

## ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE COLETA E COLORAÇÃO PARA CITOLOGIA CONJUNTIVAL EM CÃES NORMAIS

Renata Fuentes Borges<sup>1</sup>  
Karym Christine de Freitas Cardoso<sup>2</sup>  
Aline Adriana Bolzan<sup>3</sup>  
Cláudia Momo<sup>4</sup>  
Cristiane dos Santos Honsho<sup>5</sup>

### RESUMO

Duas técnicas de colheita e duas técnicas de coloração de amostras conjuntivais foram avaliadas a fim de se disponibilizar ao clínico veterinário uma alternativa de baixo custo, fácil execução e interpretação no auxílio ao diagnóstico de desordens da superfície ocular. Estudaram-se quatro grupos experimentais, com 13 cães cada: GDAPR – citologia por abrasão por escova, olho direito, Panótico rápido; GEIPN – citologia por impressão de papel filtro com transferência, olho esquerdo, Papanicolaou; GDAPN – abrasão por escova, olho direito, Papanicolaou e GEIPR – citologia por impressão de papel filtro com transferência, olho esquerdo, Panótico rápido. Cada grupo foi avaliado quanto ao custo, tempo e à facilidade de confecção das lâminas, assim como ao resultado final na observação por microscopia óptica, quanto à preservação da morfologia e caracterização das estruturas celulares, como núcleo, nucléolo e citoplasma, homogeneidade e intensidade da coloração e presença de artefatos. O método de abrasão com escova propiciou lâminas com maior riqueza de células enquanto o método de citologia por impressão com transferência permitiu a colheita sem anestesia tópica e necessitou de papel filtro apropriado, o que encareceu o procedimento. Ambas as colorações permitiram a identificação de diferentes células. A coloração pelo método Panótico foi de execução mais rápida, fácil e de menor custo. A coloração de Papanicolaou favoreceu a diferenciação entre as células e, conseqüentemente, maior acurácia no exame. Na rotina de uma clínica veterinária, o método de colheita por abrasão com escova e a coloração Panótico seriam boa escolha devido à facilidade e rapidez na realização e confecção das lâminas, indicando-se, porém, a coloração Papanicolaou em casos de neoplasias.

**Palavras-chave:** conjuntiva, Papanicolaou, Panótico rápido, células conjuntivais, microscopia

### COMPARATIVE STUDY OF METHODS OF HARVESTING AND STAINING FOR CONJUNCTIVAL CYTOLOGY IN NORMAL DOGS

#### ABSTRACT

Two harvesting techniques and two techniques of conjunctival staining samples were evaluated in order to provide the veterinary practitioner a low-cost, easy implementation and interpretation aid in the diagnosis of ocular surface disorders. We studied four experimental groups of 13 dogs each: GDAPR – brush cytology, right eye, Diff quick stain; GEIPN - impression cytology with transfer, left eye, Papanicolaou; GDAPN - brush cytology, right

<sup>1</sup> Graduação Medicina Veterinária – Universidade de Franca

<sup>2</sup> Pós-Graduação Medicina Veterinária – Universidade de Franca

<sup>3</sup> Departamento de Cirurgia Veterinária – Universidade de São Paulo

<sup>4</sup> Medicina Veterinária – Universidade de Franca

<sup>5</sup> Programa de Mestrado em Medicina Veterinária de Pequenos Animais - Oftalmologia veterinária – Universidade de Franca

eye, Papanicolaou and GEIPR - impression cytology with transfer, left eye, Diff quick. The groups were evaluated for cost, time and ease of manufacture of the blades, optical microscopy and evaluated the preservation of cellular morphology, uniformity of color, the presence of artifacts and the staining intensity as well as characterization of cell structures. The brush cytology blades provided with richer cells while the method of impression cytology with transfer allowed the harvest without topical anesthesia and required appropriate filter paper, which is an expensive procedure. Both staining allowed the identification of different cells. The Diff quick stain was presented more quickly and easily, in relation to the execution, at lower cost. The Papanicolaou stain favored the characterization of cells and hence the reading of the slides. In the veterinary clinic, the method of harvesting by brush abrasion and Diff quick stain would be good choice because of the ease and speed of implementation and preparation of slides, indicating, however, the Papanicolaou stain in suspected tumor.

**Keywords:** conjuntiva, Papanicolaou, Diff quick, conjunctival cells, microscopy.

## ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE COLECTA Y TINCIÓN DURANTE LA CITOLOGÍA CONJUNTIVAL EN LOS PERROS NORMALES

### RESUMEN

Fueron evaluadas dos técnicas de colecta y dos técnicas de tinción de muestras conjuntivales con el fin de ofrecer al profesional veterinario un bajo costo así como una fácil implementación e interpretación en el diagnóstico de trastornos de la superficie ocular. Se estudiaron cuatro grupos experimentales de 13 perros cada uno: GDAPR - citología por cepillado del ojo derecho, Panóptico rápido; GEIPN - citología de impresión con papel filtro del ojo izquierdo, Papanicolaou; GDAPN - cepillado del ojo derecho, GEIPR y Papanicolaou - citología de impresión con papel filtro del ojo izquierdo, Panóptico rápido. Cada grupo fue evaluado según costo, tiempo y facilidad para la elaboración de las láminas, así como el resultado final en la observación al microscopio óptico, la preservación de la morfología celular, la uniformidad del color, la presencia de artefactos, y la intensidad de la tinción y la caracterización de las estructuras celulares. El método de citología por cepillado proporcionó las láminas con el mayor número de células mientras que el método de citología de impresión permitió la colecta sin anestesia tópica; sin embargo este último método requirió el uso de papel filtro adecuado, lo que encareció el procedimiento. Ambas tinciones permitieron la identificación de las diferentes células. La elaboración de láminas para Panóptico rápido fue más rápida, más fácil y más barata. El Papanicolaou favoreció la caracterización de las células y por lo tanto facilitó la lectura de las láminas. En la rutina de una clínica veterinaria, el método de colecta por cepillado acompañado de tinción por Panóptico rápido sería una buena elección debido a la facilidad y velocidad para la preparación de las láminas. Sin embargo, la tinción de Papanicolaou es más indicada en los casos de sospecha de neoplasia.

**Palabras clave:** conjuntiva, Papanicolaou, Panóptico rápido, células de la conjuntiva, microscopía.

### INTRODUÇÃO

A conjuntiva ocular atua na dinâmica lacrimal, confere proteção imunológica ao globo ocular, auxiliando na movimentação e na cicatrização corneal (1-3). Em decorrência da íntima relação entre a conjuntiva e as estruturas intra e extraoculares, interpretar adequadamente, suas alterações é fundamental para o diagnóstico de afecções da superfície ocular, como as conjuntivites (1, 4). O diagnóstico e o tratamento da conjuntivite são práticas comuns, mas a

identificação da causa subjacente não é. (4). Nesses casos, a citologia ou a biopsia conjuntival podem auxiliar o clínico a estabelecer sua patogênese (1).

A citologia compreende o estudo individualizado de células, não se considerando a estrutura do tecido ou órgão de origem (5, 6). Diversos materiais podem ser empregados para colheita de amostras de conjuntiva, como: zaragatoas, escovas, espátulas, lâminas e papel filtro, utilizado na citologia por impressão (7-9). Trata-se de método valioso, de baixo custo, simples e acessível para diagnóstico, monitoramento e propiciando tratamento de doenças da superfície ocular (5, 7, 9, 10). Entretanto, para sua interpretação, nas enfermidades conjuntivais, faz-se necessária a obtenção de um padrão de normalidade, que possibilite a comparação e, assim, estabelecer ou não a presença de alteração (11). A citologia conjuntival é indicada nos casos de úlceras profundas em progressão, ou em *melting*; abscessos corneais ou conjuntivais, ceratitides ou conjuntivites severas não responsivas à terapia, ou ainda, nos casos de nodulações em córnea, conjuntiva ou terceira pálpebra (9).

A abrasão com escova é uma técnica de qualidade e de fácil execução (7, 9, 12, 13), e tida como superior à colheita com espátula devido à riqueza de células da amostra, incluindo as das camadas mais profundas obtidas de forma menos invasiva, à preservação da morfologia celular com menor sobreposição de células e, principalmente, ao menor desconforto suscitado ao paciente (7, 12, 13).

A citologia por impressão, por tratar-se de técnica que fornece informações mais detalhadas, comparativamente a qualquer outro método convencional, sobre a localização anatômica de cada segmento e seus respectivos componentes celulares, demonstra ser ferramenta útil na identificação de grande variedade de doenças oculares, como neoplasias e ceratoconjuntivite seca (11, 12, 14-16).

A técnica consiste na aplicação de papel filtro sobre a superfície ocular e permite obter amostras com uma a três camadas de células epiteliais, preservando as características morfológicas e a relação anatômica intercelular (11, 15-18). O material colhido pode ser submetido à análise histológica, imunoistoquímica ou molecular (18). A coloração do papel filtro apresenta maior complexidade, conferindo-lhe certa desvantagem, comparativamente à citologia por escova, na qual várias técnicas de coloração das lâminas podem ser empregadas (13). Neste sentido, Luzeau et al. (19) e Carlier et al. (20, 21) propuseram uma forma simplificada de citologia por impressão, na qual o material colhido é transferido para a lâmina pressionando-se o papel filtro contra a mesma com o auxílio do dedo. Com esta modificação, diminui-se o custo e a complexidade relativos à coloração do papel, preservando-se as vantagens da técnica (19-21).

Há vários tipos de corantes e suas combinações disponíveis para citologia (6, 22). As colorações do tipo Romanowsky, que incluem os corantes de Wright, Giemsa e Diff-Quik (Panótico rápido), e a de Papanicolaou, com suas variações, são as mais preconizadas (22). Em medicina veterinária, a escolha pelas técnicas de colorações tipo Romanowsky fundamenta-se, principalmente, no baixo custo, na praticidade e facilidade de execução aliada à qualidade dos resultados. Por outro lado, o uso da coloração de Papanicolaou tem destaque, em medicina humana, por exibir maior riqueza de detalhes nucleares (22, 23), especialmente em células neoplásicas (5).

Por ser a citologia conjuntival, no Brasil, ainda pouco empregada em medicina veterinária, propomo-nos, ao conceber este estudo, comparar duas técnicas de colheita de amostras citológicas conjuntivais e duas técnicas de coloração sob condições que mimetizem a rotina na clínica de pequenos animais e cotejá-las quanto ao custo, à facilidade de colheita e confecção das lâminas, bem como ao resultado final na preservação da morfologia e detalhes de estruturas celulares. Pretende-se, dessa forma, esclarecer e fornecer ao médico veterinário, opções de escolha quanto a este método auxiliar ao diagnóstico de afecções oftálmicas (24).

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada obedecendo-se aos critérios da *Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)* (25) e sob a anuência e vigilância do Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais (CEUA), sob o número 006/09-A, de 12 de março de 2009.

Neste estudo, foram coletadas amostras conjuntivais de 13 cães, machos ou fêmeas, com peso médio de 20 kg. Os animais foram selecionados após ser constatada a ausência de afecções oftálmicas ou sistêmicas que pudessem interferir nos resultados obtidos. Foram constituídos quatro grupos experimentais, a saber: Grupo DAPr (GDAPr, n=13) - colheita das amostras conjuntivais, nos olhos direitos, por método de abrasão com escova e coloração Panótico rápido<sup>6</sup>; Grupo EIPn (GEIPn, n=13) - colheita das amostras conjuntivais, nos olhos esquerdos, por método de impressão com transferência e coloração Papanicolaou<sup>7</sup>; Grupo DAPn (GDAPn, n=13) - colheita das amostras conjuntivais, nos olhos direitos, por método de abrasão com escova e coloração Papanicolaou; Grupo EIPr (GEIPr, n=13) - colheita das amostras conjuntivais, nos olhos esquerdos, por método de impressão com transferência e coloração Panótico rápido.

A colheita das amostras conjuntivais pelo método de abrasão com escova foi realizada utilizando-se escovas coletoras estéreis para amostragem de células endocervicais<sup>8</sup>, destinando-se uma escova para cada colheita. Previamente à colheita das amostras, instilou-se colírio à base de proximetaína a 0,5%<sup>9</sup> para dessensibilização da superfície ocular. Após um minuto, a escova foi introduzida no saco conjuntival inferior, sendo girada e atritada sobre a conjuntiva por seis vezes. Para o método de citologia de impressão por transferência, utilizaram-se tiras de papel filtro<sup>10</sup> com poros de 0,22 µm, recortadas em formato retangular de 5 mm por 20 mm de comprimento, utilizando-se luvas de procedimento para o manipulador. A tira foi pressionada na conjuntiva palpebral inferior com o auxílio do dedo indicador, calçado com luva de procedimento, durante 10 segundos.

O material do GDAPr e do GDAPn foi distribuído sobre lâminas de vidro, rolando-se a escova cuidadosamente, até que todo o material fosse liberado. O material referente ao GEIPn e ao GEIPr, contido no papel filtro, foi transferido, imediatamente, às lâminas de vidro, pressionando-se, com o auxílio do dedo, o papel contra a lâmina em cinco locais, mantendo-se contato durante um segundo, em cada passagem.

Em seguida, procedeu-se à fixação das lâminas, imergindo-as imediatamente em álcool etílico a 92,8%. A coloração foi realizada, posteriormente, conforme as indicações do fabricante dos kits. A leitura foi realizada pela observação por microscopia óptica<sup>11</sup> e as imagens foram captadas por sistema de captura digital<sup>12</sup>, pelo programa Motic Images Plus 2.0.

Os resultados foram avaliados quanto ao custo e à facilidade na colheita do material e na confecção das lâminas, assim como ao resultado final na observação microscópica da preservação da morfologia celular, homogeneidade da coloração, presença de artefatos, intensidade da coloração e evidenciação de estruturas celulares. Para cada lâmina foram contados dez campos microscópicos (40x) e as células diferenciadas em: superficiais queratinizadas sem núcleo (QS/Nuc.); superficiais queratinizadas com núcleo (QC/Nuc.); superficiais (Sup.); intermediárias (Int.) e caliciformes (Calic.).

<sup>6</sup>Panótico rápido - Laborclin produtos para laboratório Ltda.

<sup>7</sup>Papanicolaou - Newproo Produtos para Laboratório.

<sup>8</sup>Endobrush - Alamar Tecno Científica Ltda.

<sup>9</sup>Anestalcon - Alcon Laboratórios do Brasil Ltda.

<sup>10</sup>Papel filtro N02SPS4700 - Sigma Co./USA

<sup>11</sup>Microscópio biológico binocular mod. Eclipse E200 - Nikon Instruments Inc./ Japan

<sup>12</sup>Câmera de Vídeo Digital Moticam 1000 com 1,3 megapixels - Motic Group Co. Ltd./China

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas adequações à técnica de citologia de impressão por transferência a fim de melhorar a quantidade de material colhido e qualidade das lâminas. A porosidade do papel filtro utilizada inicialmente era de 0,45  $\mu\text{m}$  sendo substituída para 0,22  $\mu\text{m}$ , pois ao se testar o papel com esta porosidade, verificou-se maior captação de células, comparativamente ao papel de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$ . Além disso, optou-se por transferir o material do papel para a lâmina, estabelecendo-se cinco contatos deste ao longo da lâmina com o tempo de um segundo em cada contato. Com isso, houve melhora na quantidade de material disposto sobre a lâmina, favorecendo também a leitura das mesmas.

Idealizou-se, inicialmente, que após a colheita, aguardar-se-ia o tempo para secagem do material sobre as lâminas e estas, então, seriam imersas em álcool etílico 92,8% durante um minuto, retiradas e alocadas em caixa próprias até sua coloração. Entretanto, observou-se que, seguindo este método, a dessecação do material prejudicou a qualidade da coloração (figuras 1A). Para obtenção de lâminas de boa qualidade, utilizando-se a coloração Papanicolaou, preconiza-se que a fixação imediata em álcool seja de, no mínimo, 15 minutos e, ainda, que as lâminas sejam mergulhadas novamente em álcool antes de se proceder a coloração (5, 26, 27). Assim, optou-se por mantê-las imersas no álcool até o momento da coloração e constatou-se considerável melhora na qualidade da coloração das lâminas (figura 1B).

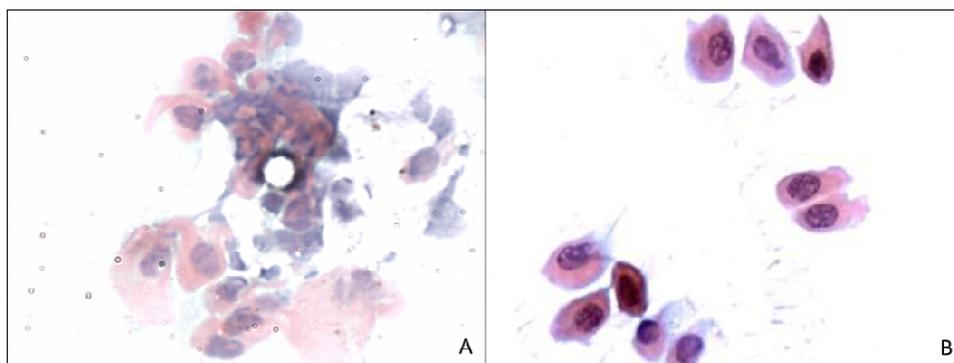


Figura 1. Fotomicrografias de células conjuntivais de cão colhidas por meio de abrasão com escova. Em A, fixação em álcool 92,8%; durante um minuto (Papanicolaou, 400X). Em B, fixação em álcool 92,8%, até o momento da coloração (Papanicolaou, 400X).

Quando do uso de colorações do tipo Romanowsky, como o Panótico rápido, a fixação, normalmente, é feita pela secagem ao ar livre e a coloração realizada em seguida (5, 24, 26). Entretanto, quando o material é fixado em álcool, a coloração Panótico propicia excelentes detalhes citológicos (26), como verificado neste estudo. Portanto, na impossibilidade de proceder-se com a coloração Panótico, imediatamente após a colheita, a permanência das lâminas em álcool pode ser indicada, mantendo-se bons resultados.

Não há como questionar a praticidade e a rapidez, bem como o baixo custo da coloração Panótico rápido, que fazem com que esta técnica seja a mais utilizada em medicina veterinária (10, 24, 26). Todavia, em humanos, a coloração Papanicolaou é bastante empregada, principalmente, em citologias esfoliativas, em que o campo celular muitas vezes é pobre e os detalhes nucleares importantes (26). Assim, apesar de propiciar a evidenciação de alterações nucleares em células neoplásicas (5, 24), por exemplo, outros organismos e detalhes citoplasmáticos não são bem evidenciados (24). Além disso, as 13 etapas do seu processamento que, neste estudo, duraram em média 30 minutos, comparativamente às três

etapas da coloração Panótico rápido, que duraram menos de um minuto, não a tornam prática para o uso clínico rotineiro (24).

Comparando-se as colorações, foi possível verificar que ambas permitiram a leitura e identificação das diferentes células. A coloração Panótico apresentou maior rapidez e facilidade em relação à confecção das lâminas, justificando seu uso na rotina de uma clínica veterinária, em que rapidez e agilidade são primordiais, além do baixo custo. A coloração Papanicolaou, embora tenha favorecido a diferenciação entre as células, o que em muitas ocasiões permitiu que a leitura da lâmina fosse mais rápida, apresenta maior custo e demora no treinamento do profissional para a confecção. Na rotina laboratorial, muitas vezes a coloração Panótico rápido acaba sendo mais utilizada (24), pelas vantagens supracitadas. Mas ressalta-se que a coloração Papanicolaou, apesar de dispendiosa e trabalhosa, fornece ao profissional maior facilidade e rapidez na diferenciação celular. Sendo assim, a familiaridade do profissional em relação à coloração, desde a deposição do material na lâmina até a sua leitura, deverá ser o fator determinante na escolha do melhor método de coloração.

Observando o GDAPr e o GDAPn (Tabela 1), nos quais as células foram colhidas pelo método de abrasão com escova, notou-se que apesar da presença de todos os tipos celulares, as células intermediárias (87,06% e 73,10%) e superficiais (6,23% e 11,56%) estiveram presentes em maior quantidade (figura 2 A, B, C e D). Observou-se, ainda, menor quantidade de células queratinizadas com núcleo, no GDAPr (1,25%), comparativamente ao GDAPn (10,65%). Tal observação pode ser atribuída ao tipo de corante utilizado no GDAPn (Papanicolaou), o qual facilitou a diferenciação celular à microscopia de luz, diminuindo, assim dúvidas advindas da constante transição morfológica sofrida pelas células, principalmente as superficiais e superficiais queratinizadas nucleadas, que podem ser confundidas facilmente.

Tabela 1. Porcentagem de células superficiais queratinizadas sem núcleo (QS/Nuc.), superficiais queratinizadas com núcleo (QC/Nuc.), superficiais (Sup.), intermediárias (Int.) e caliciformes (Calic.), verificadas nas amostras da citologia conjuntival dos cães dos Grupos GDAPr, GEIPn, GDAPn e GEIPr.

Grupos	QS/Nuc	QC/Nuc.	Sup.	Int.	Calic.	Total
<b>GDAPr</b>	5,34	1,25	6,23	87,06	0,12	100
<b>GEIPn</b>	65,10	30,45	3,78	0,67	0,00	100
<b>GDAPn</b>	4,55	10,65	11,56	73,10	0,14	100
<b>GEIPr</b>	73,40	16,75	9,22	0,63	0,00	100

Nos grupos em que a colheita foi realizada pelo método de impressão e transferência, grupo GEIPn e GEIPr, observou-se predominância de células superficiais queratinizadas com (30,45% e 16,75%) e sem núcleo (65,10% e 73,40%) e de superficiais (3,72% e 9,22%) (figura 3 A, B, C e D). As células intermediárias (0,67% e 0,63%) não apareceram em quantidade apreciável, visto que o método de colheita utilizado não esfolia o tecido, assim, somente as células mais superficiais e em processo de eliminação são apreendidas.

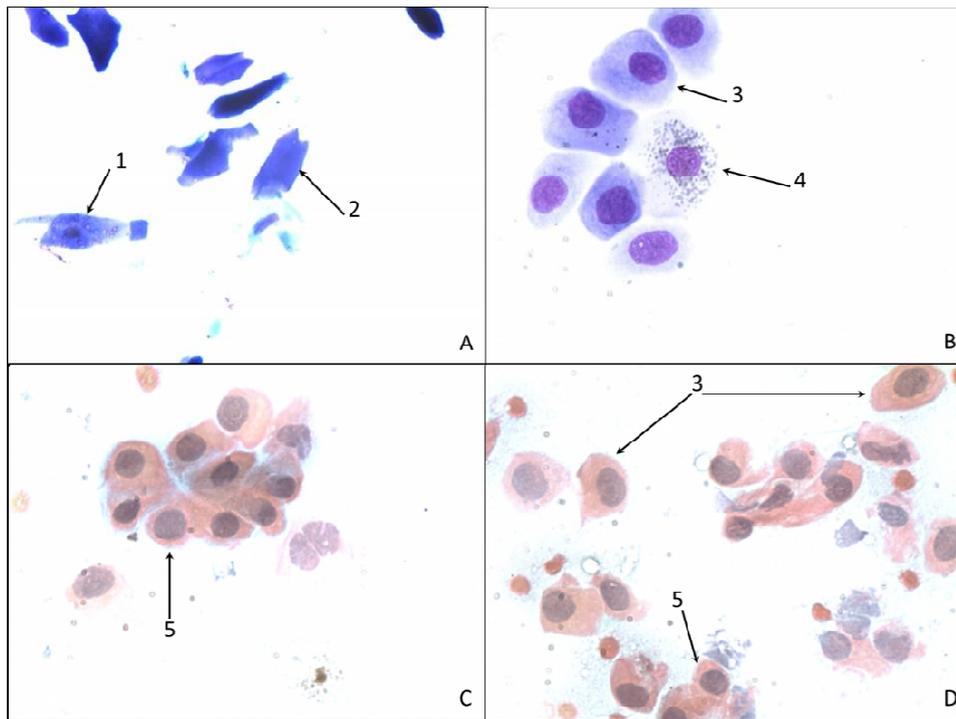


Figura 2. Notar em A (GDAPR), células queratinizadas com núcleo (1) e sem núcleo (2) (Panótico, 400x); em B (GDAPR), células superficiais (3) e uma célula caliciforme à direita (4) (Panótico, 400x); em C (GDAPn), células intermediárias (5) (Papanicolaou, 400x); em D (GDAPn), células superficiais (3) e intermediárias (5) (Papanicolaou, 400x).

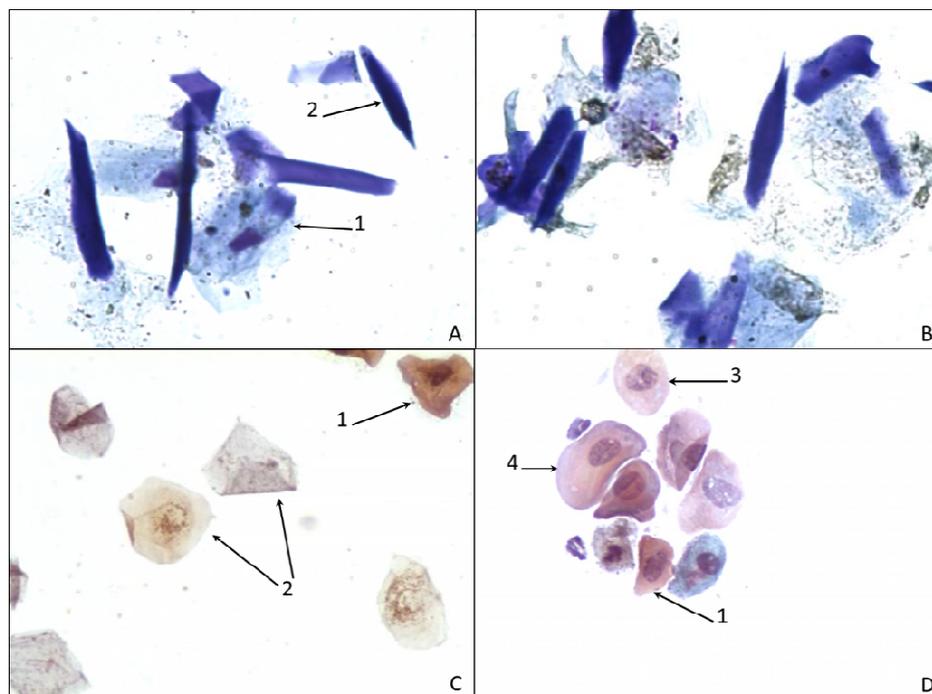


Figura 3. Notar em A (GEIPR), células superficiais queratinizadas com núcleo (1) e sem núcleo (2) (Panótico, 400x); em B (GEIPR), células queratinizadas sem núcleo (Panótico, 400x); em C (GEIPR), células superficiais queratinizadas com núcleo (1) e sem núcleo (2) (Papanicolaou, 400x); em D (GEIPR), células superficiais queratinizadas com núcleo (1), célula intermediária (3) e células superficiais (4) (Papanicolaou, 400x).

Não foram evidenciadas células inflamatórias no material recuperado por nenhum dos métodos avaliados, em consoante ao descrito por Lavach et al. (9), Murphy (5) e Willis et al.

(7), e contrariando o observado por Azevedo et al. (28), utilizando a colheita por zaragatoa e corado pelo método Panótico rápido.

Células caliciformes, embora raras (0,12% e 0,14%), puderam ser evidenciadas nos grupos GDAPr e GDAPn, respectivamente, corroborando os achados de Willis et al. (7). Como as células caliciformes são encontradas em maior concentração no fórnice inferior, entre as regiões nasal e medial (5, 29), pela abrasão por escova, o fórnice conjuntival não é alcançado e sim a conjuntiva palpebral, no canto medial e em algumas partes dos cantos nasal e temporal, justificando-se, assim, a reduzida celularidade. Da mesma forma, não foram encontradas células caliciformes com o uso da citologia por impressão, uma vez que o local designado para a colheita não representa área de concentração destas células (fórnice inferior).

Comparando-se os métodos de colheita testados, a abrasão com escova apresentou superioridade na quantidade, diversidade e morfologia, como já fora relatado por Bauer, Spiess e Lutz (12) e Yağmur et al. (13). Embora os últimos autores tenham utilizado a citologia por impressão na qual o papel de celulose é corado, concluíram que a citologia pelo método de abrasão por escova é vantajosa, pois provê maior amostra celular e de melhor qualidade morfológica.

Ainda, no método de abrasão por escova, verificou-se maior quantidade de células epiteliais de camadas distintas, entretanto, alterações morfológicas provenientes do rompimento da membrana citoplasmática e nuclear também foram observadas em pequena proporção (figura 4 A, B, C e D). Bauer, Spiess e Lutz (12), ao compararem quatro métodos de colheita, observaram que as células recuperadas por meio da escova apresentavam-se mais preservadas e melhor distribuídas sobre a lâmina, desde que fosse adotado certo cuidado ao rolar a escova sobre a lâmina. Willis et al. (7), observaram reduzida celularidade nas amostras colhidas por abrasão com escova, comparativamente às colhidas com o uso de espátula.

Apesar da maior riqueza de células observadas no método de abrasão com escova, muitas vezes estas se encontravam aglomeradas, dificultando sua contagem. Willis et al. (7) relataram em seu estudo, ao comparar as técnicas de colheita por abrasão por escova e raspagem com espátula, que em ambas as técnicas verificou-se grande diversidade celular, porém, na colheita com escova houve um menor número de células representativas das diferentes camadas e sobreposição celular.

Outra desvantagem deste método, relatada por Bauer, Spiess e Lutz (12), e observada neste estudo, foi a dificuldade na colheita do material, particularmente em animais de menor porte, com peso inferior a 15 kg, uma vez que a escova apresentava um tamanho superior ao da rima palpebral, prejudicando o acesso ao saco conjuntival. Nos demais animais, com peso médio de 20 kg e, conseqüentemente, rima palpebral maior, não houve dificuldade na colheita.

No método de impressão com transferência, não foram observadas células intermediárias em quantidade, visto que este procedimento propicia a colheita das células mais superficiais do epitélio e devido à natureza menos agressiva (13) do procedimento as alterações morfológicas foram mínimas.

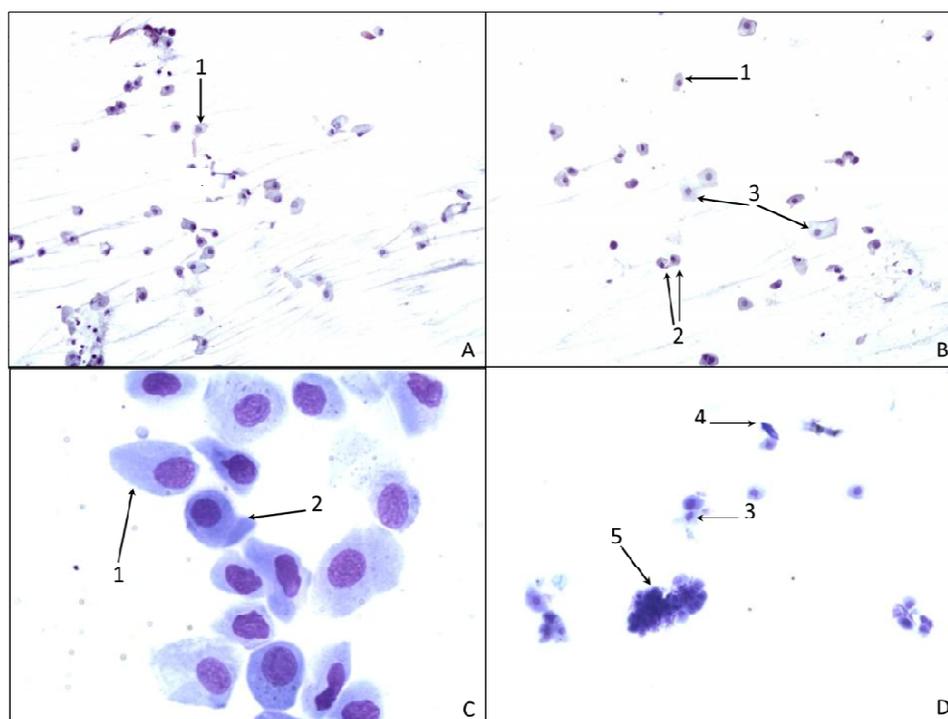


Figura 4. Notar em A (GDAPn), células superficiais (1) (Papanicolaou, 200x); em B (GDAPn), células superficiais (1), intermediárias (2) e superficiais queratinizadas com núcleo (3) (Papanicolaou, 200x); em C (GDAPR), presença de células superficiais (1) e intermediárias (2) (Panótico, 400x); em D (GDAPR), células queratinizadas com núcleo (3) e sem núcleo (4) e células aglomeradas (5) (Panótico, 200x).

## CONCLUSÕES

Em relação aos métodos de colheita, o de abrasão com escova propiciou lâminas com maior riqueza de células, a despeito de muitas vezes estas estarem aglomeradas e, em alguns casos, destruídas. O método de citologia por impressão com transferência permitiu a colheita sem utilização de anestesia tópica, porém a necessidade de papel filtro específico, encareceu o procedimento. Além disso, a transferência de material do papel à lâmina acarretou perda na avaliação celular quantitativa das amostras.

Em relação às colorações, foi possível verificar que ambas permitiram a visualização e identificação de diferentes células. A coloração Panótico apresentou maior rapidez e facilidade em relação à confecção, bem como menor custo, viabilizando seu uso na rotina de uma clínica veterinária. A coloração Papanicolaou, embora tenha favorecido a caracterização das células, o que em muitas ocasiões permite que a leitura da lâmina seja mais rápida, apresenta custo elevado e maior tempo de aprendizado do profissional para a confecção das lâminas. Entretanto poder-se-ia acrescentar sua indicação a casos mais específicos, como suspeitas de neoplasias.

## AGRADECIMENTOS

Projeto aprovado pelo CEUA, protocolo 006/09-A, em 12 de março de 2009.

**REFERÊNCIAS**

1. Hendrix DVH. Diseases and surgery of the canine conjunctiva. In: Gelatt KN. *Veterinary ophthalmology*. 3th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1999. p.619-34.
2. Walde I, Schäffer EH, Köstlin RG. *Atlas de clínica oftalmológica do cão e do gato*. 2a ed. São Paulo: Manole; 1998.
3. Samuelson DA. Ophthalmic anatomy. In: Gelatt KN. *Veterinary ophthalmology*. 3th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1999. p.31-150.
4. Slatter D. *Fundamentos de oftalmologia veterinária*. 3a ed. São Paulo: Roca; 2005.
5. Murphy JM. Exfoliative cytology examination as an aid in diagnosing ocular diseases in the dog and cat. *Semin Vet Med Surg Small Anim*. 1988;3(1):10-4.
6. Banks WJ. *Histologia veterinária aplicada*. 2a ed. São Paulo: Manole; 1992.
7. Willis M, Bounous DI, Hirsh S, Kaswan R, Stiles J, Martin C, et al. Conjunctival brush cytology: Evaluation of a new cytological collection technique in dogs and cats with a comparison to conjunctival scraping. *Vet Comp Ophthalmol*. 1997;7(2):74-81.
8. Strubbe DT, Gelatt KN. Ophthalmic examination and diagnostic procedures. In: Gelatt KN. *Veterinary ophthalmology*. 3th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1999. p.427-66.
9. Lavach JD, Thrall MA, Benjamin MM, Severin GA. Cytology of normal and inflamed conjunctivas in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*. 1977;170(7):722-7.
10. Jégou JP, Liotet S. The benefit of conjunctival scraping cytology in the biological diagnosis of conjunctivitis in the dog and cat. *Prat Med Chir Anim Comp*. 1991;26(6):567-80.
11. Brandão CVS, Minto BW, Rocha NS, Ranzani JJT. Citologia conjuntival por impressão em gatos (*Felis domestica*). *Rev Educ Contin Crmv-Sp*. 2002;5(1):41-7.
12. Bauer GA, Spiess BM, Lutz H. Exfoliative cytology of conjunctiva and cornea in domestic animals: a comparison of four collecting techniques. *Vet Comp Ophthalmol*. 1996;6(3):181-6.
13. Yağmur M, Ersöz C, Ersöz TR, Varinli S. Brush technique in ocular surface cytology. *Diagn Cytopathol*. 1997;17(2):88-91.
14. Rocha NS, Burine CHP, Lima LSA, Gonçalves RC, Thomassian A, Kamegasawa A. Uso da citologia por impressão nas doenças oculares externas no homem, bovino e equino. *Rev Educ Contin Crmv-Sp*. 2001;4(1):3-7.
15. Bolzan AA, Brunelli ATJ, Castro MB, Souza MA, Souza JL, Laus JL. Conjunctival impression cytology in dogs. *Vet Ophthalmol*. 2005;8(6):401-5.
16. Barros JN, Mascaro VLD, Gomes JAP, Freitas D, Lima ANH. Citologia de impressão da superfície ocular: técnica de exame e de coloração. *Arq Bras Oftalmol*. 2001;64(2):127-31.

17. Godoy-Esteves CAL. Padronização da citologia de impressão da superfície ocular canina. *Arch Vet Sci.* 2005;10(1):109-15.
18. Singh R, Joseph A, Umopathy T, Tint NL, Dua HS. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(12):1655-9.
19. Luzeau R, Carlier C, Ellrodt A, Amédée-Manesme O. Impression cytology with transfer: na easy method for detection of vitamin A deficiency. *Int J Vitam Nutr Res.* 1988;58(2):166-70.
20. Carlier C, Moulia-Pelat JP, Ceccon JF, Mourey MS, Fall M, N'Diaye M, et al. Prevalence of malnutrition and vitamin A deficiency in the Dioubel, Fatick, and Kaolack regions of Senegal: feasibility of the method of impression cytology with transfer. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(1):66-9.
21. Carlier C, Moulia-Pelat JP, Ceccon JF, Mourey MS, Malvy D, Fall M, et al. Prevalence of malnutrition and vitamin A deficiency in the Diourbel, Fatick, and Kaolack regions of Senegal: a controlled study. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(1):74-7.
22. Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH. *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat.* 2nd ed. St. Louis: Mosby Inc.; 1999.
23. Raskin RE, Meyer DJ. *Atlas de citologia de cães e gatos.* São Paulo: Roca; 2003.
24. Meinkoth JH, Cowell RL, Tyler RD, Morton RJ. Coleta e preparo de amostras. In: Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH, DeNicola DB. *Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos.* São Paulo: MedVet; 2009. p.1-19.
25. Association for Research in Vision and Ophthalmology. ARVO. Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research. 2007 [cited 2007 Apr 10]. Available from: [http://www.arvo.org/Policies/Statement\\_for\\_the\\_Use\\_of\\_Animals\\_in\\_Ophthalmic\\_and\\_Visual\\_Research/](http://www.arvo.org/Policies/Statement_for_the_Use_of_Animals_in_Ophthalmic_and_Visual_Research/)
26. Jörundsson E, Lumsden JH, Jacobs RM. Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, papanicolaou and romanowsky stains. *Vet Clin. Pathol.* 1999;28(3):100-8.
27. Gompel C, Koss LG. *Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas.* São Paulo: Manole; 1997.
28. Azevedo GM, Souza AP, Portela RA, Dantas ES, Silva RMN, Evêncio Neto J. Avaliação citológica da conjuntiva de cães clinicamente sadios pelo método panótico. *Rev Cient Med Vet - Medvep.* 2009;7(23):473-7.
29. Moore CP, Wilsman NJ, Nordheim EV, Majors LJ, Collier LL. Density and distribution of canine conjunctival globet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28(12):1925-32.

**Recebido em: 16/02/12**

**Aceito em: 25/06/12**