inespecífica  
Inflam. Crônica - Inflamação Crônica

matório de caráter alérgico. Não foi observado nenhum resultado falso-negativo.

Os índices estatísticos determinados para o azul de toluidina foram: sensibilidade de 100%, especificidade de

94%, valor preditivo positivo de 82%, valor preditivo negativo de 100% e chance proporcional de 100%. O Teste de McNemar apresentou discordância de 5%, não significativa ( $p=0,25$  ou 25%) (Tabela 2)

**DISCUSSÃO**

O método do azul de toluidina é utilizado clinicamente como rotina em diversas especialidades, e inclui o ácido acético para a retirada do excesso e interpretação dos resultados. No método desenvolvido neste trabalho, resolveu-se substituir o ácido acético a 1% por água boricada a 3%. A solução utilizada apresentava pH igual a 6,0, ligeiramente ácido, portanto adequado para a retirada do corante. Em estudos prévios realizados em animais, observou-se a inocuidade da água boricada a 3% para o uso em conjuntiva, em relação ao ácido acético que provocava intensa reação inflamatória linfoplasmocitária por períodos de até uma semana.

Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos obtidos com o azul de toluidina para o diagnóstico de lesões tumorais da cérvix uterina, vulva e boca. Richart (1963) observou positividade do teste em mais de 95% das lesões neoplásicas da cérvix uterina. Collins, Hansen & Theriot (1966) estudando 242 pacientes com lesões vulvares, observou 17 falso-positivos e nenhum falso-negativo entre os exames com o azul de toluidina. Falso-positivos observados na literatura têm como explicação a coloração de úlceras, tecido de granulação, queratina descamada, atrofia pós irradiação ou queratose papilar, principalmente em lesões de laringe, e esôfago, onde não é possível realizar a limpeza mecânica e química com ácido acético (Clinical..., 1982).

**TABELA 2**

Lesões de conjuntiva, segundo o caráter suspeito, benigno ou maligno, diagnosticado pelo método do azul de toluidina.

Azul de Toluidina	Exame Histopatológico		Total
	Maligna	Benigna	
Positivo (Maligna)	9	2	11
Negativo (Benigna)	0	31	31
Total	9	33	42

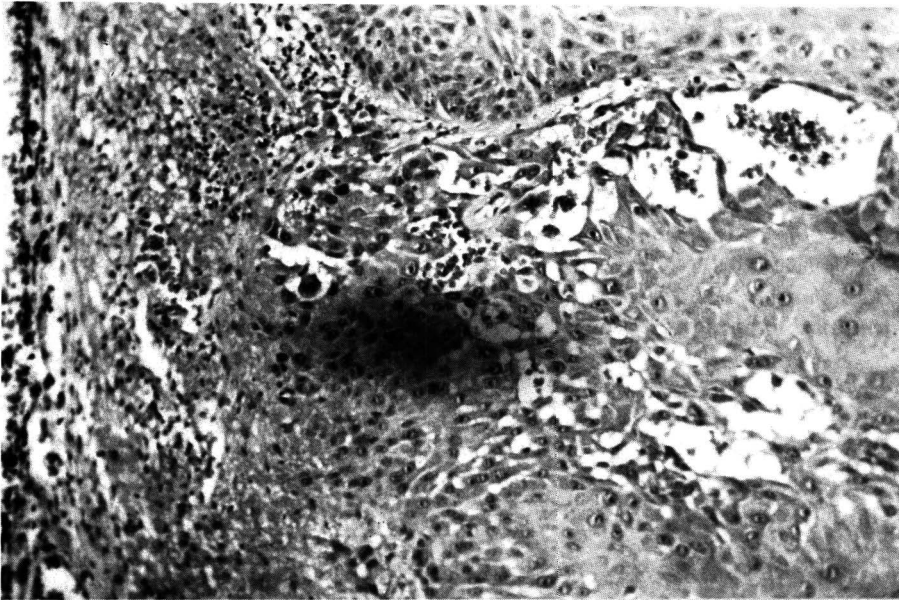


Figura 3. Carcinoma espinocelular de conjuntiva. Aspecto histológico. (Paciente 23). (Hematoxilina & Eosina 150x).

Neste estudo foram observados dois falso-positivos e nenhum falso-negativo, ou seja, todos os diagnósticos de malignidade confirmados pelo exame histopatológico foram identificados pelo método do azul de toluidina. Quanto aos falso-positivos, no caso 12, talvez o erro tenha ocorrido pela alta celularidade da lesão, interferindo no resultado do teste. No caso 17, por se tratar de uma conjuntivite alérgica, talvez o teste tenha sido positivo pela presença de eosinófilos em grande quantidade, coráveis pelo azul de toluidina. Deve-se estudar mais lesões com alta celularidade para verificar se essa discordância se repete.

No paciente 21 observou-se resultado negativo para uma queratose actínica da conjuntiva, lesão de caráter pré-maligno (Burnier, 1984). Para lesões pré-cancerosas, é possível que a positividade do teste esteja diretamente relacionada ao número de células presentes, grau de displasia e atipia nuclear das mesmas. Nesse caso, lesões com leve grau de displasia podem não ser reconhecidas, o que não invalida o teste pois, sua utilidade no seguimento

de uma lesão de caráter duvidoso, permitirá o reconhecimento da alteração displásica progressiva.

Na análise do método, utilizou-se os seguintes parâmetros:

O cálculo da sensibilidade, ou seja, a capacidade de detectar-se corretamente resultados positivos entre os doentes (100%) e a especificidade, que representa a capacidade de detectar-se corretamente a ausência de doença entre os não doentes (94%).

O valor preditivo positivo, que representa a probabilidade de um resultado positivo provir de um paciente com a doença (82%) e o valor preditivo negativo, que fornece a probabilidade de um resultado negativo provir de um paciente sem a doença (100%) provam a grande capacidade do método em prever lesões malignas (Tabela 2).

As discordâncias (5%) ocorreram apenas nas lesões benignas, previamente discutidas, tendo teste de McNemar não significativo ( $p=0,25$  ou 25%). Os pacientes 4 e 6 se mostraram os mais ilustrativos sobre a validade do método. Em ambos, uma lesão maligna (carcinoma espinocelular) foi de-

monstrada pelo método e não pelo diagnóstico clínico. Além disso, outra utilidade para o método além da diagnóstica: o método serviu para delimitar as margens do tumor no paciente 9, permitindo completa excisão com margens livres e, no caso 3, permitiu o acompanhamento de recidivas tumorais. A coloração também se mostrou efetiva em lesões pigmentadas (paciente 25). O método do azul de toluidina quando comparado ao método de citologia esfoliativa em lesões tumorais de conjuntiva, realizado também em São Paulo e na mesma comunidade por Pavésio (1988), mostrou-se superior em relação aos índices estatísticos. Pavésio observou sensibilidade de 90%, porém do mesmo modo, sem resultados falso-positivos. As vantagens do azul de toluidina ainda incluem a possibilidade da realização do teste com o resultado imediato, que não depende de processamento histológico. Além disso, o atrito da colheita em uma lesão tumoral pode ocasionar sangramento e embolização de células tumorais para outros sítios. Como os demais métodos de coloração *in vivo* já referidos, este não se propõe a substituir a biópsia mas sim complementá-la, ou mesmo, orientá-la. O uso deste método estaria indicado por ser simples, barato, inócua, e não necessitar de ambiente cirúrgico ou narcose em casos disseminados e crianças, apesar de requerer o uso de lâmpada de fenda. Além disso em casos de lesões grandes e múltiplas, sugeriria o local apropriado para biópsia. No caso do diagnóstico clínico de uma lesão benigna, sua evolução pode ser acompanhada através da utilização deste método em vários retornos, aumentando a eficácia do exame, pois o aumento do grau de atipia ou displasia podem determinar o aparecimento de um resultado positivo, indicando transformação maligna. Finalmente, existiria também a possibilidade do método ser utilizado em larga escala para investigações populacionais.

Coloração in vivo para o diagnóstico de lesões neoplásicas e displásicas da conjuntiva

1. A substituição do ácido acético a 1% por água boricada a 3% permitiu a utilização do método na conjuntiva ocular *in vivo*.
2. O método mostrou-se de grande aplicabilidade no diagnóstico e na orientação da terapêutica cirúrgica.
3. O método auxiliou na delimitação da área a ser excisada e no diagnóstico de recidivas das lesões de conjuntiva.

**SUMMARY**

The use of toluidine blue as a nuclear stain has been reported in several specialties to help detect and treat surgically tumors. We modified the technique and evaluated it as a test to differentiate conjunctival lesions. Forty-two patients with conjunctival lesions were evaluated by biomicroscopy, and had their conjunctiva stained by toluidine blue

1% aqueous solution. The lesion was evaluated again and then surgically removed. The specimen were submitted to pathological exam. From the 42 patients, 40 (95%) matched and 2 false positive results were found. All malignancy results from the toluidine blue test were confirmed by histopathologic exam. Statistical analysis showed a sensitivity of 100%, a specificity of 94%, a positive predictive value of 82%, a negative predictive value of 100% and a likelihood ratio of 100%, with a statistical significance by the McNemar test ( $p = .25$  ou 25%). This is a simple, unexpensive and inoquous method that help in the detection and characterization of conjunctival tumors.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ALMADA, A.T.; BELFORT JR, R.; SCHWARTZ, T. - Uso da associação Fluoresceína - Rosa Bengala no diagnóstico das alterações patológicas do segmento anterior do olho. *Arq. Bras. Oftalmologia*, 37:4-8, 1974.
2. BURNIER JR., M. - Contribuição para o estudo das lesões da pálpebra e da conjuntiva. São Paulo (Tese de Mestrado - Escola Paulista de Medicina), 1984.
3. Clinical stains for cancer. *Lancet*, 8267:320, 1982.
4. COLLINS, G.C.; HANSEN, L.H.; THERIOT, E. - A clinical stain for use in selecting biopsy sites in patients with vulvar disease. *Am. J. Obst. Gynecol.*, 28:158-65, 1966.
5. In vivo stain for gastric cancer. *Lancet*, 1:115, 1988. [Letter]
6. NORN, M.S., - Vital staining of cornea and conjunctiva. *Acta Ophthal.*, 50:7-65, 1972a.
7. PAVÉSIO, C.E.N. - Avaliação do método citológico no diagnóstico de lesões tumorais da conjuntiva. São Paulo (Tese de Mestrado - Escola Paulista de Medicina), 1988.
8. REMINGTON, R.D. & SCHORK, M.A. - Statistics with applications to the biological and health sciences. Prentice - Hall, INC, Englewood Cliffs New Jersey - 1970. 418p.
9. RICHART, R.M. - A clinical staining test for the in vivo delination of dysplasia and carcinoma in situ. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 86:703-12, 1963.
10. WANDER, A.H.; NEUMEISTER, R.D.; TSCHISMADIA, I.; CHOROMOKOS, E.A.; MASUKAWA, T. - In vivo corneal and conjunctival epithelial nuclear stain. *Cornea*, 4:8-13, 1985.

**XI CONGRESSO BRASILEIRO DE PREVENÇÃO DA CEGUEIRA**

03-06 de Setembro de 1994  
Centro de Convenções de Brasília

**INFORMAÇÕES:**

**WERA - Assessoria de Congressos e Eventos Ltda.**  
SRTN - Quadra 702 - Edifício Brasília Radio Center - salas 3061/64  
CEP: 70719-900 - Brasília - DF  
Fone: (061) 321-1090 - Fax: (061) 321-9009

**E R R A T A**

Nos Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, Vol. 56, nº 6 - Dezembro/1993, no artigo: "Coloração *in vivo* para o diagnóstico de lesões neoplásicas e displásicas da conjuntiva", à página 308 no item autores:

**Onde se lê:** Renato Augusto Neves, Carlos Eduardo Natali Pavésio, Walton Nosé, Rubens Belfort Jr.

**Leia-se:** Renato Augusto Neves, Carlos Eduardo Natali Pavésio, Wagner Koji Aragaki, José Ricardo Carvalho Lima Rehder, Walton Nosé, Rubens Belfort Jr.