LEDA DAS NEVES ALMEIDA SANDRIN

**Características clínicas e imunológicas de pacientes com
ceratocone e alergia ocular: um estudo transversal com ênfase
na análise da inflamação da superfície ocular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências (Versão corrigida.
Resolução CoPGr 6081/11, de 1 de novembro
de 2011. A versão original está disponível na
Biblioteca da FMUSP)

Programa de Oftalmologia

Orientadora: Profa. Dra. Ruth Miyuki Santo

**SÃO PAULO
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sandrin, Leda das Neves Almeida

Características clínicas e imunológicas de pacientes com ceratocone e alergia ocular: um estudo transversal com ênfase na análise da inflamação da superfície ocular / Leda das Neves Almeida Sandrin. - São Paulo, 2016.

Tese(doutorado) -Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oftalmologia.

Orientadora: Ruth Miyuki Santo.

Descritores: 1.Ceratocone 2.Córnea 3.Hipersensibilidade 4.Citocinas
5.Lágrimas 6.Mediadores da inflamação 7.Olho/imunologia 8.Estudos
transversais

USP/FM/DBD-360/16

Dedicatória

Aos meus pais, *Léa e João Maurício*,
pelo suporte e amor incondicionais durante toda a minha vida.

Ao meu companheiro *Luciano* e filhos *Luíza, Estela, Bruno e Davi*, com quem dividi
ensinamentos e muito aprendizado e, sem os quais ,
nada seria possível,
pelo apoio, estímulo e confiança.

Agradecimentos

À Professora Doutora **Ruth Miyuki Santo**, ilustre professora do departamento de oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela preciosa orientação, compartilhamento de conhecimento, paciência e amizade.

À Professora Doutora **Joyce Hisae Yamamoto Takiuti**, ilustre professora do departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela imensa contribuição na discussão e delicadeza nas críticas sempre construtivas durante todo o processo evolutivo deste estudo.

Ao Professor Doutor **Mário Luiz Ribeiro**, coordenador ilustre do curso de pós-graduação de Oftalmologia da Universidade de São Paulo, pela inestimável oportunidade em participar deste excelente programa.

Ao Professor Doutor **Fábio Fernandes Morato Castro**, ilustre professor e vice coordenador do programa de pós-graduação de Alergia e Imunopatologia da Universidade de São Paulo, pela confiança e disponibilidade nas discussões e críticas durante processo evolutivo deste estudo.

Ao Professor Doutor **Edécio Cunha Neto**, ilustre professor, chefe do laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LIM 60) e pesquisador do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas contribuições nas discussões.

À Professora Doutora **Maria Aparecida Basile**, Coordenadora da Comissão do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino das Pró-Reitorias de Pós-Graduação e Graduação da USP e FMUSP (PAE), pelo entusiasmo contagiante e pela sensibilidade no ato de educar.

À **Monique Matsuda**, bióloga pesquisadora do laboratório de investigação em Oftalmologia – LIM 33 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas orientações técnicas sobre a metodologia na coleta de lágrimas.

À **Regina Ferreira de Almeida**, digníssima secretária do departamento de pós-graduação de Oftalmologia da Universidade de São Paulo, pelo apoio, estímulo e otimismo.

Ao **Luciano Sandrin**, médico oftalmologista especialista em segmento anterior da Clínica Médica Sandrin, pelo auxílio inestimável durante todas as fases deste estudo e em especial à colaboração no exame clínico oftalmológico dos participantes.

Aos colaboradores do Laboratório de Investigação Médica de Alergia e Imunologia da Universidade de São Paulo (LIM 60).

Às colaboradoras da Clínica Médica Sandrin, pela paciência, competência e auxílio durante toda as fases de execução deste projeto.

Aos pacientes participantes deste estudo.

À **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior, pela concessão de bolsa – programa demanda social.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelies e Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista of Journals Indexed in Index Medicus.

Epígrafe

“Ninguém ignora tudo.

Ninguém sabe tudo.

Todos nós sabemos alguma coisa.

Todos nós ignoramos alguma coisa.

Por isso aprendemos sempre”

(Paulo Freire)

Sumário

	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
	LISTA DE SINAIS	
	LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS	
	LISTA DE TABELAS	
	LISTA DE FIGURAS	
	LISTA DE ANEXOS	
	RESUMO	
	ABSTRACT	
1	INTRODUÇÃO.....	01
2	OBJETIVOS.....	06
2.1	Objetivo geral.....	07
2.2	Objetivos específicos.....	07
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	08
3.1	Alergia ocular.....	09
3.2	Citocinas.....	13
3.3	Interleucina 31.....	17
3.4	Ceratocone.....	18
3.5	Metodologia Multiplex.....	20
3.6	Superfície ocular, filme lacrimal e técnicas de coleta de lágrima.....	21
3.7	Região de Chapecó.....	24
4	MÉTODOS.....	26
4.1	Aspectos éticos.....	27
4.2	Tipo de estudo.....	27
4.3	Cálculo da amostra.....	27
4.4	População.....	28
4.4.1	Critérios de inclusão.....	29
4.4.2	Critérios de exclusão.....	30
4.5	Procedimentos e técnicas.....	30
4.5.1	Questionário de alergia.....	31
4.5.2	Questionário OSDI.....	32

4.5.3	Exame clínico alergológico.....	32
4.5.4	Tomografia de córnea com sistema de Scheimpflug e captura de imagens em 3D (Pentacam HR ^R).....	33
4.5.5	Medida da osmolaridade da lágrima.....	34
4.5.6	Coleta de lágrimas.....	36
4.5.7	Exame oftalmológico.....	38
4.5.8	Dosagem de citocinas	39
4.6	Análise numérica estatística.....	40
5	RESULTADOS.....	42
6	DISCUSSÃO.....	66
7	CONCLUSÕES.....	74
8	ANEXOS.....	76
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

ANOVA	Análise de variância
AO	Alergia ocular
ARTmax	Da língua inglesa: <i>Ambrosio relational thickeness</i> , índice captado e traduzido pelo software do tomógrafo Pentacam HR Oculus ^R , que consiste no índice TP/PPI, onde TP é o ponto mais delgado da córnea (<i>thinnest point</i> , na língua inglesa) e PPImax é o índice de progressão paquimétrica máximo (<i>pachymetric progression index</i> , na língua inglesa)
BAD d	Da língua inglesa: <i>Belin-Ambrosio Enhanced Display d</i>
CA	Conjuntivite alérgica
CAP	Conjuntivite alérgica perene
CAS	Conjuntivite alérgica sazonal
CCA	Ceratoconjuntivite atópica
CCV	Ceratoconjuntivite vernal
Delta osm	Diferença absoluta na osmolaridade medida entre dois olhos
DP	Desvio padrão
ELISA	Da língua inglesa: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , teste de imunoensaio para pesquisa de antígenos
IgE	Imunoglobulina (Ig) do isotipo epsilon (E). Produzida por plasmócitos com auxílio de linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2)
IL-31RA	Parte do receptor heterodimérico da interleucina 31 tipo A
IL	Interleucina
INF	Interferon
Km	Ceratometria média medida em dioptrias (D)

LED	Da língua inglesa: <i>light emitting diode</i> , que significa diodo emissor de luz
LIM	Laboratório de Investigação Clínica
Locdel	Local mais delgado da córnea
OSDI	Da língua inglesa: <i>ocular surface disease index</i> , índice de doença de superfície ocular
Osm	Osmolaridade lacrimal
PIO	Pressão intraocular medida em mm Hg
Th-1	Linfócito T auxiliar tipo 1, do inglês <i>T helper</i>
Th-2	Linfócito T auxiliar tipo 2, do inglês <i>T helper</i>
Th-9	Linfócito T auxiliar tipo 9, do inglês <i>T helper</i>
Th-17	Linfócito T auxiliar tipo 17, do inglês <i>T helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
NK	Da língua inglesa: <i>natural killer</i> . Célula citotóxica do sistema imune inato
USP	Universidade de São Paulo

$<$	Menor que
$>$	Maior que
$/$	Dividido por
$=$	Igual
n	Número
$\pm$	Mais ou menos

°C	grau Celsius
D	dioptria
mmHg	milímetros de mercúrio
mOsmol/L	miliosmolar por litro
ng/mL	nanograma por mililitro
pg/mL	picograma por mililitro
µm	micrômetro
µL	microlitro

Figura 1	Figura das principais atividades e funções das citocinas estudadas.....	16
Figura 2	Mapa demonstrativo da distribuição dos pacientes por município.....	29
Figura 3	Técnica de dosagem de osmolaridade de lágrima.....	35
Figura 4	Técnica de coleta de lágrimas.....	37

Tabela 1	Distribuição dos pacientes do estudo	44
Tabela 2	Comparações entre os grupos por idade.....	45
Tabela 3	Comparação da dosagem das citocinas entre os grupos.....	47
Tabela 4	Pesquisa da diferença no valor da interleucina 5 entre os grupos sem ajuste para idade.....	48
Tabela 5	Comparação da diferença média das citocinas entre os grupos.....	49
Tabela 6	Comparação dos parâmetros clínicos encontrados nos grupos estudados.....	50
Tabela 7	Comparações das diferentes variáveis clínicas entre os grupos	53
Tabela 8	Dosagem das citocinas nos pacientes com ceratocone e nos diferentes subtipos de alergia ocular.....	55
Tabela 9	Comparação das medidas de citocinas nos subgrupos de ceratocone.....	56
Tabela 10	Comparação das medidas das citocinas no grupo controle em períodos de coleta diferentes.....	58
Tabela 11	Comparação das medidas das citocinas no grupo ceratocone em períodos de coleta diferentes.....	59
Tabela 12	Comparação das medidas das citocinas no grupo conjuntivite alérgica em períodos de coleta diferentes.....	60
Tabela 13	Distribuição do grupo de estudo nos dois períodos de coleta.....	61
Tabela 14	Correlação dos achados clínicos com a dosagem das	

citocinas	no	grupo	62
controle.....			

Tabela 15	Correlação dos achados clínicos com a dosagem das citocinas	no	grupo	com	alergia	
	ocular.....					63

Tabela 16	Correlação dos achados clínicos com a dosagem das citocinas	no	grupo	com		64
	ceratocone.....					

Tabela 17	Correlação da osmolaridade da lágrima com sintomas de doença da superfície ocular (OSDI).....					65
------------------	---	--	--	--	--	----

Anexo A	Aprovação do comitê de ética em pesquisa.....	77
Anexo B	Carta de autorização do diretor técnico da Clínica Sandrin.....	78
Anexo C	Termo de consentimento livre e esclarecido.....	79
Anexo D	Questionário para alergia ocular.....	89
Anexo E	Questionário de sintomas de doença ocular (OSDI).....	91
Anexo F	Ficha do paciente avaliação com alergista.....	93
Anexo G	Ficha do paciente – avaliação com oftalmologista.....	94

Sandrin LNA. *Características clínicas e imunológicas de pacientes com ceratocone e alergia ocular: um estudo transversal com ênfase na análise da inflamação da superfície ocular* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Objetivo: Comparar as características inflamatórias da superfície ocular de pacientes com ceratocone (CE) às de pacientes com alergia ocular (AO).

Métodos: Realizou-se um estudo transversal, envolvendo 134 participantes, divididos em três grupos: alergia ocular (AO)(n=55), ceratocone com ou sem alergia ocular associada (CE) (n=61) e controle (CO) (n=18). Os participantes do estudo foram recrutados e avaliados em clínica privada na cidade de Chapecó-SC, no período de polinização, em dezembro de 2013 e de outubro de 2014 a janeiro de 2015. Para análise dos grupos, todos os pacientes foram avaliados clinicamente por especialistas em alergia e oftalmologia e submetidos a exame de tomografia de córnea com tecnologia de Scheimpflug (Pentacam HR^R), medida da osmolaridade da lágrima por impedanciometria (TearLab^R) em ambos os olhos e preenchimento de questionários padronizados para alergia ocular (QA) e para doença de superfície ocular (OSDI). Em 107 de 134 pacientes (CE=50, AO=42, CO=15) foram dosadas as citocinas IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-31, IL-33, IL-17 A, IL-23, TNF-alfa, TNF-beta e INF-gama na lágrima, por meio de tecnologia multiplex com *beads* magnéticas. A coleta das amostras de lágrimas (5 microlitros no mínimo) foi realizada por meio de aspiração no menisco lacrimal temporal inferior, com capilares de vidro em um único olho. As amostras foram congeladas imediatamente após coleta e mantidas a -80 °C, até o momento da dosagem e análise em agosto de 2016.

Resultados: Constatou-se alta prevalência de alergia no grupo com ceratocone 68,85% (42/61), sendo que 42,62% (26/61) dos pacientes desse grupo apresentaram alergia ocular. A intensidade do prurido ocular foi maior nos pacientes AO e no grupo CE, do que no grupo controle ($p<0,001$ e $p=0,047$) e maior no grupo AO do que no CE ($p<0,001$). As citocinas INF-gama, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-31, TNF-beta foram estatisticamente mais elevadas no grupo AO, quando comparadas ao grupo CE. No grupo controle, houve correlação direta da diferença absoluta da osmolaridade (delta osmol) com o nível encontrado para todas as citocinas dosadas. Observou-se, ainda, correlação direta entre níveis de IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa com OSDI ($p=0,044$, $p=0,010$ e $p=0,047$) no grupo CE. A osmolaridade foi maior no grupo CE, quando comparado ao AO ($p=0,043$).

Conclusões: Pacientes com ceratocone apresentaram alterações inflamatórias na superfície ocular, tais como: correlação direta do índice OSDI com IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa na lágrima; intensidade de prurido mais elevada que no grupo controle e osmolaridade maior que no grupo com AO. No grupo AO, observou-se índices OSDI maiores que no grupo controle e aumento de várias citocinas dosadas, quando comparadas ao grupo CE. Nos pacientes controle, a instabilidade no filme lacrimal (delta osmol), correlacionou-se diretamente com a inflamação ocular (citocinas dosadas). Observou-se alta prevalência de formas leves de alergia ocular no grupo CE (40,98%) e apenas um caso de alergia ocular grave (ceratoconjuntivite atópica [1,3%]), esses dados estão em desacordo com a maior parte da literatura disponível sobre o assunto. Em conjunto, os achados

do presente estudo podem estar relacionados a características específicas da região estudada.

Descritores: ceratocone; córnea; hipersensibilidade; citocinas; lágrimas; mediadores da inflamação; olho/imunologia.

Abstract

Sandrin LNA. *Clinical and immunological characteristics of patients with keratoconus and ocular allergy: a cross sectional study with emphasis on the analysis of ocular surface inflammation* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Purpose: To compare the inflammatory profile of the ocular surface of patients with keratoconus with that of patients with ocular allergy. **Methods:** A cross sectional study was carried out and involved 134 participants, divided into three groups: ocular allergy group (OA) (N=55), keratoconus with or without ocular allergy (KC) (N=61) and a control group (CO) (N=18). The study participants were recruited and evaluated in a private clinic in the city of Chapecó-SC, during the pollination period in 2013 (December) and from 2014 to 2015 (October to January). In order to analyze the three groups, all patients were evaluated clinically by allergy and ophthalmology specialists, submitted to a corneal tomography exam with Scheimpflug technology (Pentacam HR^R), to impedanciometry to assess tear osmolarity (Tear Lab^R) of both eyes and to standardized questionnaire rates for ocular allergy (AQ) and for ocular surface disease index (OSDI). Cytokines (IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-31, IL-33, IL-17 A, IL-23, TNF-alfa, TNF-beta and INF-gama) levels were assessed in 107 out of 134 patients using multiplex technology with magnetic beads. Tear collection of at least 5 microliters was carried out on a single eye by suction in the inferior temporal lacrimal meniscus with glass capillaries. The samples were frozen at -80°C, immediately after collection to the time of dosing and analysis in August 2016. **Results:** The prevalence of allergy in the keratoconus group was 68.85% (42/61), within the same group 42.62% (26/61) of the patients had ocular allergy. Ocular pruritus intensity was higher in the OA group and in the KC group than in the control group ($p<0,001$ e $p=0,047$), and higher in the OA group than in the KC group ($p<0,001$). Cytokines INF-gama, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-31, TNF-beta were statically higher in the OA group in comparision to the KC group. In the control group, there was a positive correlation of the difference measurement of osmolarity (osmol delta) between the eyes with all cytokines dosed. In the KC group, IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa correlated positively with OSDI ($p=0,044$, $p=0,010$ e $p=0,047$). Tear osmolarity was higher in the KC group than in the OA group ($p=0,043$). **Conclusions:** Patients with keratoconus had inflammatory changes in the ocular surface, such as: direct correlation between OSDI and tear IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha levels; higher pruritus intensity than the control group and higher osmolarity than the OA group. In the OA group, OSDI levels were higher than in the control group and some cytokines had higher levels than the KC group. In the control patients, tear film instability (delta osmol) was direct correlated to ocular inflammation (dosed cytokines). In the KC group, there was a high prevalence of mild forms of ocular allergy (40.98%) and only one case of severe ocular allergy (atopic keratoconjunctivitis [1.3%]). However, most studies avaiable have associated keratoconus with severe forms of ocular allergy. Together, these findings may be related to specific characteristics of the region of study.

Descriptors: keratoconus; cornea; hypersensitivity; cytokines; tears; inflammation mediators; eye/immunology

1. Introdução

O ceratocone é uma distrofia ectásica da córnea, geralmente bilateral e evolutiva, caracterizada por afinamento e abaulamento do estroma corneano, com consequente protrusão apical¹. Essas alterações estruturais da córnea, levam à miopia e ao astigmatismo irregular, com consequente diminuição da visão causando significativo impacto na qualidade de vida desses doentes².

A prevalência do ceratocone varia entre diversos estudos de 54,5 a 2300 a cada 100.000 pessoas, dependendo da população avaliada³⁻⁶. Porém, devido à insatisfação na qualidade visual, muitos desses pacientes procuram o oftalmologista para cirurgias refrativas e, desse modo, a prevalência nesses consultórios é elevada, variando de 1 a 6%⁷⁻⁹.

Embora classicamente descrita como doença não inflamatória, vários estudos têm sugerido a possibilidade da participação da inflamação no mecanismo etiopatogênico do ceratocone^{10,11}. Sendo assim, aumento nos níveis das citocinas IL-6, IL-12, IL-4 e TNF-alfa e metaloproteinases 9 e 13, na superfície ocular desses pacientes, têm sido descritos^{12, 13}. Outrossim, recente estudo foi capaz de demonstrar controle da evolução do ceratocone, com o uso de ciclosporina tópica e diminuição na atividade da metaloproteinase 9¹⁴.

Por outro lado, estudos epidemiológicos sobre ceratocone demonstram elevada frequência de atopia nesses pacientes⁴. Ademais, nos casos de conjuntivites graves, como a ceratoconjuntivite vernal, observa-se o

desenvolvimento dessa ectasia com quadros evolutivos acelerados e de instalação precoce^{15, 16}

A alergia ocular, cujo principal sintoma é o prurido, tem alta prevalência (20%)¹⁷ e pode se manifestar de forma leve como na conjuntivite alérgica perene (CAP) e na conjuntivite alérgica sazonal (CAS) ou de forma mais grave como na ceratoconjuntivite atópica (CCA) e na ceratoconjuntivite vernal (CCV), sendo que estas últimas cursam com processo inflamatório mais intenso e consequente remodelamento da superfície ocular, sendo frequente o aparecimento de ceratites e úlceras de córnea¹⁸. Achados de aumento de citocinas na lágrima, como IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-1, eotaxinas e metaloproteinase 9 têm sido descritos^{15, 19}

O prurido é um sintoma cardinal na alergia ocular e há forte associação com casos de ceratocone²⁰⁻²². O prurido ocular, pode ser analisado sob duas perspectivas: ser fator causal para liberação de citocinas pelo trauma, ou ser sintoma decorrente da liberação de citocinas devido à presença de inflamação tecidual, como ocorre nas conjuntivites alérgicas. Independentemente do mecanismo, é possível afirmar que o trauma causado pelo prurido ocular pode desestabilizar a arquitetura do estroma corneano e/ou também levar à inflamação, através da liberação de citocinas devido ao dano epitelial. Sendo que foi reportada liberação de IL-6, TNF-alfa e metaloproteinase 13 na lágrima de pessoas saudáveis após coçarem os olhos¹².

Dessa forma, constata-se que o dano epitelial causado na superfície ocular devido ao prurido crônico, desencadeia um processo inflamatório

mediado pela liberação de algumas moléculas do sistema imune inato. Nesse caso, salienta-se a IL-1 beta, cuja ação sobre a apoptose de ceratócitos está bem estabelecida e a IL-33, cujo papel lesivo sobre proteínas estruturais como a filagrina, têm sido descritos^{23, 24}

A IL-33 (também conhecida por Alarmina) é secretada por diversas células, inclusive células epiteliais, mediante estímulos como trauma e/ou morte celular²³. A liberação desta citocina está associada à ativação de células Th-2 e Th-17 com consequente produção de IL-31 e IL-17A, respectivamente²⁵. A manifestação do prurido decorrente da ação da IL-31 na dermatite atópica²⁶ e a ação da IL-17A nos casos de atopia, têm sido descritas²⁷.

A cidade de Chapecó, localiza-se na região sul do Brasil, local onde foram recrutados os participantes deste estudo; fica no sudoeste de Santa Catarina, a uma altitude de 670 metros. Essa região está localizada no planalto meridional brasileiro e apresenta clima subtropical. Com uma população aproximada de 200.000 habitantes, fornece prestação de serviços para os municípios vizinhos. A principal atividade econômica desta região, fundamenta-se no setor primário, em especial minifúndios de suinocultura, avicultura e bovinocultura²⁸. Sendo assim, especializou-se no manejo das pastagens, o que levou a um expressivo incremento no cultivo de gramíneas^{29, 30}. As gramíneas, cultivadas de forma intensiva na região, constituem-se principalmente de *Lolium multiflorum* (azevém), da família *pooideae*. Os polens de azevém estão entre os principais alérgenos sazonais associados a quadros de rinite e à conjuntivite alérgica (polinose) no sul do Brasil^{31, 32}.

Considerando-se os dados acima, este estudo procurou estudar a presença de perfil inflamatório na superfície ocular dos pacientes com ceratocone e com alergia ocular na região sul do Brasil.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar e comparar pacientes com ceratocone e com alergia ocular.

2.2. Objetivos específicos

1. Descrever as características clínicas dos pacientes com alergia ocular (AO) e ceratocone da região de Chapecó;
2. Caracterizar e comparar o perfil de citocinas encontradas na lágrima dos pacientes com AO, ceratocone e grupo controle;
3. Caracterizar e comparar os sintomas e sinais clínicos indicativos de inflamação ocular nos grupos AO, ceratocone e grupo controle;
4. Correlacionar os achados clínicos de sinais e sintomas oculares entre os grupos;
5. Pesquisar e comparar o perfil de citocinas entre os pacientes com ceratocone e AO e ceratocone sem AO;
6. Comparar o valor da dosagem das citocinas entre os diferentes subtipos de alergia ocular;
7. Correlacionar intensidade do prurido com presença de IL-31.

3. Revisão de Literatura

3.1 Alergia ocular

Alergia ocular (AO) é um grupo heterogêneo de doenças alérgicas da superfície ocular (conjuntivites alérgicas perene e sazonal, ceratoconjuntivites atópica e vernal, blefaroconjuntivite de contato e conjuntivite papilar gigante), cujo principal sintoma é o prurido. A prevalência é alta (20%)^{33, 34}, e as conjuntivites alérgicas leves, são responsáveis por aproximadamente 98% dos casos. Entretanto, observa-se que em casos graves frequentemente o oftalmologista é procurado, explicando em parte, a alta prevalência dessas em alguns estudos^{35,19,36}.

As formas leves são caracterizadas por conjuntivite alérgica perene (CAP) e conjuntivite alérgica sazonal (CAS) e são frequentemente associadas a outras doenças alérgicas sistêmicas, como: a rinite alérgica, a asma e a dermatite atópica. A forma perene, está associada a alérgenos ambientais como ácaros, barata, epitélios de animais e fungos; e a forma sazonal está associada à sensibilização a alérgenos sazonais, sendo no Brasil mais frequente na região sul e no período de agosto a janeiro³⁷. Os principais sintomas da AO, são o prurido ocular, hiperemia conjuntival, lacrimejamento e edema conjuntival e/ou quemose, podendo raramente ocorrer ulcerações corneanas devido ao prurido contínuo. Casos de CAP podem experimentar piora sazonal (CAS)¹⁸.

As formas crônicas, ceratoconjuntive vernal (CCV) e ceratoconjuntite atópica (CCA), podem ou não estar associadas à hipersensibilidade do tipo I e à produção de IgE específica. Entretanto, o processo inflamatório decorrente

da ativação e infiltração de eosinófilos, linfócitos, mastócitos e neutrófilos, devido à hipersensibilidade do tipo IV, sempre ocorrem ¹⁸.

A CCA acomete em geral adultos da terceira à quarta décadas de vida, com dermatite atópica. Casos avançados de CCA, cursam com fibrose subepitelial, simbléfaro, papilas, ulcerações corneanas, neovascularização, diminuição de células caliciformes e ocasionalmente catarata. Os principais sintomas incluem prurido intenso, fotofobia, sensação de queimação e de corpo estranho. Em exame clínico, os principais achados são papilas no tarso superior e inferior, injeção e edema conjuntival, dermatite atópica nas pálpebras, erosões corneanas puntatas e úlcera em escudo¹⁸.

A CCV ocorre na primeira e segunda décadas de vida, sendo predominante em meninos (3/1) e geralmente desaparece na fase adulta¹⁸. Pode estar associada ou não à atopia. Apresenta duas formas principais: a forma límbica, com nódulos de *Horner Trantas* (nódulos perilimbais constituídos por acúmulos de eosinófilos e células epiteliais degeneradas) e limbo gelatinoso; e a forma tarsal, com papilas tarsais, sendo que as duas formas podem coexistir. Os principais sintomas são prurido, fotofobia, secreção mucosa, hiperemia conjuntival e dor, associada a lesões corneanas decorrentes da resposta inflamatória gerada pelos mecanismos da hipersensibilidade do tipo I e IV e, portanto, da ativação do subtipo de linfócitos Th-2, mastócitos e eosinófilos^{19, 38}. A ativação de subtipos linfocitários Th-1 na CCA foi descrita³³.

Os alérgenos ambientais, em indivíduos geneticamente predispostos, causam a diferenciação dos linfócitos Th-0 em Th-2, produtores de IL-4, IL-5 e

IL-13, que são IL responsáveis pela ativação e transformação de linfócitos B em plasmócitos produtores de IgE. Uma vez produzida, a IgE específica circula e liga-se a receptores de alta afinidade presentes na membrana dos mastócitos da superfície ocular, tornando-os sensibilizados³⁸.

Na reexposição antigênica, os mastócitos sensibilizados degranulam em decorrência da desestabilização da membrana causada pelo *crosslinking* de IgE, liberando mediadores pré-formados como histamina e triptase que após ligação aos seus receptores, causam clinicamente os sintomas do prurido, edema e hiperemia. Esta é uma resposta que ocorre rapidamente após a exposição ao alérgeno e dura cerca de 30 minutos. Após a liberação dos grânulos pré-formados, a ativação do metabolismo do ácido aracdônico, via fosfolipase A2 na membrana dos mastócitos, leva à produção de prostaglandinas e leucotrienos, responsáveis pela resposta tardia, 4 a 6 horas após resposta inicial, com reaparecimento de sintomas inflamatórios e infiltração de neutrófilos e eosinófilos¹⁹.

Importante lembrar que atualmente são conhecidos quatro tipos de receptores de histamina (H1, H2, H3 e H4), distribuídos em diferentes células e com funções biológicas diversas, sendo especialmente importante salientar que a ligação da histamina a receptores H4 pode ativar/modular células do sistema imune inato como células epiteliais, células NK, células apresentadoras de antígenos e eosinófilos³⁹.

IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 produzidas por linfócitos Th-2 e mastócitos ativados, presentes na superfície ocular, favorecem a maturação, migração e ativação dos eosinófilos^{40,41}. A inflamação eosinofílica causa dano tecidual

através de uma série de proteínas liberadas como proteína catiônica, proteína básica maior, peroxidase e neurotoxina que são responsáveis pelo remodelamento da superfície ocular e manutenção dos sintomas nas conjuntivites crônicas^{15, 38}. Citocinas associadas ao estímulo Th-1, como proposto para fisiopatologia da CCA, podem estar relacionadas à diminuição na função das células caliciformes e consequente alteração na superfície ocular e síndrome do olho seco observadas nestes pacientes. As formas graves de alergia (CCA, CCV), podem cursar com inflamação mediada por linfócitos, neutrófilos e eosinófilos sem aumento da IgE sérica ou de superfície ocular, caracterizando a inflamação de hipersensibilidade do tipo IV⁴². A presença de Th-17 associada à ativação de metaloproteinases, também presentes nesses casos, e liberação de IL-31 e IL-33 favorecem a manutenção do processo inflamatório e do prurido⁴³

O processo imunológico acima descrito, pode apresentar-se com intensidades variáveis, decorrentes de fatores ambientais e genéticos, envolvidos na produção de diferentes subtipos de citocinas, responsáveis pela manutenção da atividade inflamatória. Dosagem de citocinas na lágrima e análise genética de expressão proteica, em células da superfície ocular de olhos acometidos por conjuntivite alérgica, constata a diferença fenotípica nas diferentes apresentações clínicas^{44, 45}.

Nas conjuntivites alérgicas, a presença de síndrome do olho seco e ceratocone têm sido descritas, bem como tem sido observada a evolução mais precoce de ceratocone em pacientes com CCV^{4,20, 46}. Da mesma forma, o uso exagerado de aparelhos eletrônicos, tem sido implicado como fator associado

ao crescente número de pessoas com síndrome do olho seco, e por conseguinte deve ser considerado fator agravante das síndromes alérgicas^{47, 48}.

3.2 Citocinas

As citocinas são proteínas responsáveis pela comunicação intercelular. São normalmente divididas em famílias categorizadas pela similaridade na sequência da cadeia do receptor ao qual se ligam pela homologia estrutural, ou ainda pela função que exercem⁴⁹.

Desde que a primeira citocina foi descoberta em 1977, até os dias atuais, o aprofundamento no conhecimento dos mecanismos inflamatórios e seus mediadores, foi crescente e permitiu classificar e compreender os diferentes subtipos celulares do sistema imune, caracterizados pelos antígenos de superfície e pelo perfil de citocinas produzidas. Sendo assim, subtipos celulares de linfócitos T, B, células dendríticas, células linfoides e células NK têm sido descritos⁴⁹.

Os linfócitos T são divididos em T helper (CD4+) ou T citotóxico (CD8+), de acordo com o antígeno encontrado na superfície. Os linfócitos T helper (Th), podem ser classificados em Th-1, Th-2, Th-9, Th-17 e Th-22.

Para ocorrer a diferenciação do Th, o linfócito virgem (Th-0) necessita ser apresentado ao antígeno por meio de interação com células apresentadoras de antígeno e então ativá-los. A transformação de Th-0 em

outros subtipos, depende do microambiente onde ocorreu o contato, da qualidade e quantidade do antígeno, e da célula apresentadora de antígeno com seu respectivo perfil de IL⁴⁹.

Essa complexa rede, composta por células e citocinas, determina a diferenciação celular e direciona o perfil inflamatório das reações. Assim, as células Th-1, que são responsáveis por citotoxicidade e resposta a patógenos intracelulares, produzem preferencialmente IL-2 e gama-IFN e causam apoptose e morte de células epiteliais⁴⁵.

Por outro lado, células Th-2, responsáveis por respostas de hipersensibilidade tipo I, produzem IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-31 e IL-33, e atuam em conjunto com mastócitos, basófilos e eosinófilos, causando processo inflamatório associado à produção de IgE específica para alérgenos e lesão de barreira epitelial sobre as *tight junctions* e filagrina.

As células Th-17, produtoras de IL-6, IL-8, IL-17A, IL-17B, TNF, IL-22, IL-26, relacionam-se com autoimunidade e ativação de metaloproteinases, influenciando no metabolismo do colágeno. Estas células são responsáveis pela resposta imune de patógenos extracelulares e podem ativar e conectar as respostas Th-1 e Th-2, sendo frequentemente observadas no mecanismo de doenças alérgicas crônicas⁴⁹.

As células Th-22 liberam IL-22 e TGF-beta e esta, quando associada à presença de IL-4, favorece o aparecimento de células com perfil Th-9.

O Th-9 libera principalmente IL-10 e IL-9, capazes de ativar Th-2. As células Th-9 também são responsáveis por ativar células como macrófagos,

células NK, células dendríticas, linfócitos CD8 e linfócitos gama-delta.

Outras células capazes de produzirem citocinas são as células epiteliais, os mastócitos, os basófilos e as células linfoides.

O resultado desse intrigante e complexo mecanismo de liberação de citocinas, causando respostas imunes diferentes é determinado por fatores genéticos e ambientais⁴⁹. Abaixo, segue resumo das principais atividades das citocinas dosadas (Figura 1):

CITOCINA	FONTE	ALVO	FUNÇÕES	DOENÇA ASSOCIADA
IL-1BETA	Macrófagos, linfócitos, monócitos, queratinócitos, neutrófilos, fibroblastos	Células T, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais	Indução de proteínas pró-inflamatórias, diferenciação em Th-17	Doenças inflamatórias e autoimunes
IL-2	Células CD-4 e CD-8, NK, NKT, DC	Células CD-4, CD-8, NK e B	Proliferação de células T efectoras, desenvolvimento de células T-reg, diferenciação e proliferação de células NK, fator de crescimento para linfócitos B	Doenças inflamatórias mediadas por células T
IL-4	Células Th-2, basófilos, eosinófilos, mastócitos, células NKT, células T gama/delta	Células T e B	Indução da diferenciação de Th-2, switch para IgE, aumento de MHC II em LB, Aumento de CD23 e IL-4R, fator de sobrevivência para linfócitos T e B, adesão e inflamação tecidual	Doenças inflamatórias e autoimunes como alergia, asma, diabetes melito

IL-5	Th-2, eosinófilos e mastócitos ativados, células T gama/delta, Nk e NKT, placas de Peyer	Eosinófilos, mastócitos, basófilos	Diferenciação e função de células mieloides, aumento da capacidade quimiotática e adesão de eosinófilos, remodelamento e cicatrização	Alergia/asma, síndrome hipereosinofílica
IL-6	Células endoteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos	Hepatócitos, leucócitos, linfócitos T e B, células hematopoiéticas	Síntese de produção de proteínas de fase aguda, ativação e tráfico de leucócitos, diferenciação, ativação e sobrevivência de linfócitos T, produção de IgM, IgA por linfócitos B, hematopoiese,	Doenças inflamatórias crônicas, doenças autoimunes
IL-10	T, B monócitos, macrófagos, DC	Macrófagos, monócitos, T, B, NK, mastócito, DC e granulócitos	Imunossupressão	Autoimunidade, alergia, neoplasia
IL-12	Monócitos, macrófagos, neutrófilos, microglia, DC, células B	Th-1, NK	Induz diferenciação de Th-1 e NK	
IL-13	T, NK, NKT	Células B, mastócitos, células epiteliais, eosinófilos, macrófagos e células do músculo liso	Switching para IgG4 e IgE, aumento de CD23 e MHC-2 nas células B, ativação de mastócitos, basófilos e eosinófilos, recrutamento de eosinófilos, indução de CD11b, CD11C, CD18, CD29,	Asma, rinite alérgica, fibrose
IL-15	Monócitos ativados, CD4, queratinócitos e células do músculo esquelético	T, NKT	Ativação de células T e NK, proliferação de células T, supressão de IL-2, favorecimento de diferenciação Th-2, supressão de rinite alérgica, homeostase de CD8 de memória, diferenciação gama/delta	Doenças autoimune e inflamatórias
IL-17A	Th-17, CD8, NK, neutrófilos	Células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, osteoclastos, monócitos,	Indução de citocinas e quimiocinas e metaloproteínases inflamatórias, recrutamento de	RA, asma alérgica, dermatite atópica, hipersensibilidade de contato, psoríase

		macrófagos	neutrófilos	
IL-23	Macrófagos, DC, ativados	Th-17 e macrófagos	Produção de IL-17 e promoção de células T de memória	Susceptibilidade a patógenos extracelulares, inflamação autoimune órgão específica
IL-31	Células CD4 (principalmente Th-2), células CD8	Queratinócitos, células epiteliais, monócitos, eosinófilos, basófilos	Indução de IL-6, IL-8, CXCL-8, inibição de proliferação e apoptose em células epiteliais, expressão de quimiocinas e fatores de crescimento em células epiteliais, ativação de eosinófilos	Dermatite atópica, dermatite de contato, prurido nodular, urticária crônica espontânea, eczema não atópico, asma, outras inflamações
IL-33	Células necróticas e nuócitos	Basófilos, mastócitos, eosinófilos, NK, NKT, Th-2 DC, nuócitos	Indução de inflamação Th-2	Doenças autoimunes e cardiovasculares, asma doenças de pulmão e gastrointestinal
GAMA-IFN	Macrófagos, células NK e NKT, células mielomonocíticas, Th-1, CTL, linfócitos B	Células epiteliais, macrófagos, DC, NK, linfócitos T e B	Propriedades antivirais, citotóxica, aumenta expressão de MCH I e MHC II, efeito pró-apoptótico, melhora da atividade microbicida, regulação da interação leucócito-endotélio, inibição de crescimento celular	Susceptibilidade a infecção por patógeno intracelular e desenvolvimento de tumor, diabetes tipo I
TNF-ALFA TNF-BETA	Macrófagos ativados, monócitos, linfócitos B e T, células NK, endoteliais, mastócitos	Células nucleadas	Defesa imunológica: ativação da inflamação e modulação da inflamação	Doenças inflamatórias

FONTE: Modificado de JACI, 2011⁴⁹

Figura 1- Resumo das principais atividades e funções das citocinas deste estudo

3.3 Interleucina 31

A IL-31, foi descrita pela primeira vez em 2004 e tem sido associada a doenças relacionadas à desregulação de células do sistema imune inato (eosinófilos, mastócitos) e adaptativo (linfócitos Th2)⁵⁰. Trabalhos evidenciam o aumento nos níveis de IL-31 na presença de secreção de IL-4 e IL-13 e aumento na expressão de receptores de IL-31 na presença de IFN- gama⁵⁰⁻⁵². Esses achados sugerem que a IL-31 possa conectar a atividade de linfócitos Th1 e Th2⁵¹. Células como mastócitos, macrófagos, queratinócitos, fibroblastos e monócitos foram implicadas na produção de IL-31 e seu receptor IL31RA⁵³. Todas essas células estão presentes na conjuntiva ocular. A expressão dos receptores da IL-31RA ocorre em várias células como eosinófilos, mastócitos, células dendríticas e células epiteliais de mucosa brônquica⁵⁴. A IL-31 diminui a apoptose de eosinófilos⁵⁰. Terminações nervosas cutâneas possuem receptores para IL-31⁵⁵. Desta forma, a presença da IL-31 é um marcador de doenças alérgicas como asma⁵⁴ e também se relaciona ao prurido em dermatite atópica e dermatite de contato alérgica⁵⁶. O uso de anti-interleucina-31 diminuiu o prurido em cobaias com lesões cutâneas compatíveis com dermatite atópica⁵². A participação da IL-31, em doenças crônicas e pruriginosas, não IgE mediadas como amiloidose, foi constatada⁵⁵. A exposição a raios UV⁵¹ e toxinas estafilocócicas aumentam a produção da IL-31⁵¹, o que poderia explicar o frequente agravamento do prurido na dermatite atópica quando associada à infecção estafilocócica secundária, mecanismo este também presente nos casos de ceratoconjuntivite atópica (CCA)⁵⁷. A IL-31 tem sido considerada um biomarcador de intensidade de alergia¹.

3.4 Ceratocone

O ceratocone é uma doença ectásica da córnea que causa miopia e astigmatismo irregular progressivos. A incidência estimada é de 1 a cada 2000 habitantes e sua prevalência varia de 54.5 a 2300 em cada 100.000 pessoas, dependendo da localização da população estudada, entretanto, em consultórios de oftalmologistas especialistas em córnea e cirurgia refrativa, a prevalência pode alcançar cifras de 1 a 6%. O diagnóstico clínico, em casos avançados, pode ser feito com exames de biomicroscopia e retinoscopia. Porém, casos iniciais costumam ser assintomáticos, sendo frequente o diagnóstico tardio^{6, 20,7}.

Com o advento de novas tecnologias na aquisição de imagens do segmento anterior do olho, por meio de tomografia com câmara de Scheimpflug^R e captura de imagens em 3D (Pentacam HR^R), o diagnóstico de casos subclínicos tornou-se possível. Este exame analisa mapas de elevação de toda a córnea, por meio de reconstrução virtual das imagens capturadas. Após a reconstrução das imagens e obtenção de dados de paquimetria, ceratometria anterior e posterior e índice de progressão paquimétrica de toda a córnea, o sistema analisa e compara essas medidas com um banco de dados de pacientes normais, fornecendo índices muito sensíveis na detecção precoce da ectasia⁵⁸.

Ainda que o diagnóstico da enfermidade tenha avançado significativamente, a etiologia e fisiopatologia permanecem controversas. Existem relatos de casos de ceratocone na mesma família e estudos de alterações genéticas associadas ao ceratocone^{59,60}. Estudos recentes têm apontado para presença e atuação do processo inflamatório no ceratocone, demonstrando alterações no perfil de citocinas presentes na lágrima desses, como aumento de IL-6 e metaloproteinase 9^{10,61, 62}. Outros trabalhos associam a presença de atopia e do prurido ocular crônico a fatores predisponentes para o aparecimento da doença^{63, 64}. A associação entre atopia e ceratocone, observada em estudos epidemiológicos longitudinais, são controversas, entretanto a prevalência do prurido ocular associado ao ceratocone tem sido descrita como elevada e relevante em praticamente todos os trabalhos^{4,65,64}.

Os estudos de imunobiologia da córnea têm demonstrado que traumatismo no epitélio corneano causam o aumento na produção de interleucina1 beta (IL-1 beta) com consequente apoptose de ceratócitos⁶⁶. Estudos anatomopatológicos de córneas com ceratocone confirmam a presença da apoptose dos ceratócitos, juntamente com o afinamento do estroma central e lesões na camada de *Bowman*⁶⁷; outros confirmam a presença de polimorfismo de IL-1 beta em pacientes com ceratocone⁵⁹. Esses achados, em conjunto, confirmam o mecanismo inflamatório desencadeado pelo prurido.

Relatos de casos recorrentes na mesma família, favorecem a teoria de causa genética, embora nenhum estudo tenha sido capaz de identificar um único gene marcador para essa ectasia^{59, 60, 68}

3.5 Metodologia Multiplex

A metodologia multiplex com esferas magnéticas para pesquisa e quantificação de um antígeno, é baseada na técnica do teste imunoenzimático (ELISA) em sanduíche associada à citometria de fluxo⁶⁹.

A vantagem dessa tecnologia é a possibilidade de pesquisar diversos antígenos simultaneamente em uma única e pequena amostra (25 µl). Sendo assim, esferas magnéticas que são fabricadas com fluoróforos internos servem de substrato para captação de antígeno⁷⁰. Em cada esfera, é colocado um anticorpo específico para o antígeno a ser pesquisado. Após incubação das esferas com o antígeno (amostra em questão), é colocado um anticorpo ligado a outro fluoróforo, capaz de emitir luz quando estimulado com laser ou LED. Portanto, torna-se possível colocar vários grupos de esferas associados a diferentes antígenos em um único ensaio. Desse modo, a fluorescência interna da esfera é capaz de detectar o tipo de antígeno pesquisado e a intensidade de emissão de fluorescência calcula a quantidade do antígeno pesquisado⁷¹. Esta é uma técnica promissora para detecção de vários antígenos em pequenas amostras⁷⁰.

3.6 Superfície ocular, filme lacrimal e técnicas de coleta de lágrima

A superfície ocular é estruturalmente composta pela conjuntiva bulbar e tarsal, córnea, filme lacrimal, glândulas lacrimais acessórias e principal. Esta complexa estrutura é responsável pela nutrição, imunidade e proteção mecânica, da interface ocular com o meio ambiente. Contribui para uniformização e hidratação da superfície epitelial corneana, auxiliando na refração⁷².

Do ponto de vista imunológico, deve-se apontar para a importância no equilíbrio da resposta imune, a qual deve ser eficaz e minimamente destrutiva, na superfície ocular para manutenção da homeostase. Esta é uma característica da resposta imune das mucosas e, portanto, similar a outras interfaces mucosas do corpo humano. Sendo assim, sob condições normais, a presença de IgA secretória, células linfóides e células dendríticas favorecem um predomínio de resposta imune humoral e pouco citotóxica⁷².

A homeostase na superfície ocular depende de componentes da imunidade inata como o lacrimejamento reflexo, o escoamento da lágrima, a presença de lisozimas e lactoferrina, IgA de mucosa, produção local de mucinas, produção de lipídeos e manutenção do filme lacrimal. Qualquer alteração funcional nessas, pode favorecer ao aparecimento de sintomas e sinais inflamatórios com consequente alteração da qualidade visual.

A lágrima, líquido transparente e isotônico que banha toda a superfície ocular, é composta principalmente por água. Está disposta em fases, sendo mais lipídica na fase externa o que diminui a taxa de evaporação aquosa. Na fase intermediária, existe um componente aquoso mais expressivo, associado a mucinas livres e várias moléculas como citocinas, interleucinas e hormônios,

e a parte mais interna é composta principalmente por gel de glicocálix mucinoso. A produção deste complexo fluido depende do funcionamento adequado da unidade funcional lacrimal, composta pelas glândulas lacrimais, pálpebras, nervos sensoriais, nervos motores e superfície ocular, células caliciformes e glândulas de *Meibomius*⁷³.

A lágrima é produzida em fluxo contínuo de aproximadamente 1uL/min, podendo alcançar níveis de 16uL/min nos casos de irritação ocular e consequente lacrimejamento reflexo. Doenças que acometem as glândulas lacrimais podem cursar com inflamação de superfície ocular decorrente da hiperosmolaridade secundária a deficiência aquosa⁷⁴.

A parte externa do filme lacrimal, chamada de porção lipídica, é constituída por ácidos graxos polares a apolares. Sua principal função é prevenir a evaporação da lágrima. Esta camada é produzida principalmente pelas glândulas de *Meibomius*. Deficiência na produção da fase lipídica lacrimal, favorece o evaporação precoce da lágrima podendo causar síndrome do olho seco evaporativo e consequente hiperosmolaridade. Doenças inflamatórias de pálpebras como dermatite atópica, rosácea, dermatite seborreica e blefarite podem comprometer o funcionamento das glândulas de *Meibomius* e alterar a qualidade do filme lacrimal⁷⁵.

A síndrome do olho seco, pode estar primariamente associada à deficiência de produção de um dos componentes da lágrima, ou ser secundária a processos inflamatórios que agredem a superfície ocular, como ocorre nos casos de alergia. Essa doença acomete cerca de 40% da população e cursa

com inflamação na superfície ocular devido à hiperosmolaridade e à secreção de interleucinas inflamatórias, como IL-6 e ativação de metaloproteinases^{69, 76}.

O interesse no estudo da composição da lágrima com a finalidade de pesquisa de biomarcadores, controle de tratamento de doenças oculares e diagnóstico fisiopatológico de doenças oculares têm aumentado⁷⁰.

Diferentes técnicas de coleta de amostras de lágrima, com finalidade diagnóstica, têm sido descritas. A exemplo da coleta direta com o auxílio de micropipetas de vidro, ou indireta com o uso de um substrato como papéis filtro ou esponjas, as quais vêm sendo empregadas em diferentes estudos. A utilização de coleta através de um substrato mostra-se mais adequada para estudos dos componentes lipídicos da lágrima. Porém, deve-se considerar que fatores como lacrimejamento e trauma, podem interferir no resultado da análise da amostra⁷⁷.

3.7 Região de Chapecó

A região de Chapecó fica localizada no oeste de Santa Catarina, sul do Brasil. Este local é caracterizado por clima subtropical úmido com altitude de 670 metros e parte de sua economia é fundamentada no agronegócio. De fato, as características geoclimáticas e a presença de minifúndios propiciaram a instalação de uma forte bacia leiteira nesta localidade, levando à necessidade de mudanças nas práticas de agricultura e implantação de pastagens de inverno. Tais adaptações nesses segmentos resultaram em áreas de

monoculturas de pastagens, algumas muito alergênicas, como é o caso do *lolium multiflorum*, conhecido popularmente como azevém.

O município de Chapecó com aproximadamente 200.000 habitantes, é o principal centro de prestação de serviços nesta região. Dessa forma, cerca de um milhão de pessoas procuram esta cidade para atendimento médico, o que lhe confere a denominação de polo regional.

Muito embora pouco estudada do ponto de vista epidemiológico quanto às doenças alérgicas, o número de pacientes com quadros devastadores de rinite e conjuntivite alérgica, chama a atenção nos períodos de agosto a janeiro. Porém, ao se considerar estudos realizados em regiões próximas, como é o caso de Caxias do Sul, pode-se inferir que a prevalência destas doenças são expressivas e provavelmente decorrentes da hipersensibilidade a gramíneas cultivadas em toda a região⁷⁸.

4. Métodos

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP em sessão realizada no dia 25/09/2013, número 384/13 e aprovado pelo diretor técnico da Clínica Médica Sandrin.(Anexo A e B)

4.2 Tipo de estudo

Este foi um estudo transversal.

4.3 Cálculo da amostra

Para cálculo da amostra, utilizou-se estudo anterior, que realizou técnica de dosagem de interleucina 6 (IL-6) na lágrima de três populações diferentes: pacientes com ceratocone, pacientes com ceratocone e crosslinking e indivíduos saudáveis, em cuja análise foi encontrada IL-6 nas dosagens de 66,7 pg/mL com desvio padrão de 8,7 no grupo controle e 13,6 pg/mL com desvio padrão de 232,2 de IL-6 no grupo ceratocone⁷⁹.

Supondo encontrar diferença de pelo menos 150 pg/mL na IL-6 entre pacientes com ceratocone e pessoas controle, diferença esta inferior à

apresentada no artigo de referência, com poder de 80% e confiança de 95%; a amostra necessária para a realização do estudo foi de 21 pacientes em cada grupo.

O cálculo foi baseado na análise de variância (ANOVA) considerando-se 3 grupos e teste bicaudal⁸⁰.

4.4 População

A população inicial deste estudo, constituiu-se de amostra de conveniência de 145 pacientes atendidos em consultório privado de alergia e oftalmologia, na cidade de Chapecó – SC, Brasil, procedentes principalmente de Chapecó e municípios vizinhos, abrangendo também o sul do Paraná e o norte do Rio Grande do Sul.

Após leitura e assinatura do termo de consentimento livre, e esclarecidos, os pacientes foram agendados para avaliação que ocorreu em dezembro de 2013, e entre outubro de 2014 a janeiro de 2015, respeitando-se, deste modo, períodos de provável dispersão de polens⁸¹.(Anexo C)

Do total dos 145 pacientes elegíveis para o estudo, onze pacientes foram excluídos (um paciente com ceratotomia radial pregressa, quatro pacientes dos quais não foi possível coletar lágrimas, e 6 pacientes que não compareceram no dia do agendamento). Desta forma, 134 participantes foram incluídos no estudo (61 pacientes com ceratocone, 55 com alergia ocular e 18 pacientes controle). Oitenta e dois pacientes foram procedentes do município de Chapecó.(Figura 2)

Figura 2– Distribuição dos pacientes do estudo quanto à procedência
(em vermelho, localização dos municípios de procedência dos pacientes)

4.4.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram: diagnóstico clínico de alergia ocular (conjuntivite alérgica sazonal, conjuntivite alérgica perene, ceratoconjuntivite atópica e ceratoconjuntivite vernal), ceratocone e grupo controle (sem queixa ou doença ocular), confirmados por dois observadores: um alergista e um oftalmologista.

4.4.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram: pacientes com diagnóstico ou suspeita de uveíte ou glaucoma, com antecedente de cirurgia intraocular ou cirurgia refrativa e pacientes em uso de colírios, lentes de contato, anti-histamínicos e corticoides sistêmicos nos últimos sete dias e corticoides de depósito nos últimos trinta dias contínuos a data do agendamento. Pacientes gestantes ou que estivessem amamentando também foram excluídas.

4.5 Procedimentos e técnicas

Os pacientes deste estudo foram submetidos a exame clínico alergológico e oftalmológico, medida de osmolaridade de lágrima com osmômetro portátil (TearLab^R), coleta de lágrimas para dosagem de IL e exame de tomografia de segmento anterior com tecnologia *Scheimpflug* e captação de imagem em 3D(Pentacam HR^R). As amostras de lágrimas foram analisadas com metodologia multiplex para dosagem de citocinas. Questionários OSDI e sobre alergia ocular foram entregues e orientados para que os pacientes, ou seus responsáveis respondessem sem a interferência do pesquisador. Todos os procedimentos foram realizados no período vespertino (das 14 às 18h).

Os participantes seguiram o fluxograma de atendimento descrito abaixo, de forma sequencial, sendo realizados todos os procedimentos no mesmo dia:

- Preenchimento de questionários de alergia e OSDI (no caso de ser menor de idade, com auxílio do responsável legal)
- Exame clínico com alergista
- Realização de tomografia com tecnologia *Scheimpflug* (Pentacam HR^R)
- Dosagem da osmolaridade da lágrima por meio de impedanciometria (Tear Lab^R)
- Coleta de lágrima
- Exame oftalmológico com medida de pressão intraocular

4.5.1 Questionário de alergia

Todos os participantes responderam, sem interferência do pesquisador, ao questionário composto de 15 perguntas, ao qual foi atribuído um índice para soma das respostas obtidas de cada paciente, para diagnóstico de alergia ocular, conforme estudo previamente publicado⁸². Nesse estudo, valor da soma igual ou maior a 10, apresentou especificidade e sensibilidade de 79,63 % e 77,08%, respectivamente, e acurácia de 85,7%. As perguntas 1, 4, 6, 7, 9 a 15 do questionário, receberam a pontuação 1; as questões 2, 3, 5 e 8 receberam a pontuação 2. Nas questões 1, 2, 3 e 8, a nota total foi atribuída quando a resposta foi sim, e zero para não. Nas questões quatro e cinco, a pontuação

total foi atribuída aos pacientes que responderam 4 a 12 ou mais de 12 perguntas.(Anexo D)

4.5.2 Questionário OSDI

Questionário para sintomas de doença de superfície ocular (OSDI - adaptado culturalmente para língua portuguesa)⁸³ foi entregue a todos os participantes para que respondessem, de forma espontânea, às perguntas que fazem parte de um questionário tipo *Likert* (sendo zero= “em nenhum momento” a quatro= “o tempo todo”) para investigação de sintomas de doença da superfície ocular. Este material é composto de 12 questões, em que é atribuído um índice de 0 a 4 para cada questão. Após a soma das doze questões, multiplica-se o valor resultante por 100, divide-se pelo número de questões respondidas multiplicado por 4; obtendo-se um índice que varia de zero a 100. Tal instrumento é utilizado para pesquisar doenças de superfície ocular no qual quanto maior o índice, maior o sintoma da superfície ocular.(Anexo E)

4.5.3 Exame clínico alergológico

Todos os participantes foram submetidos a consulta com especialista em alergia, através da qual se obteve a história clínica atual e pregressa, bem como o exame físico completo com rinoscopia anterior.

Para classificação do quadro de hipersensibilidade, utilizou-se os seguintes parâmetros:

- Critérios maiores e menores *Hanifin* e *Rajka*, para diagnóstico de dermatite atópica⁸⁴,
- Consenso brasileiro de asma 2006, para diagnóstico de gravidade de asma (baseado em sintomas e uso de medicação)⁸⁵,
- III consenso brasileiro de rinites, para diagnóstico dos sintomas de rinite alérgica⁸⁶.

A quantificação do prurido foi determinada por meio de questionário durante exame físico do paciente, escalonada de zero a quatro, na qual zero significava nunca e quatro sempre e debilitante.

Não foram realizadas medidas de pico de fluxo expiratório ou espirometria para diagnóstico de asma.(Anexo F)

4.5.4 Tomografia de córnea com sistema de Scheimpflug e captura de imagens em 3D (Pentacam HR^R)

Os participantes foram submetidos a tomografia de córnea com captura de imagem por meio de sistema de fotografia Scheimpflug e imagem 3D

(Pentacam HR^R - Oculus, Wetzlar, Germany) com Belin/Ambrosio enhanced ectasia display, em ambos os olhos. Este exame foi realizado em sala escura com pacientes adequadamente acomodados no aparelho, orientados a piscar duas a três vezes, e fixar o olho na luz azul central para aquisição das imagens. Observou-se o índice de qualidade de captura de imagem QI e o procedimento foi refeito em casos não adequados.

Para confirmação diagnóstica de ceratocone, os dados de espessura de córnea, índices de progressão paquimétrica e suas correlações obtidas do software Belin-Ambrosio *Enhanced Ectasia display* para análise de dados do Pentacam HR^R foram utilizados. Na comparação entre os grupos, utilizou-se: espessura no ápice da córnea, espessura corneana central, ceratometria média (Km) anterior e posterior, índice ARTmax, índice BAD d.

4.5.5 Medida da osmolaridade de lágrima

Aparelho portátil com chips descartáveis que coletam cerca de 0,05 µL para medir a osmolaridade por meio de impedanciometria ((TearLab^R Corp, San Diego, CA). Em ambos os olhos de todos os participantes, sempre foi utilizado anteriormente ao exame clínico oftalmológico e a coleta de lágrimas, cujo horário ficou compreendido das 14 às 18 horas, em sala climatizada com umidade controlada e temperatura que variou de 19 a 27°C. O procedimento foi realizado utilizando-se sempre a caneta 1 para o olho direito, e caneta 2 para o olho esquerdo. O aparelho foi calibrado com os chips eletrônicos, medidas de

solução controle salina e tampão foram realizados em todos os diferentes lotes de chips, conforme orientação do fabricante. Para efeito de análise estatística, considerou-se sempre a maior osmolaridade entre os dois olhos e também a diferença absoluta da medida entre os olhos (delta osmol). Os resultados foram expressos em miliosmoles por litro (mOsm/L).(Figura 2)

Em sentido horário, chip descartável para medida de osmolaridade; colocação do chip na caneta do aparelho; aparelho com as duas canetas no momento de leitura evidenciando osmolaridade e temperatura ambiente; aparelho após coleta com luz indicativa verde acesa.

Figura 2 - Técnica de dosagem de osmolaridade de lágrimas

4.5.6 Coleta de lágrimas

Amostras de lágrima foram obtidas de um único olho em cada paciente, sendo do pior olho, nos casos de ceratocone ou alergia ocular, e do olho direito nos pacientes controles. Realizou-se coletas no período vespertino (14:00 às 17:00h), processo este executado sempre pelo mesmo profissional, utilizando-se tubos capilares de vidro polido descartáveis de 10 microlitros (Drummond^R, Broomall, PA, USA). As amostras foram adquiridas de forma atraumática, para evitar lacrimejamento reflexo. O pesquisador colocou uma extremidade do capilar na região temporal do menisco lacrimal inferior, utilizando visualização direta com feixe de luz estreito e de baixa intensidade em biomicroscópio (aumento de 16 vezes), e a outra extremidade (com seringa e agulha de insulina descartável 13 X 0,45mm, Descarpac^R), foi utilizada para aspiração pela assistente, conforme as instruções fornecidas pelo pesquisador. As coletas duraram em média de 5 a dez minutos. Imediatamente, após a coleta, a lágrima foi colocada em tubos de poliestireno estéreis para PCR 0,2ml DNase e RNase livres (Axygen^R, CA, USA), sem centrifugação ou diluição. Após a coleta e identificação, as amostras foram imediatamente congeladas e conservadas a - 80 °C no LIM 60 da Faculdade de medicina da USP. (Figura 3)

Técnica de coleta de lágrimas, em sentido horário, da esquerda para direita: acoplamento de agulha e seringa de insulina no microcapilar de vidro e técnica de coleta com visualização no biomicroscópio.

Figura 4- Técnica de coleta de lágrimas

4.5.7 Exame oftalmológico

Todos os participantes foram submetidos à consulta oftalmológica, com preenchimento de história clínica atual e pregressa, na qual se realizou refração subjetiva dinâmica com medida da acuidade visual com e sem correção; biomicroscopia anterior e de fundo de olho em lâmpada de fenda, com auxílio de lentes (*Volk 90D*) e medida da pressão intraocular com tonômetro de aplanção (*Goldman*) após instilação de colírio anestésico de cloridrato de proximetacaína a 0,05% (*Anestalcon^R*, *Alergan*).

O diagnóstico e classificação da conjuntivite alérgica baseou-se em história clínica e exame físico^{87,88}. Não houve distinção para casos IgE mediados ou não, uma vez que não foi realizada a dosagem da IgE específica para verificar-se o nível de sensibilização alérgica. A quantificação do prurido foi determinada por meio de questionário durante exame físico do paciente, em escala de zero a quatro, na qual zero foi ausente e quatro incapacitante.

O diagnóstico do ceratocone baseou-se nos seguintes achados clínicos: afinamento de estroma central ou paracentral da córnea, protrusão cônica, anel de *Fleischer* ou estrias de *Vogt* visibilizados com lâmpada de fenda e parâmetros tomográficos com tecnologia *Scheimpflug*⁵⁸ (*Pentacam HR*), especialmente *BAD* maior que 1,6 e *ARTmax* menor que 339⁸⁹. Não foi considerada a caracterização da gravidade do ceratocone para análise das IL. Para análise final, foram importados para o software da análise estatística, os

seguintes parâmetros; BAD d, ARTmax, Km anterior, Km posterior, Locdel e Paq ápice. (Anexo G)

4.5.8 Dosagem de citocinas

As citocinas foram dosadas em 79,85% (107/134) dos pacientes. Dezesesseis interleucinas (IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-23, IL-31, IL-33, gama-INF, TNF-alfa e TNF-beta) foram dosadas. Para dosagem, foi utilizada a técnica de multiplex (similar a ELISA sanduíche), com esferas magnéticas (Milliplex map kit^R, Human Th17 Magnetic Bead Panel, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e leitura em Milliplex Map – Magpix^R (Merck-Millipore), Software Exponent 4.2. O Software utilizado na análise foi o Milliplex Analyst 5.1. As amostras de lágrima foram diluídas (na proporção de 1/10 conforme técnica previamente descrita⁹⁰), na solução tampão do equipamento e posteriormente seguiu-se todas as etapas orientadas pelo fabricante. A leitura final foi realizada em aparelho Milliplex Map-Magpix com excitação dos fluoróforos por LED. Curvas padrão foram obtidas para todas as interleucinas dosadas. O resultado foi expresso em nanogramas ou picogramas por mililitro. Em 28 amostras, a quantidade obtida foi inferior a cinco microlitros e, desta forma, não foi possível dosá-las de acordo com método utilizado.

4.6 Análise numérica estatística

Neste estudo, as características pessoais foram descritas segundo os grupos, com uso de frequências absolutas e relativas para o gênero e etnia, sendo verificada a existência de associação entre os grupos com uso do teste qui-quadrado e teste da razão de verossimilhanças respectivamente⁹¹. As idades foram descritas seguindo grupos com uso de medidas resumo, média e desvio padrão (DP) e comparadas entre os grupos com uso de análise de variâncias (ANOVA), seguida de comparações múltiplas de *Bonferroni*⁹¹.

Testes não paramétricos foram aplicados para análise da dosagem de citocinas e exames oftalmológicos, medidas de resumo foram expressas em mediana (mínimo e máximo) e média (desvio padrão). Na comparação desses parâmetros entre os grupos, foram aplicados testes de *Kruskal-Wallis* seguidos de comparações múltiplas de *Dunn*. Testes de *Mann-Whitney* para amostras independentes foram utilizados na comparação de dois grupos (ceratocone com e sem alergia e duas coletas diferentes)⁹¹.

Foram calculadas as correlações de *Spearman* entre exames oftalmológicos e questionários com as citocinas para verificar a existência de correlações entre essas medidas. Na comparação das citocinas entre os grupos, foram utilizados modelos lineares generalizados com distribuição gama, função de ligação identidade⁹² e ajustada à idade nas comparações, sendo que as análises das citocinas segundo grupos eram seguidas de comparações múltiplas de *Bonferroni*⁸⁰, quando significativas. Nestes casos, o

resultado foi expresso em média e desvio padrão, e mediana, mínimo e máximo.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%. Foi utilizado o pacote IBM^R SPSS (Statistical Package for the Social Sciences - versão 20) e software Windows excel 2003 para análise dos dados.

5. Resultados

Nesse estudo, 134 pacientes foram incluídos e foram distribuídos em 3 grupos: alergia ocular (AO)(n=55), ceratocone (com ou sem alergia ocular) (n=61) e controles (n = 18). O grupo AO foi constituído de pacientes com ceratoconjuntivite atópica, ceratoconjuntivite vernal, conjuntivite alérgica perene e conjuntivite alérgica sazonal.

Os achados clínicos por grupo foram:

Grupo com AO:

- 96,3% (53/55) apresentaram rinite alérgica associada;
- 40% (22/55) asma brônquica;
- 20% (11/55) dermatite atópica.
- 16,36% (9/55) tinham ceratoconjuntivite vernal (CCV);
- 3,63% (2/55) tinham ceratoconjuntivite atópica (CCA);
- 70,90% (39/55) tinham conjuntivite alérgica perene (CAP);
- 9% (5/55) tinham conjuntivite alérgica sazonal (CAS).

Em dois pacientes com ceratoconjuntivite vernal (CCV) não foi possível identificar alergia sistêmica (asma, rinite alérgica, dermatite atópica). Cinco pacientes 9% (5/55) fizeram referência à história familiar de ceratocone.

Grupo com ceratocone:

- 32,79% (20/61) apresentaram história familiar de ceratocone;

- 42,62% (26/61) apresentaram alergia ocular, sendo 40,98%(25/61), casos de alergia ocular leve (CAP, CAS) e apenas 1,3% (1/61) apresentou alergia ocular grave (CCA).
- 11,47% (7/61) asma brônquica;
- 31,15% (19/61) relataram antecedente pessoal de alergia na infância (sem alergia clinicamente diagnosticada no momento da consulta).

Grupo controle:

- 55% (10/18) dos pacientes apresentaram história pessoal de rinite alérgica sem sintomas oculares;
- 5,5% (1/18) tinham história familiar de ceratocone.

A maior parte dos pacientes 61,19% (82/134) foi procedente do município de Chapecó e o restante de municípios vizinhos.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados quanto ao gênero e etnia, e 90,4% dos participantes foram denominados de etnia branca. Entretanto, a média de idade no grupo com ceratocone (32,5 $\pm$ 13,5 anos) foi estatisticamente maior quando comparada aos grupos controle e de alergia ocular ($p = 0,017$ e $p < 0,001$). (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1- Distribuição dos pacientes do estudo

Variável	Controle (N = 18)	Alergia ocular (N = 55)	Ceratocone (N = 61)	Total (N = 134)	p
Idade (anos), média ± DP	22,8 ± 7,0	18 ± 12,8	32,2 ± 13,5	25,3 ± 14,2	<0,001*
Sexo (masculino), n (%)	7 (38,9)	31 (56,4)	36 (59)	75 (55,6)	0,313
Raça (branca), n (%)	18 (100)	48 (87,3)	55 (90,2)	122 (90,4)	0,122**

Test; Teste do chi-quadrado; * Teste da razão de verossimilhanças; ** ANOVA

Tabela 2- Comparações entre os grupos por idade

Idade (anos)					
Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
				Inferior	Superior
Controle - AO	4,83	3,40	0,473	(3,42)	13,08
Controle - Ceratocone	(9,45)	3,36	0,017	(17,60)	(1,30)
AO - Ceratocone	(14,28)	2,33	<0,001	(19,93)	(8,64)

Comparações múltiplas de Bonferroni;

AO = alergia ocular

Todas as citocinas pesquisadas nas amostras de lágrima de 107/134 pacientes foram positivas (IL-1 beta, IFN-gama, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-23, IL-31, IL-33, TNF-alfa, TNF-beta).

Na comparação na dosagem das citocinas dos três grupos, utilizando-se de análise por método de Kruskal-Wallis, observou-se diferença estatisticamente significativa apenas na IL-5 ($p=0,028$); embora não tenha sido possível caracterizar em qual grupo estava esta diferença. Entretanto, após análise com ajuste pela

idade, utilizando-se de modelo linear generalizado com distribuição gama e função de ligação identidade, evidenciou-se diferença estatisticamente significativa em praticamente todas as IL, exceto IL-6 e IL-23 , para os três grupos. (Tabelas 3 e 4)

Tabela 3 – Comparação da dosagem das interleucinas entre os grupos

Variável	Controle (N = 15)	Conjuntivite alérgica (N = 42)	Ceratocone (N = 50)	Total (N = 107)	p	p*
INFγ (pg/mL)					0,166	0,009
média $\pm$ DP	449,1 $\pm$ 466,8	394,8 $\pm$ 532,5	244,1 $\pm$ 234,2	332 $\pm$ 413,5		
mediana (mín.; máx.)	275 (44,4; 1739)	202 (49,5; 2683)	176,9 (29,7; 1202)	199,5 (29,7; 2683)		
IL-10 (g/mL)					0,129	0,031
média $\pm$ DP	105,5 $\pm$ 111,7	113 $\pm$ 152,8	61,5 $\pm$ 77,9	87,9 $\pm$ 118,7		
mediana (mín.; máx.)	57,4 (5,6; 347,8)	40,9 (6,7; 700,7)	31,8 (4,6; 306,3)	39,8 (4,6; 700,7)		
IL-12(p70) (pg/mL)					0,124	0,018
média $\pm$ DP	235,6 $\pm$ 253,1	211,7 $\pm$ 266,4	135,1 $\pm$ 129,6	179,2 $\pm$ 213,2		
mediana (mín.; máx.)	151,4 (24,5; 1009)	135,4 (24,8; 1327)	102,7 (17,1; 685,9)	117,9 (17,1; 1327)		
IL-13 (pg/mL)					0,156	<0,001
média $\pm$ DP	194,5 $\pm$ 146,7	239,5 $\pm$ 247,3	144,9 $\pm$ 96,9	189 $\pm$ 181		
mediana (mín.; máx.)	173,1 (38,5; 609,7)	150,2 (49,4; 1157)	122,7 (35,1; 546,8)	133,9 (35,1; 1157)		
IL-15 (pg/mL)					0,179	0,017
média $\pm$ DP	235,7 $\pm$ 220,4	226,8 $\pm$ 267,5	145,4 $\pm$ 137,3	190 $\pm$ 211,1		
mediana (mín.; máx.)	159 (28,6; 788,4)	127,2 (25,7; 1327)	98,9 (20,2; 616,5)	124 (20,2; 1327)		
IL-17A (ng/mL)					0,076	0,013
média $\pm$ DP	158,4 $\pm$ 124,5	137,4 $\pm$ 127,4	96 $\pm$ 66,2	121 $\pm$ 104,7		
mediana (mín.; máx.)	129,7 (22,5; 500,8)	102,7 (24,1; 635,8)	83,4 (17,3; 351,5)	93,8 (17,3; 635,8)		
IL-1beta (pg/mL)					0,101	0,013
média $\pm$ DP	82,3 $\pm$ 66,8	75,2 $\pm$ 58,3	53,7 $\pm$ 32,4	66,1 $\pm$ 50,3		
mediana (mín.; máx.)	68,2 (13,1; 281,4)	61,2 (15,4; 287,4)	51,2 (11,1; 174,8)	57,5 (11,1; 287,4)		
IL-33 (pg/mL)					0,079	0,029
média $\pm$ DP	745,9 $\pm$ 680,1	605,4 $\pm$ 614,4	403,8 $\pm$ 363,5	530,9 $\pm$ 533,5		
mediana (mín.; máx.)	542,6 (32,1; 2532)	467,8 (47,2; 2983)	293,6 (27,6; 1789)	362,8 (27,6; 2983)		
IL-2 (pg/mL)					0,254	0,019
média $\pm$ DP	129,1 $\pm$ 106,6	125,4 $\pm$ 116,3	88,8 $\pm$ 57,9	108,8 $\pm$ 92,9		
mediana (mín.; máx.)	105,4 (21,2; 427,5)	89,6 (22,9; 608,9)	75,5 (19,2; 286,6)	82,5 (19,2; 608,9)		
IL-4 (ng/mL)					0,051	0,001
média $\pm$ DP	0,63 $\pm$ 0,74	0,63 $\pm$ 0,69	0,35 $\pm$ 0,24	0,5 $\pm$ 0,55		
mediana (mín.; máx.)	0,43 (0,1; 3,1)	0,41 (0,1; 3,3)	0,29 (0,1; 1,2)	0,35 (0,1; 3,3)		
IL-23 (ng/mL)					0,112	0,081
média $\pm$ DP	68,6 $\pm$ 64,8	58,3 $\pm$ 60,8	39 $\pm$ 37,2	50,8 $\pm$ 52,5		
mediana (mín.; máx.)	56,2 (1; 242,6)	42,7 (1,8; 291,1)	30,5 (0,8; 170)	37,6 (0,8; 291,1)		
IL-5 (pg/mL)					0,028	0,002
média $\pm$ DP	221,4 $\pm$ 216,2	321,6 $\pm$ 542	127,5 $\pm$ 122,9	216,9 $\pm$ 367,3		
mediana (mín.; máx.)	142,8 (24,8; 822,8)	132,4 (33; 3121)	91,7 (16,9; 660,5)	127,5 (16,9; 3121)		
IL-6 (pg/mL)					0,086	0,164
média $\pm$ DP	221,2 $\pm$ 232,7	286 $\pm$ 322,2	168,9 $\pm$ 193,2	222,2 $\pm$ 259,8		
mediana (mín.; máx.)	153,2 (15; 868)	159,8 (23; 1758)	111,3 (14; 1033)	129,2 (14; 1758)		
IL-31 (ng/mL)					0,072	0,009
média $\pm$ DP	1,3 $\pm$ 1,35	1,18 $\pm$ 1,37	0,71 $\pm$ 0,65	0,98 $\pm$ 1,1		
mediana (mín.; máx.)	0,92 (0,09; 5,35)	0,78 (0,13; 6,47)	0,59 (0,09; 3,42)	0,66 (0,09; 6,47)		
TNF alfa (pg/mL)					0,090	0,021
média $\pm$ DP	230,5 $\pm$ 254,8	181 $\pm$ 197,5	119,7 $\pm$ 115,8	159,3 $\pm$ 177,5		
mediana (mín.; máx.)	159,8 (16,4; 1011)	105,6 (22,6; 926,4)	90,5 (14,2; 574,9)	102,2 (14,2; 1011)		
TNF beta (ng/mL)					0,091	0,010
média $\pm$ DP	0,6 $\pm$ 0,5	0,56 $\pm$ 0,49	0,37 $\pm$ 0,25	0,48 $\pm$ 0,4		
mediana (mín.; máx.)	0,47 (0,08; 2,02)	0,42 (0,1; 2,13)	0,35 (0,06; 1,3)	0,37 (0,06; 2,13)		

Teste Kruskal-Wallis; * Modelo linear generalizado com distribuição gama e função de ligação identidade, ajustado pela idade

Tabela 4 – Pesquisa da diferença no valor da interleucina 5 entre os grupos sem ajuste para idade

Variável	Comparação	Valor Z	p [*]
IL-5 (pg/mL)	Controle - AO	0,01	0,991
	Controle - Ceratocone	1,27	0,206
	AO - Ceratocone	1,76	0,078

* Comparações múltiplas de Dunn

AO = alergia ocular

IL-5 = interleucina 5

A comparação entre os grupos, após ajuste para idade, identificou diferença na dosagem de IFN-gama, IL-13, IL-15, IL-17^A, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-31 e TNF-beta. Estas citocinas foram estatisticamente maiores no grupo alergia ocular se comparadas ao grupo ceratocone ($p < 0,05$). (Tabela 5)

Tabela 5 – Comparação da diferença média das citocinas entre os grupos

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
INFy (pg/mL)	Controle - AO	42,7	115,0	1	>0,999	(232,6)	317,9
	Controle - Ceratocone	204,3	105,3	1	0,157	(47,9)	456,4
	AO - Ceratocone	161,6	62,0	1	0,028	13,1	310,1
IL-10 (pg/mL)	Controle - AO	(6,7)	35,4	1	>0,999	(91,4)	78,0
	Controle - Ceratocone	44,3	31,0	1	0,461	(30,0)	118,5
	AO - Ceratocone	50,9	21,4	1	0,051	(0,2)	102,1
IL-12(p70) (pg/mL)	Controle - CA	21,6	59,2	1	>0,999	(120,0)	163,3
	Controle - Ceratocone	101,0	54,2	1	0,188	(28,9)	230,8
	CA - Ceratocone	79,3	33,3	1	0,051	(0,4)	159,0
IL-13 (pg/mL)	Controle - CA	(59,3)	42,3	1	0,482	(160,5)	41,9
	Controle - Ceratocone	54,9	35,9	1	0,378	(31,0)	140,8
	CA - Ceratocone	114,2	29,5	1	<0,001	43,5	184,9
IL-15 (pg/mL)	Controle - CA	3,0	59,2	1	>0,999	(138,8)	144,8
	Controle - Ceratocone	91,2	53,6	1	0,267	(37,2)	219,6
	CA - Ceratocone	88,2	35,0	1	0,035	4,4	171,9
IL-17A (ng/mL)	Controle - CA	19,0	32,2	1	>0,999	(58,0)	96,0
	Controle - Ceratocone	63,4	29,9	1	0,101	(8,0)	134,9
	CA - Ceratocone	44,5	18,5	1	0,048	0,2	88,7
IL-1beta (pg/mL)	Controle - CA	5,8	15,4	1	>0,999	(31,2)	42,7
	Controle - Ceratocone	29,3	14,2	1	0,118	(4,7)	63,4
	CA - Ceratocone	23,6	9,5	1	0,038	0,9	46,2
IL-33 (pg/mL)	Controle - CA	133,4	189,3	1	>0,999	(319,6)	586,5
	Controle - Ceratocone	343,9	175,6	1	0,150	(76,4)	764,2
	CA - Ceratocone	210,5	101,8	1	0,116	(33,2)	454,2
IL-2 (pg/mL)	Controle - CA	1,1	26,0	1	>0,999	(61,2)	63,3
	Controle - Ceratocone	41,7	23,8	1	0,239	(15,3)	98,7
	CA - Ceratocone	40,6	16,2	1	0,037	1,8	79,5
IL-4 (ng/mL)	Controle - CA	(0,004)	0,146	1	>0,999	(0,353)	0,344
	Controle - Ceratocone	0,284	0,130	1	0,086	(0,027)	0,595
	CA - Ceratocone	0,288	0,087	1	0,003	0,081	0,496
IL-5 (pg/mL)	Controle - CA	(84,1)	70,3	1	0,694	(252,3)	84,1
	Controle - Ceratocone	90,1	55,4	1	0,312	(42,6)	222,8
	CA - Ceratocone	174,2	51,5	1	0,002	51,0	297,4
IL-31 (ng/mL)	Controle - CA	0,113	0,327	1	>0,999	(0,669)	0,896
	Controle - Ceratocone	0,589	0,298	1	0,144	(0,124)	1,302
	CA - Ceratocone	0,475	0,184	1	0,029	0,036	0,915
TNF alfa (pg/mL)	Controle - CA	49,7	55,9	1	>0,999	(84,2)	183,6
	Controle - Ceratocone	110,7	52,3	1	0,103	(14,6)	236,0
	CA - Ceratocone	61,0	29,2	1	0,110	(8,8)	130,8
TNF beta (ng/mL)	Controle - CA	0,035	0,125	1	>0,999	(0,264)	0,334
	Controle - Ceratocone	0,230	0,114	1	0,131	(0,043)	0,504
	CA - Ceratocone	0,195	0,076	1	0,029	0,015	0,376

Comparações múltiplas de Bonferroni

AO = alergia ocular

Todas as variáveis relacionadas ao exame clínico, questionários, osmolaridade total, prurido, ceratometria médias anteriores e posteriores, espessura da córnea, índices ARTmax e BAD d, foram diferentes entre os grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa nas medidas de pressão intra-ocular (PIO) e diferença absoluta de osmolaridade entre os olhos (delta osmol) nos grupos. (Tabela 6)

Tabela 6— Comparação dos parâmetros clínicos encontrados nos grupos estudados

Variável	Controle (N = 19)	Alergia ocular (N = 55)	Ceratocone (N = 61)	Total (N = 134)	p
Questionário de alergia¹					<0,001
média ± DP	6 ± 4,1	14,6 ± 2,8	9,8 ± 4,4	11,3 ± 4,8	
mediana (mín.; máx.)	6,5 (0; 12)	15 (7; 19)	10 (0; 18)	12 (0; 19)	
Prurido questionado²					<0,001
média ± DP	0,7 ± 0,7	2,45 ± 0,66	1,5 ± 0,81	1,78 ± 0,96	
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	2 (0; 4)	1 (0; 4)	2 (0; 4)	
Osmolaridade (mOsm/L)³					0,011
média ± DP	314 ± 19	303,4 ± 8,8	314 ± 19	309,6 ± 16,3	
mediana (mín.; máx.)	312,5 (290; 353)	302 (281; 323)	309 (287; 363)	305 (281; 363)	
Delta osmol (mOsm/L)⁴					0,330
média ± DP	10,2 ± 6,1	7,5 ± 6,2	10,5 ± 11,9	9,3 ± 9,3	
mediana (mín.; máx.)	12 (1; 19)	6 (0; 26)	7 (0; 72)	7 (0; 72)	
OSDI⁵					<0,001
média ± DP	7,6 ± 10,2	29,6 ± 19,3	23,4 ± 15,5	23,9 ± 17,9	
mediana (mín.; máx.)	4,2 (0; 39,6)	27,1 (0; 84,4)	22,9 (0; 62,5)	22,9 (0; 84,4)	
K médio anterior d (D)⁶					<0,001
média ± DP	43,4 ± 1,7	43,3 ± 1,5	45,9 ± 2,8	44,4 ± 2,8	
mediana (mín.; máx.)	43,2 (40,4; 46,4)	43,2 (40,4; 47,5)	45,4 (39,5; 55)	44,2 (30,5; 55)	
K médio posterior d (D)⁶					<0,001
média ± DP	(6,3) ± 0,3	(6,3) ± 0,3	(6,9) ± 0,6	(6,5) ± 0,6	
mediana (mín.; máx.)	(6,2) (6,8; 5,7)	(6,3) (6,8; 5,8)	(6,8) (9; 5,8)	(6,5) (9; 3,3)	
Paquimetria no ápice d (μm)⁷					<0,001
média ± DP	530,4 ± 31,5	544,2 ± 30,3	491,1 ± 49,1	518,3 ± 47,1	
mediana (mín.; máx.)	531 (478; 614)	545 (477; 616)	491 (350; 636)	523,5 (350; 636)	
Paquimetria central d (μm)⁷					<0,001
média ± DP	529,7 ± 31,3	543,3 ± 30,3	492,9 ± 48,1	518,6 ± 46	
mediana (mín.; máx.)	530,5 (475; 612)	544,5 (476; 615)	493 (351; 627)	522 (351; 627)	
Local mais delgado d (μm)⁸					<0,001
média ± DP	526,6 ± 30,9	540,3 ± 30,7	480,7 ± 51,5	511,1 ± 50	
mediana (mín.; máx.)	527 (474; 607)	541,5 (474; 611)	484 (328; 620)	518,5 (328; 620)	

Continua

Tabela 6– Comparação dos parâmetros clínicos encontrados nos grupos estudados (continuação)

Variável	Controle (N = 19)	Alergia ocular (N = 55)	Ceratocone (N = 61)	Total (N = 134)	P*
ARTMAX d⁹					<0,001
média ± DP	408,2 ± 76,4	429,4 ± 95,5	227,1 ± 87,2	331,9 ± 133,9	
mediana (mín.; máx.)	380,5 (290; 557)	426,5 (222; 715)	224 (45; 435)	341 (45; 715)	
BAD d¹⁰					<0,001
média ± DP	1,3 ± 0,6	1 ± 0,6	5,7 ± 3,2	3,2 ± 3,3	
mediana (mín.; máx.)	1,4 (-0,1; 2)	0,9 (-0,6; 2,3)	5 (1; 14,2)	1,9 (-0,6; 14,2)	
K médio anterior e (D - dioptria)⁶					<0,001
média ± DP	43,4 ± 1,6	43,3 ± 1,5	46,1 ± 3,3	44,6 ± 2,9	
mediana (mín.; máx.)	43,2 (40,3; 46,2)	43,3 (40,7; 47,8)	45,8 (40,1; 61,5)	44,3 (36,3; 61,5)	
K médio posterior e (D - dioptria)⁶					<0,001
média ± DP	(6,3) ± 0,3	(6,3) ± 0,3	(6,8) ± 0,7	(6,5) ± 0,6	
mediana (mín.; máx.)	(6,2) (6,8; 5,7)	(6,2) (6,9; 5,7)	(6,7) (9,8; 5,9)	(6,4) (9,8; 4,8)	
Paquimetria no ápice e (μm)⁷					<0,001
média ± DP	530,6 ± 29,4	544,2 ± 30,7	493,1 ± 43,3	519,2 ± 43,9	
mediana (mín.; máx.)	533 (475; 603)	544 (480; 631)	495 (389; 598)	522,5 (389; 631)	
Paquimetria central e (μm)⁷					<0,001
média ± DP	529,6 ± 29,5	542,3 ± 30,7	495,4 ± 42,1	519,4 ± 42,3	
mediana (mín.; máx.)	531,5 (476; 602)	541 (478; 627)	495 (392; 598)	521 (392; 627)	
Local mais delgado e (μm)⁸					<0,001
média ± DP	525,5 ± 29,5	538,5 ± 30,8	480,1 ± 47	510,3 ± 47,6	
mediana (mín.; máx.)	527 (469; 597)	538 (475; 621)	481,5 (336; 592)	516 (336; 621)	
ARTMAX⁹					<0,001
média ± DP	413,7 ± 88,9	414,6 ± 77,6	224,9 ± 103,8	327,7 ± 131,1	
mediana (mín.; máx.)	405,5 (297; 650)	404 (296; 668)	211,5 (0; 502)	339,5 (0; 668)	
BAD d¹⁰					<0,001
média ± DP	1,2 ± 0,7	1 ± 0,6	5,8 ± 3,9	3,2 ± 3,5	
mediana (mín.; máx.)	1,3 (-0,4; 2,3)	1,1 (-0,6; 2,2)	5 (0,4; 18,2)	1,7 (-0,6; 18,2)	
Pressão intra-ocular d (mmHg)¹¹					0,124
média ± DP	13,9 ± 2,7	13,8 ± 2,7	12,9 ± 3,1	13,4 ± 2,9	
mediana (mín.; máx.)	14 (10; 19)	14 (8; 21)	13 (7; 26)	13 (7; 26)	
Pressão intra-ocular e (mmHg)¹¹					0,899
média ± DP	13,3 ± 2,7	13,3 ± 2,4	13,3 ± 3	13,3 ± 2,7	
mediana (mín.; máx.)	13 (10; 20)	13 (8; 19)	13 (8; 25)	13 (8; 25)	

*Teste Kruskal-Wallis

¹QA é o número resultante de questionário composto de 15 questões com diferentes domínios, onde valor igual ou maior a 10 é considerado preditivo de diagnóstico de alergia ocular;

²O sintoma do prurido foi calculado com numeração de 0 a quatro, em questionário tipo Likert, obtido de forma direta pelo profissional da área da alergia;

³Osmolaridade refere-se a maior osmolaridade de lágrima obtida entre olho esquerdo e direito de cada paciente;

⁴Delta Osmol é o valor obtido da diferença das medidas de osmolaridade entre os olhos;

⁵OSDI, é o número obtido de um questionário de 12 perguntas tipo likert, sobre sintomas de doença de superfície ocular e auxiliar no diagnóstico de olho seco, que varia em uma escala de zero a 100, no qual, quanto maior o número maior o sintoma de doença da superfície ocular;

⁶Km é a ceratometria média medida no Pentacam HR^R: anterior e posterior, esquerda(e) e direita (d);

⁷Paquimetria central e no ápice refere-se a espessura da córnea medida em micrômetros nesses locais;

⁸Local mais delgado da córnea medido em micrômetros;

⁹ARTMax é o valor de Ambrosio's Relational Thickness;

¹⁰BAD d é o valor de Belin Ambrosio Enhanced Ectasia d;

¹¹Pressão intraocular;

d = direito; e = esquerdo.

Nas comparações com análise *pos hoc* para identificação das diferenças clínicas (teste de *Dunn*) encontrada entre os grupos, observou-se que o questionário de alergia foi estatisticamente maior no grupo com AO que nos demais, o prurido questionado foi diferente entre todos os grupos, sendo menor no grupo controle e maior no grupo AO, a osmolaridade foi estatisticamente maior no ceratocone que no AO e o OSDI foi estatisticamente menor no controle que nos outros grupos de pacientes. Para todos os parâmetros oftalmológicos obtidos da tomografia, o grupo ceratocone diferiu estatisticamente dos demais grupos, apresentando menor espessura de córnea, maior ceratometria média, menor ARTmax e maior BAD d ($p < 0,05$). (Tabela 7)

Tabela 7 – Comparações das diferentes variáveis clínicas entre os grupos

Variável	Comparação	Valor Z	p
Questionário de alergia ¹	Controle - AO	(4,56)	<0,001
	Controle - Ceratocone	(1,86)	0,063
	AO - Ceratocone	3,98	<0,001
Prurido ²	Controle - AO	(4,64)	<0,001
	Controle - Ceratocone	(1,99)	0,047
	AO - Ceratocone	3,89	<0,001
Osmolaridade de lágrima ³ (mOsm/L)	Controle - AO	1,38	0,166
	Controle - Ceratocone	(0,01)	0,994
	AO - Ceratocone	(2,03)	0,043
OSDI ⁴	Controle - AO	(3,58)	<0,001
	Controle - Ceratocone	(2,86)	0,004
	AO - Ceratocone	1,09	0,275
K médio anterior d ⁵ (D - dioptria)	Controle - AO	0,22	0,824
	Controle - Ceratocone	(2,74)	0,006
	AO - Ceratocone	(4,26)	<0,001
K médio posterior d ⁵ (D - dioptria)	Controle - AO	(0,02)	0,985
	Controle - Ceratocone	3,21	<0,001
	AO - Ceratocone	4,64	<0,001
Paquimetria no ápice d ⁶ (mm)	Controle - AO	(1,05)	0,293
	Controle - Ceratocone	2,22	0,026
	AO - Ceratocone	4,72	<0,001
Paquimetria central ⁶ d ⁶ (mm)	Controle - AO	(1,08)	0,280
	Controle - Ceratocone	2,11	0,035
	AO - Ceratocone	4,61	<0,001
Local mais delgado d ⁷ (mm)	Controle - AO	(0,95)	0,343
	Controle - Ceratocone	2,48	0,013
	AO - Ceratocone	4,94	<0,001
ARTMAX d ⁸	Controle - AO	(0,35)	0,726
	Controle - Ceratocone	3,81	<0,001
	AO - Ceratocone	5,98	<0,001
BAD d d ⁹	Controle - AO	0,92	0,355
	Controle - Ceratocone	(3,62)	<0,001
	AO - Ceratocone	(6,54)	<0,001
K médio anterior e ⁵ (D - dioptria)	Controle - AO	0,22	0,828
	Controle - Ceratocone	(2,74)	0,006
	AO - Ceratocone	(4,23)	<0,001
K médio posterior e ⁵ (D - dioptria)	Controle - AO	(0,07)	0,946
	Controle - Ceratocone	2,87	0,004
	AO - Ceratocone	4,18	<0,001
Paquimetria no ápice e ⁶ (um)	Controle - AO	(0,95)	0,343
	Controle - Ceratocone	2,28	0,023
	AO - Ceratocone	4,62	<0,001
Paquimetria central e ⁶ (um)	Controle - AO	(0,94)	0,347
	Controle - Ceratocone	2,14	0,032
	AO - Ceratocone	4,41	<0,001
Local mais delgado e ⁷ (um)	Controle - AO	(0,87)	0,386
	Controle - Ceratocone	2,54	0,011
	AO - Ceratocone	4,88	<0,001
ARTMAX e ⁸	Controle - AO	(0,11)	0,912
	Controle - Ceratocone	3,71	<0,001
	AO - Ceratocone	5,45	<0,001
BAD d e ⁹	Controle - AO	0,50	0,615
	Controle - Ceratocone	(3,56)	<0,001
	AO - Ceratocone	(5,80)	<0,001

Comparações múltiplas de Dunn

¹QA é o número resultante do questionário para alergia, composto de 15 questões com diferentes domínios, onde valor igual ou maior a 10 é considerado preditivo de diagnóstico de alergia ocular;

²O sintoma do prurido foi calculado com numeração de 0 a quatro, em questionário tipo Likert, obtido de forma direta pelo profissional da área da alergia;

³Osmolaridade refere-se a maior osmolaridade de lágrima obtida entre olho esquerdo e direito de cada paciente;

⁴OSDI, é o número obtido de um questionário de 12 perguntas tipo likert, sobre sintomas de doença de superfície ocular e auxiliar no diagnóstico de olho seco, que varia em uma escala de zero a 100, no qual quanto maior o número, maior a doença da superfície ocular, obtida nos dois olhos;

⁵Km é a ceratometria média medida no Pentacam HR^R, anterior e posterior, esquerda(e) e direita (d);

⁶Paquimetria central e no ápice refere-se a espessura da córnea medida em micrômetros nesses locais;

⁷Local mais delgado da córnea medido em micrômetros;

⁸ARTMax é o valor de Ambrosio's Relational Thickness;

⁹BAD d é o valor de Belin Ambrosio Enhanced Ectasia d;

Os pacientes foram reagrupados para análise das citocinas nos diferentes subtipos de alergia ocular (conjuntivite alérgica) independente da presença ou não de ceratocone. Nessa análise, pacientes com ceratocone e alergia ocular, foram agrupados de acordo com o subtipo de conjuntivite que apresentavam. Não se observou diferença na dosagem das citocinas entre pacientes com diferentes subtipos de conjuntivite alérgica e ceratocone. (Tabela 8)

Tabela 8 – Dosagem das citocinas nos pacientes com ceratocone e nos diferentes subtipos de alergia ocular

Variável	Ceratocone sem alergia ocular (N = 29)	Ceratoconjuntivite atópica (N = 3)	Conjuntivite alérgica perene e sazonal (N = 51)	Ceratoconjuntivite vernal (N = 9)	p
INFy (pg/mL)					0,892
média ± DP	273,3 ± 221,6	152,2 ± 71,2	364,4 ± 509,9	202,4 ± 100,4	
mediana (mín.; máx.)	199,5 (47; 967,6)	181,1 (71,1; 204,4)	194,7 (29,7; 2683)	185,5 (49,5; 373,4)	
IL-10 (pg/mL)					0,427
média ± DP	70,1 ± 81,5	126,6 ± 86,2	86,4 ± 134,9	111,6 ± 152,3	
mediana (mín.; máx.)	35,6 (4,6; 306,3)	168,6 (27,5; 183,6)	38,7 (4,6; 700,7)	43,1 (12,3; 477,8)	
IL-12(p70) (pg/mL)					0,992
média ± DP	147,2 ± 120,3	119,4 ± 43,7	195,7 ± 258,7	115,1 ± 57,8	
mediana (mín.; máx.)	106,6 (18,9; 488)	137,1 (69,7; 151,4)	117,9 (17,1; 1327)	127,2 (29,7; 195,7)	
IL-13 (pg/mL)					0,894
média ± DP	158,4 ± 103,9	137,3 ± 101	214,3 ± 231,7	152,2 ± 102,2	
mediana (mín.; máx.)	140,9 (35,1; 546,8)	94,2 (64,9; 252,7)	130,6 (35,1; 1157)	115,5 (60,9; 345,7)	
IL-15 (pg/mL)					0,997
média ± DP	162,2 ± 141,6	121,1 ± 43,5	207,6 ± 257,7	126,9 ± 70,6	
mediana (mín.; máx.)	115 (25,7; 616,5)	140,6 (71,2; 151,4)	120,9 (20,2; 1327)	124 (44,7; 217,9)	
IL-17A (ng/mL)					0,960
média ± DP	101,9 ± 60,3	98,3 ± 38,1	128,1 ± 125	87,2 ± 38,9	
mediana (mín.; máx.)	88,2 (17,3; 245,9)	109,1 (55,9; 129,7)	93,8 (19,3; 635,8)	81,6 (45,3; 148,7)	
IL-1beta (pg/mL)					0,984
média ± DP	57,8 ± 29,6	56 ± 18,1	67,5 ± 57,3	61,9 ± 35,1	
mediana (mín.; máx.)	53,2 (11,1; 127,2)	62,9 (35,5; 69,7)	54 (11,3; 287,4)	59,5 (28,8; 140,6)	
IL-33 (pg/mL)					0,967
média ± DP	442,6 ± 343,3	407 ± 208,5	555,8 ± 610,1	357,1 ± 229,4	
mediana (mín.; máx.)	319,6 (41,6; 1327)	467,8 (174,8; 578,3)	362,8 (27,6; 2983)	333,4 (59,5; 747,2)	
IL-2 (pg/mL)					0,973
média ± DP	95,8 ± 56,4	82,9 ± 32,6	116,2 ± 112,1	83,4 ± 43,1	
mediana (mín.; máx.)	82,5 (19,2; 252,2)	101,6 (45,3; 101,7)	80,1 (21,2; 608,9)	77,8 (37,4; 151,6)	
IL-4 (ng/mL)					0,848
média ± DP	0,38 ± 0,22	0,43 ± 0,13	0,51 ± 0,61	0,59 ± 0,7	
mediana (mín.; máx.)	0,32 (0,1; 0,9)	0,4 (0,3; 0,6)	0,34 (0,1; 3,3)	0,35 (0,2; 2,4)	
IL-23 (ng/mL)					0,963
média ± DP	43,7 ± 36	35,6 ± 24,2	53,4 ± 60,3	33,8 ± 23,6	
mediana (mín.; máx.)	31,7 (1,2; 131,1)	37,6 (10,4; 58,7)	40,9 (0,8; 291,1)	37,6 (3; 71,4)	
IL-5 (pg/mL)					0,457
média ± DP	135,1 ± 109,5	399,9 ± 396,6	191,7 ± 262	554,6 ± 1013,1	
mediana (mín.; máx.)	99,9 (25,7; 529,8)	285,9 (72,7; 841)	127,5 (16,9; 1393)	130,7 (55,1; 3121)	
IL-6 (pg/mL)					0,057
média ± DP	149,4 ± 149	649,8 ± 344,5	220,6 ± 216,2	324,9 ± 548,3	
mediana (mín.; máx.)	123,8 (14; 746)	550,5 (366; 1033)	123,8 (14; 1011)	123,8 (42; 1758)	
IL-31 (ng/mL)					0,920
média ± DP	0,76 ± 0,59	0,76 ± 0,3	1,08 ± 1,33	0,61 ± 0,34	
mediana (mín.; máx.)	0,61 (0,09; 2,52)	0,92 (0,41; 0,95)	0,66 (0,09; 6,47)	0,64 (0,24; 1,16)	
TNF alfa (pg/mL)					0,931
média ± DP	130 ± 112,2	132 ± 67	166,3 ± 195,5	104,6 ± 56,1	
mediana (mín.; máx.)	93,6 (15,7; 453,4)	134,8 (63,6; 197,5)	102,2 (14,2; 926,4)	89,5 (47,1; 214,9)	
TNF beta (ng/mL)					0,972
média ± DP	0,4 ± 0,24	0,38 ± 0,14	0,51 ± 0,48	0,34 ± 0,16	
mediana (mín.; máx.)	0,35 (0,08; 0,97)	0,45 (0,22; 0,46)	0,37 (0,06; 2,13)	0,35 (0,11; 0,58)	

Teste Kruskal-Wallis

Não houve diferença estatisticamente significativa na dosagem das citocinas entre os grupos ceratocone e ceratocone com AO.(Tabela 9)

Tabela 9 – Comparação das medidas de citocinas nos subgrupos de ceratocone

Variável	Ceratocone (N = 29)	Ceratocone sem alergia ocular (N = 21)	p
INFy (pg/mL)			0,089
média ± DP	273,3 ± 221,6	203,8 ± 250,3	
mediana (mín.; máx.)	199,5 (47; 967,6)	114,7 (29,7; 1202)	
IL-10 (pg/mL)			0,130
média ± DP	70,1 ± 81,5	49,7 ± 72,9	
mediana (mín.; máx.)	35,6 (4,6; 306,3)	18,3 (4,6; 306,3)	
IL-12(p70) (pg/mL)			0,105
média ± DP	147,2 ± 120,3	118,4 ± 142,8	
mediana (mín.; máx.)	106,6 (18,9; 488)	69,7 (17,1; 685,9)	
IL-13 (pg/mL)			0,160
média ± DP	158,4 ± 103,9	126,3 ± 85,4	
mediana (mín.; máx.)	140,9 (35,1; 546,8)	98,4 (35,1; 394,2)	
IL-15 (pg/mL)			0,107
média ± DP	162,2 ± 141,6	122,3 ± 130,9	
mediana (mín.; máx.)	115 (25,7; 616,5)	72,7 (20,2; 603,5)	
IL-17A (ng/mL)			0,140
média ± DP	101,9 ± 60,3	87,8 ± 74,4	
mediana (mín.; máx.)	88,2 (17,3; 245,9)	60,5 (19,3; 351,5)	
IL-1beta (pg/mL)			0,113
média ± DP	57,8 ± 29,6	48 ± 35,9	
mediana (mín.; máx.)	53,2 (11,1; 127,2)	40,3 (11,3; 174,8)	
IL-33 (pg/mL)			0,116
média ± DP	442,6 ± 343,3	350,2 ± 391,9	
mediana (mín.; máx.)	319,6 (41,6; 1327)	227,4 (27,6; 1789)	
IL-2 (pg/mL)			0,123
média ± DP	95,8 ± 56,4	79,1 ± 59,9	
mediana (mín.; máx.)	82,5 (19,2; 252,2)	62,8 (21,2; 286,6)	
IL-4 (ng/mL)			0,111
média ± DP	0,38 ± 0,22	0,31 ± 0,27	
mediana (mín.; máx.)	0,32 (0,1; 0,9)	0,24 (0,1; 1,2)	
IL-23 (ng/mL)			0,091
média ± DP	43,7 ± 36	32,6 ± 38,8	
mediana (mín.; máx.)	31,7 (1,2; 131,1)	17,2 (0,8; 170)	
IL-5 (pg/mL)			0,107
média ± DP	135,1 ± 109,5	117,1 ± 141,5	
mediana (mín.; máx.)	99,9 (25,7; 529,8)	64,8 (16,9; 660,5)	
IL-6 (pg/mL)			0,937
média ± DP	149,4 ± 149	195,7 ± 243	
mediana (mín.; máx.)	123,8 (14; 746)	109 (14; 1033)	
IL-31 (ng/mL)			0,127
			Continua

Tabela 9 – Comparação das medidas de citocinas nos subgrupos de ceratocone (Continuação)

Variável	Ceratocone (N = 29)	Ceratocone sem alergia ocular (N = 21)	p
média ± DP	0,76 ± 0,59	0,64 ± 0,73	
mediana (mín.; máx.)	0,61 (0,09; 2,52)	0,42 (0,09; 3,42)	
TNF alfa (pg/mL)			0,198
média ± DP	130 ± 112,2	105,4 ± 121,9	
mediana (mín.; máx.)	93,6 (15,7; 453,4)	72,1 (14,2; 574,9)	
TNF beta (ng/mL)			0,116
média ± DP	0,4 ± 0,24	0,33 ± 0,27	
mediana (mín.; máx.)	0,35 (0,08; 0,97)	0,26 (0,06; 1,3)	
Teste Mann-Whitney			

Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação da dosagem das citocinas nos dois momentos de coleta dentro dos grupos, exceto para IL-13 no grupo ceratocone ($p = 0,037$). (Tabelas 10, 11, 12, 13)

Tabela 10 – Comparação das medidas das citocinas no grupo controle em períodos de coleta diferentes

Variável	Controle		p
	2013 (N = 4)	2014/2015 (N = 11)	
INFy (pg/mL)			0,949
média ± DP	700,1 ± 789,3	357,8 ± 289,5	
mediana (mín.; máx.)	508,6 (44,4; 1739)	275 (71,1; 1102)	
IL-10 (pg/mL)			0,949
média ± DP	157,3 ± 172,4	86,7 ± 84,2	
mediana (mín.; máx.)	137,9 (5,6; 347,8)	57,4 (9,3; 287,4)	
IL-12(p70) (pg/mL)			0,949
média ± DP	384,4 ± 453,8	181,5 ± 125,9	
mediana (mín.; máx.)	252,1 (24,5; 1009)	151,4 (32,4; 488)	
IL-13 (pg/mL)			0,753
média ± DP	269,8 ± 253,4	167,2 ± 88,1	
mediana (mín.; máx.)	215,5 (38,5; 609,7)	173,1 (45,7; 323,7)	
IL-15 (pg/mL)			>0,999
média ± DP	348,9 ± 364,9	194,5 ± 145,2	
mediana (mín.; máx.)	289,4 (28,6; 788,4)	159 (34,7; 554,3)	
IL-17A (ng/mL)			>0,999
média ± DP	214,1 ± 220,4	138,1 ± 73,7	
mediana (mín.; máx.)	166,6 (22,5; 500,8)	129,7 (30,8; 294,1)	
IL-1beta (pg/mL)			0,949
média ± DP	113,2 ± 121,6	71 ± 35,8	
mediana (mín.; máx.)	79,3 (13,1; 281,4)	68,2 (16,9; 144,2)	
IL-33 (pg/mL)			>0,999
média ± DP	1043,1 ± 1165,2	637,8 ± 438,3	
mediana (mín.; máx.)	804,2 (32,1; 2532)	542,6 (59,5; 1546)	
IL-2 (pg/mL)			0,851
média ± DP	180,9 ± 185,1	110,3 ± 64,6	
mediana (mín.; máx.)	137,4 (21,2; 427,5)	105,4 (24,6; 245,9)	
IL-4 (ng/mL)			0,753
média ± DP	1,08 ± 1,4	0,47 ± 0,27	
mediana (mín.; máx.)	0,58 (0,1; 3,1)	0,43 (0,1; 1)	
IL-23 (ng/mL)			0,949
média ± DP	96,6 ± 111,9	58,4 ± 41	
mediana (mín.; máx.)	71,4 (1; 242,6)	56,2 (1,8; 142,9)	
IL-5 (pg/mL)			0,949
média ± DP	346,1 ± 373,8	176,1 ± 122,7	
mediana (mín.; máx.)	268,4 (24,8; 822,8)	142,8 (41,4; 485,1)	
IL-6 (pg/mL)			0,851
média ± DP	341,6 ± 396,2	177,4 ± 144,2	
mediana (mín.; máx.)	240,5 (17; 868)	153,2 (15; 505)	
IL-31 (ng/mL)			0,949
média ± DP	2,03 ± 2,43	1,03 ± 0,7	
mediana (mín.; máx.)	1,33 (0,09; 5,35)	0,92 (0,11; 2,57)	
TNF alfa (pg/mL)			>0,999
média ± DP	362,7 ± 459,5	182,4 ± 134,3	

mediana (mín.; máx.)	211,6 (16,4; 1011)	159,8 (22,6; 483,6)	>0,999
TNF beta (ng/mL)			
média ± DP	0,83 ± 0,89	0,52 ± 0,29	
mediana (mín.; máx.)	0,6 (0,08; 2,02)	0,47 (0,11; 1,12)	

Tabela 11 - Comparação das medidas das citocinas no grupo ceratocone em períodos de coleta diferentes

Variável	Ceratocone		p
	2013 (N = 9)	2014/2015 (N = 41)	
INFy (pg/mL)			0,211
média ± DP	154,2 ± 100,7	263,9 ± 250,9	
mediana (mín.; máx.)	161,1 (29,7; 318)	194,7 (44,4; 1202)	
IL-10 (pg/mL)			0,455
média ± DP	46,8 ± 57,5	64,8 ± 82	
mediana (mín.; máx.)	24,4 (4,6; 183,6)	35,6 (5,6; 306,3)	
IL-12(p70) (pg/mL)			0,152
média ± DP	85 ± 56,7	146,1 ± 138,7	
mediana (mín.; máx.)	69,7 (17,1; 166,8)	106,6 (22; 685,9)	
IL-13 (pg/mL)			0,037
média ± DP	94,2 ± 36	156,1 ± 102,7	
mediana (mín.; máx.)	90,4 (46,6; 168,7)	133,9 (35,1; 546,8)	
IL-15 (pg/mL)			0,294
média ± DP	95,3 ± 63,7	156,4 ± 147	
mediana (mín.; máx.)	79,6 (20,2; 208,8)	106,6 (22,9; 616,5)	
IL-17A (ng/mL)			0,193
média ± DP	70,7 ± 42,1	101,5 ± 69,6	
mediana (mín.; máx.)	56,9 (17,3; 129,7)	83,9 (19,3; 351,5)	
IL-1beta (pg/mL)			0,145
média ± DP	39,8 ± 22	56,7 ± 33,7	
mediana (mín.; máx.)	36,1 (11,1; 69,7)	52,5 (12,2; 174,8)	
IL-33 (pg/mL)			0,176
média ± DP	265,1 ± 203,6	434,2 ± 385,1	
mediana (mín.; máx.)	174,8 (32,1; 578,3)	293,6 (27,6; 1789)	
IL-2 (pg/mL)			0,184
média ± DP	64,7 ± 34,1	94 ± 60,9	
mediana (mín.; máx.)	61 (19,2; 122,8)	77,8 (21,2; 286,6)	
IL-4 (ng/mL)			0,176
média ± DP	0,25 ± 0,15	0,38 ± 0,25	
mediana (mín.; máx.)	0,2 (0,1; 0,5)	0,29 (0,1; 1,2)	
IL-23 (ng/mL)			0,193
média ± DP	25,1 ± 22	42,1 ± 39,3	
mediana (mín.; máx.)	17,2 (0,8; 58,7)	31,7 (1; 170)	
IL-5 (pg/mL)			0,426
média ± DP	99,3 ± 83,9	133,7 ± 129,9	
mediana (mín.; máx.)	75,5 (16,9; 285,9)	94,2 (24,8; 660,5)	
IL-6 (pg/mL)			0,728
média ± DP	252,3 ± 327	150,5 ± 149,8	
mediana (mín.; máx.)	109 (23; 1033)	113,7 (14; 746)	
IL-31 (ng/mL)			0,193
média ± DP	0,47 ± 0,33	0,76 ± 0,69	
mediana (mín.; máx.)	0,34 (0,09; 0,95)	0,61 (0,09; 3,42)	
TNF alfa (pg/mL)			0,211
média ± DP	78,1 ± 60	128,8 ± 123,4	
mediana (mín.; máx.)	54,7 (15,7; 197,5)	93,6 (14,2; 574,9)	
TNF beta (ng/mL)			0,152

média ± DP	0,27 ± 0,16	0,4 ± 0,27
mediana (mín.; máx.)	0,24 (0,06; 0,46)	0,35 (0,08; 1,3)
Teste Mann-Whitney		

Tabela 12 - Comparação das medidas das citocinas no grupo alergia ocular em períodos de coleta diferentes

Variável	Alergia ocular		p
	2013 (N = 5)	2014/2015 (N = 37)	
INFy (pg/mL)			0,472
média ± DP	205,8 ± 149,6	420,4 ± 561,1	
mediana (mín.; máx.)	161,1 (71,1; 463,2)	204,4 (49,5; 2683)	
IL-10 (pg/mL)			0,362
média ± DP	40,1 ± 34,5	122,8 ± 160	
mediana (mín.; máx.)	27,5 (21,1; 101,6)	43,1 (6,7; 700,7)	
IL-12(p70) (pg/mL)			0,342
média ± DP	115,3 ± 86,7	224,7 ± 280,2	
mediana (mín.; máx.)	72,7 (69,7; 269,7)	137,1 (24,8; 1327)	
IL-13 (pg/mL)			0,073
média ± DP	112,3 ± 78,2	256,7 ± 257,7	
mediana (mín.; máx.)	64,9 (60,9; 240,8)	160,2 (49,4; 1157)	
IL-15 (pg/mL)			0,383
média ± DP	123,2 ± 100,6	240,8 ± 280,5	
mediana (mín.; máx.)	71,2 (61,8; 299,9)	130,4 (25,7; 1327)	
IL-17A (ng/mL)			0,383
média ± DP	88,9 ± 61,5	144 ± 133,1	
mediana (mín.; máx.)	56,9 (53; 197)	109,1 (24,1; 635,8)	
IL-1beta (pg/mL)			0,221
média ± DP	49 ± 28,2	78,7 ± 60,6	
mediana (mín.; máx.)	35,5 (28,8; 96,5)	61,8 (15,4; 287,4)	
IL-33 (pg/mL)			0,237
média ± DP	347,1 ± 305,8	640,3 ± 639,6	
mediana (mín.; máx.)	191,5 (166,8; 882,7)	488 (47,2; 2983)	
IL-2 (pg/mL)			0,237
média ± DP	76,2 ± 57,2	132 ± 121	
mediana (mín.; máx.)	45,3 (37,4; 171,7)	98,8 (22,9; 608,9)	
IL-4 (ng/mL)			0,237
média ± DP	0,36 ± 0,26	0,66 ± 0,73	
mediana (mín.; máx.)	0,32 (0,2; 0,8)	0,42 (0,1; 3,3)	
IL-23 (ng/mL)			0,221
média ± DP	30,2 ± 31	62,1 ± 63,1	
mediana (mín.; máx.)	12,9 (10,4; 83,1)	46,4 (1,8; 291,1)	
IL-5 (pg/mL)			0,221
média ± DP	109,8 ± 56,5	350,3 ± 572	
mediana (mín.; máx.)	83,5 (72,7; 209,4)	134,1 (33; 3121)	
IL-6 (pg/mL)			0,472
média ± DP	211,3 ± 216,5	296,1 ± 334,9	
mediana (mín.; máx.)	109 (42; 551)	159,8 (23; 1758)	
IL-31 (ng/mL)			0,286
média ± DP	0,64 ± 0,57	1,25 ± 1,43	
mediana (mín.; máx.)	0,41 (0,29; 1,64)	0,87 (0,13; 6,47)	
TNF alfa (pg/mL)			0,193
média ± DP	101,3 ± 87,5	191,8 ± 206,3	

mediana (mín.; máx.)	63,6 (47,1; 254,6)	123,8 (22,6; 926,4)	0,253
TNF beta (ng/mL)			
média ± DP	0,36 ± 0,25	0,58 ± 0,51	
mediana (mín.; máx.)	0,22 (0,21; 0,79)	0,44 (0,1; 2,13)	
Teste Mann-Whitney			

Tabela 13 – Distribuição do grupo de estudo nos dois períodos de coleta

Grupo Geral	Grupo data		Total (N = 134)	p
	2013 (N = 33)	2104/2015 (N = 101)		
Controle	5 (15,2)	13 (12,9)	18 (13,4)	0,470
Alergia ocular	16 (48,5)	39 (38,6)	55 (41)	
Ceratocone	12 (36,4)	49 (48,5)	61 (45,5)	

Teste da razão de verossimilhanças

Na pesquisa de correlação da osmolaridade de lágrima, diferença da osmolaridade entre os olhos (delta osmol) , índice OSDI, prurido questionado e questionário de alergia (QA) com dosagem de citocinas ,observou-se: (Tabelas 14,15,16)

- Correlação direta das medidas de todas as IL com a diferença de osmolaridade entre os olhos (delta osmol) no grupo controle ($p < 0,05$);
- Nenhuma correlação positiva no grupo AO ($p > 0,05$);
- Correlação direta das medidas de IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa com o OSDI no grupo ceratocone ($p = 0,044$; $p = 0,010$; $p = 0,0047$), respectivamente .

Tabela 14 - Correlação dos achados clínicos com a dosagem das citocinas no grupo controle

Correlação		Controle				
		Osmolaridade ¹	Delta ² Osmolaridade	Prurido ³ questionado	OSDI ⁴	QA ⁵
INFy (pg/mL)	r	0,482	0,698	0,287	0,083	0,083
	p	0,069	0,004	0,299	0,768	0,769
IL-10 (pg/mL)	r	0,479	0,712	0,245	0,042	(0,006)
	p	0,071	0,003	0,379	0,883	0,982
IL-12(p70) (pg/mL)	r	0,375	0,625	0,267	0,033	0,065
	p	0,168	0,013	0,335	0,908	0,818
IL-13 (pg/mL)	r	0,393	0,513	0,216	0,018	0,204
	p	0,147	0,050	0,440	0,949	0,467
IL-15 (pg/mL)	r	0,424	0,638	0,255	0,000	0,069
	p	0,116	0,011	0,359	1,000	0,806
IL-17A (pg/mL)	r	0,396	0,639	0,307	0,029	0,103
	p	0,143	0,010	0,266	0,919	0,716
IL-1beta (pg/mL)	r	0,347	0,618	0,321	0,049	0,148
	p	0,205	0,014	0,244	0,863	0,599
IL-33 (pg/mL)	r	0,436	0,670	0,349	0,074	0,116
	p	0,104	0,006	0,202	0,793	0,682
IL-2 (pg/mL)	r	0,350	0,616	0,229	0,014	0,044
	p	0,201	0,014	0,412	0,959	0,876
IL-4 (pg/mL)	r	0,347	0,625	0,216	0,045	0,057
	p	0,205	0,013	0,439	0,873	0,840
IL-23 (pg/mL)	r	0,416	0,670	0,359	0,087	0,128
	p	0,123	0,006	0,189	0,758	0,649
IL-5 (pg/mL)	r	0,461	0,693	0,267	0,101	0,007
	p	0,084	0,004	0,335	0,720	0,980
IL-6 (pg/mL)	r	0,343	0,574	0,267	(0,013)	0,133
	p	0,211	0,025	0,335	0,964	0,636
IL-31 (pg/mL)	r	0,406	0,654	0,333	0,058	0,128
	p	0,134	0,008	0,225	0,838	0,649
TNF alfa (pg/mL)	r	0,354	0,572	0,307	0,000	0,173
	p	0,196	0,026	0,266	1,000	0,538
TNF beta (pg/mL)	r	0,436	0,657	0,281	0,029	0,086
	p	0,104	0,008	0,310	0,919	0,759

Correlação de Spearman

¹Osmolaridade: foi considerado o maior valor medido entre olho esquerdo e direito em cada paciente;

²Delta Osmolaridade é a diferença da osmolaridade medida entre os dois olhos;

³Prurido questionado: a intensidade do prurido foi calculado com numeração de 0 a quatro, em questionário tipo Likert, obtido de forma direta;

⁴QA é o índice obtido do questionário para diagnóstico de alergia ocular, em que valor maior ou igual a dez é preditivo de alergia ocular;

⁵OSDI é o índice obtido do questionário para sintomas de doença da superfície ocular (0 a 100)

Tabela 15 - Correlação dos achados clínicos com a dosagem das citocinas no grupo com alergia ocular

Correlação		Alergia ocular				
		Osmolaridade ¹	Delta ² Osmolaridade	Prurido ³ questionado	OSDI ⁴	QA ⁵
INFy (pg/mL)	r	0,181	0,259	(0,205)	(0,035)	(0,200)
	p	0,257	0,106	0,192	0,823	0,205
IL-10 (pg/mL)	r	(0,017)	0,240	0,016	0,158	(0,025)
	p	0,916	0,137	0,919	0,317	0,877
IL-12(p70) (pg/mL)	r	0,142	0,285	-0,233	0,003	(0,177)
	p	0,375	0,075	0,137	0,987	0,263
IL-13 (pg/mL)	r	0,006	0,227	(0,106)	0,098	(0,184)
	p	0,970	0,158	0,506	0,536	0,242
IL-15 (pg/mL)	r	0,081	0,246	(0,236)	0,047	(0,197)
	p	0,614	0,126	0,133	0,767	0,210
IL-17A (pg/mL)	r	0,072	0,238	(0,245)	(0,027)	(0,207)
	p	0,653	0,139	0,117	0,867	0,188
IL-1beta (pg/mL)	r	(0,021)	0,218	(0,106)	0,064	(0,119)
	p	0,897	0,177	0,505	0,685	0,454
IL-33 (pg/mL)	r	0,113	0,260	(0,273)	(0,024)	(0,210)
	p	0,481	0,106	0,080	0,880	0,183
IL-2 (pg/mL)	r	0,104	0,282	(0,246)	0,021	(0,238)
	p	0,516	0,078	0,117	0,894	0,129
IL-4 (pg/mL)	r	(0,059)	0,205	(0,055)	0,077	(0,178)
	p	0,712	0,205	0,727	0,628	0,260
IL-23 (ng/mL)	r	0,125	0,267	(0,283)	(0,014)	(0,225)
	p	0,435	0,096	0,069	0,928	0,152
IL-5 (pg/mL)	r	(0,120)	0,191	0,012	0,135	(0,028)
	p	0,454	0,237	0,938	0,395	0,862
IL-6 (pg/mL)	r	(0,131)	0,099	0,023	0,061	0,046
	p	0,416	0,543	0,883	0,701	0,770
IL-31 (ng/mL)	r	0,074	0,223	(0,250)	(0,002)	(0,208)
	p	0,645	0,166	0,111	0,992	0,187
TNF alfa (pg/mL)	r	0,035	0,230	(0,212)	(0,004)	(0,196)
	p	0,826	0,154	0,178	0,980	0,215
TNF beta (pg/mL)	r	0,108	0,237	(0,296)	0,018	(0,211)
	p	0,503	0,141	0,057	0,910	0,180

Correlação de Spearman

¹Osmolaridade: foi considerado o maior valor medido entre olho esquerdo e direito em cada paciente;

²Delta Osmolaridade é a diferença da osmolaridade medida entre os dois olhos

³Prurido questionado: a intensidade do prurido foi calculada com numeração de zero a quatro, em questionário tipo *Likert*, obtido de forma direta, sendo zero = não e quatro = sim, incapacitante;

⁴QA é o índice obtido do questionário para diagnóstico de alergia ocular, em que valores maior ou igual a dez são preditivos de diagnóstico de alergia ocular;

⁵OSDI é o índice obtido do questionário para sintomas de doença da superfície ocular (0 a 100)

Tabela 16 - Correlação dos achados clínicos com a dosagem das citocinas no grupo com ceratocone

Correlação		Ceratocone				
		Osmolaridade ¹	Delta ² Osmolaridade	Prurido ³ questionado	OSDI ⁴	QA ⁵
INFy (pg/mL)	r	0,030	(0,080)	(0,184)	0,179	(0,098)
	p	0,834	0,580	0,205	0,214	0,499
IL-10 (pg/mL)	r	(0,047)	(0,086)	(0,143)	0,187	(0,073)
	p	0,744	0,551	0,328	0,194	0,613
IL-12(p70) (pg/mL)	r	0,018	(0,097)	(0,160)	0,226	(0,052)
	p	0,901	0,505	0,274	0,114	0,722
IL-13 (pg/mL)	r	0,095	0,017	(0,078)	0,179	(0,013)
	p	0,511	0,906	0,596	0,213	0,931
IL-15 (pg/mL)	r	(0,046)	(0,100)	(0,158)	0,168	(0,064)
	p	0,749	0,488	0,277	0,243	0,660
IL-17A (ng/mL)	r	(0,023)	(0,103)	(0,116)	0,255	(0,068)
	p	0,875	0,478	0,427	0,074	0,640
IL-1beta (pg/mL)	r	(0,005)	(0,085)	(0,104)	0,286	(0,027)
	p	0,973	0,558	0,477	0,044	0,854
IL-33 (pg/mL)	r	(0,022)	(0,086)	(0,124)	0,266	(0,059)
	p	0,878	0,551	0,396	0,062	0,684
IL-2 (pg/mL)	r	0,016	(0,085)	(0,121)	0,179	(0,037)
	p	0,913	0,557	0,409	0,214	0,799
IL-4 (ng/mL)	r	(0,025)	(0,098)	(0,129)	0,180	(0,042)
	p	0,862	0,497	0,376	0,212	0,772
IL-23 (ng/mL)	r	(0,026)	(0,088)	(0,145)	0,264	(0,086)
	p	0,859	0,545	0,321	0,063	0,552
IL-5 (pg/mL)	r	(0,059)	(0,133)	(0,179)	0,204	(0,109)
	p	0,683	0,356	0,218	0,156	0,451
IL-6 (pg/mL)	r	(0,174)	(0,235)	0,087	0,360	0,088
	p	0,226	0,100	0,553	0,010	0,545
IL-31 (ng/mL)	r	(0,036)	(0,098)	(0,116)	0,273	(0,042)
	p	0,802	0,499	0,427	0,055	0,771
TNF alfa (pg/mL)	r	(0,023)	(0,086)	(0,083)	0,283	(0,022)
	p	0,872	0,553	0,571	0,047	0,878
TNF beta (ng/mL)	r	0,004	(0,079)	(0,130)	0,269	(0,041)
	p	0,977	0,584	0,374	0,059	0,776

Correlação de *Spearman*

Não foi possível identificar correlação positiva entre osmolaridade de lágrima e índice OSDI. (Tabela 17)

Tabela 17 - Correlação da osmolaridade da lágrima com sintomas de doença da superfície ocular (OSDI)

Variável	Grupo	r	p	N
Correlação Osmolaridade com OSDI	Controle	0,090	0,723	18
	Alergia ocular	(0,115)	0,409	54
	Ceratocone	0,098	0,452	61
	Total	(0,072)	0,407	133

Correlação de *Spearman*

6. Discussão

Na última década, com o advento de novas técnicas laboratoriais, que permitiram a análise de diversos antígenos em um único ensaio com pequenas amostras, foi possível pesquisar aspectos inflamatórios na superfície ocular, por meio da análise da composição molecular da lágrima⁶⁹. Isso contribuiu muito para os recentes avanços no conhecimento acerca do mecanismo fisiopatogênico de algumas doenças, como a alergia ocular (AO), síndrome do olho seco e ceratocone, dentre outras.

No presente estudo, avaliou-se e comparou-se clinicamente 134 pacientes distribuídos em 3 grupos distintos: grupo ceratocone, grupo alergia ocular e grupo controle. Em 107/134 desses participantes, foi possível coletar amostras da lágrima basal com capilares de vidro de forma atraumática e dosar 16 diferentes tipos de citocinas (mínimo de 5 microlitros). Em todas as amostras analisadas, constatou-se a presença das 16 citocinas dosadas, as quais foram correlacionadas com os achados clínicos diretos e indiretos de inflamação da superfície ocular.

Nos três grupos estudados, observou-se alta prevalência de alergia, com destaque a ocorrência de rinite alérgica, embora no grupo controle houvesse apenas história pessoal de rinite alérgica, sem sintomas oculares no momento do estudo. Esse achado pode estar relacionado ao grande número de pacientes sensibilizados aos aeroalérgenos sazonais, a exemplo de regiões similares e, portanto, novas pesquisas são necessárias para o esclarecimento da importância deste aspecto na prevalência das reações de hipersensibilidade

e no impacto dessas sobre as doenças oculares constatadas na região em que se aplicou o estudo ⁷⁸.

A história pessoal de rinite alérgica, sem sintomas oculares positivos em 55% (10/18) do grupo controle, pode ser considerada como um viés na seleção utilizada para este grupo, conquanto se deva ressaltar, que as ferramentas diagnósticas utilizadas neste estudo, como o questionário de alergia (QA) e o exame clínico com alergista e oftalmologista, não identificaram nos pacientes controle, qualquer sintoma ou sinal que pudesse evidenciar a presença de alergia ocular. Ademais, na metodologia aplicada a este estudo, a avaliação clínica e a coleta de lágrima, ocorreu sempre nos meses considerados como de elevado índice de dispersão polínica (gramíneas) (agosto a janeiro), com o intuito de evitar alocar pacientes com conjuntivite alérgica sazonal (CAS), no grupo controle.

Dessa forma, com a análise dos dados acima, fica evidente que a dificuldade diagnóstica, especialmente nos pacientes com conjuntivite alérgica leve, perene (CAP) ou sazonal (CAS), pode levar a um subdiagnóstico dessas enfermidades cujos casos não diagnosticados e, portanto, não tratados venham a apresentar inflamação na superfície ocular secundária ao prurido ocular.

O dano ao epitélio da superfície ocular devido ao prurido crônico, tem sido relacionado ao aumento de algumas moléculas inflamatórias como IL-1beta, TNF-alfa e metaloproteinases (MMP) 9 e 13^{12, 93}. Em conjunto, essas moléculas podem favorecer o início de uma cascata inflamatória; levando à ativação de diversos subtipos de linfócitos - Th-17, Th-1, Th-2; células como

mastócitos e eosinófilos; apoptose de ceratócitos; defeitos na membrana de *Bowman*; ativação de metaloproteinases, liberação de IL-31 e de IL-33^{25, 26, 45, 94}.

Neste estudo, observou-se aumento na osmolaridade de lágrima e correlação positiva de IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa ($p=0,044$; $p=0,010$; $p=0,047$ – respectivamente) com maior índice de doença de superfície ocular (OSDI) no grupo ceratocone. Nesses pacientes, o índice de intensidade de prurido e a osmolaridade da lágrima (314 ± 19 mOsm/L), foram elevados. Analisados em conjunto, pode-se concluir que pacientes com ceratocone apresentaram inflamação na superfície ocular, associada ao prurido e à hiperosmolaridade.

Outro aspecto importante a ser destacado, foi o encontro da elevada prevalência 40,98% (25/61) de alergia ocular leve (conjuntivite alérgica sazonal e conjuntivite alérgica perene) e história pessoal de alergia 68,85% (42/61) nos pacientes com ceratocone. Esses achados não coincidem com outros estudos em que se percebe a presença de casos de CA mais graves, associadas ao ceratocone^{4, 95}. Porém, está de acordo com recente estudo, o qual não foi capaz de confirmar elevada frequência de ceratocone em pacientes com ceratoconjuntivite vernal conforme previamente descrito⁹⁶. Tais achados, alertam para a necessidade de acompanhamento rotineiro de pacientes com alergia ocular por meio de exames de imagem para detecção precoce da ectasia, principalmente nos casos leves, os quais tendem a ser geralmente negligenciados. Estudo realizado na Índia²⁰, concluiu que a instituição de acompanhamento rotineiro por meio de topografia de córnea em pacientes com alergia ocular deve ser estabelecida como forma de diagnóstico precoce e controle na evolução da ectasia.

A apoptose de ceratócitos é descrita no ceratocone e em casos de contato do estroma da córnea com IL-1beta produzida pelo epitélio corneano lesionado²⁴. Os achados do presente estudo foram compatíveis com esse mecanismo fisiopatológico, considerando-se a correlação direta entre o nível de IL-1 beta e os índices de doença de superfície ocular (OSDI)(p=0,044) nos pacientes com ceratocone. No grupo CA, foi encontrado aumento do OSDI e a maior intensidade de prurido ocular. Analisando em conjunto esses achados, pôde-se estabelecer uma associação entre prurido ocular, inflamação, alergia e ceratocone.

Dessa forma, lesões na superfície ocular decorrentes do prurido contínuo relacionam-se com liberação de IL-1beta e de IL-33, secretadas pelas células epiteliais ou fibroblastos danificados pela ação mecânica do ato de coçar. Essas citocinas podem estimular várias células do sistema imune, contribuindo para a ativação de linfócitos Th-2 e Th-17, eosinófilos e mastócitos, e liberação de IL-31, mantendo um feedback inflamatório positivo na superfície do olho e, conseqüentemente, causando danos à estrutura da córnea^{26, 94}.

Portanto, a IL-31 observada na lágrima de todos os pacientes estudados, embora não tenha sido correlacionada a sintomas e a sinais inflamatórios ou intensidade de prurido, deve sinalizar para a possibilidade do envolvimento desta, em processos inflamatórios na superfície ocular e, em especial, aos casos de prurido intenso ou alergia ocular grave como ceratoconjuntivite atópica (CCA) e a ceratoconjuntivite vernal (CCV)²⁷.

Existe evidência de que a presença de IL-31, previne a apoptose dos eosinófilos, desencadeia o prurido, retroalimenta o perfil de linfócitos Th-2 e

interfere na produção de filagrina. As ações da IL-31 e da filagrina, na fisiopatogenia da dermatite atópica, são bem estabelecidas⁹⁷.

A filagrina é uma proteína relacionada à biologia cicatricial e maturidade de células, sendo clara sua relação com defeitos de barreira na dermatite atópica. Na estrutura da córnea, as camadas profundas das células epiteliais e a sua importância na maturidade e migração celular têm sido descritas. Na córnea, a presença da filagrina ocorre nas camadas profundas do epitélio e a exemplo do que ocorre na dermatite atópica. Especula-se que a disfunção desta proteína possa estar envolvida em alterações de barreira no epitélio corneano e, portanto, no mecanismo fisiopatológico do ceratocone²³.

Os pacientes com AO, apresentaram QA, OSDI e índice de intensidade de prurido ocular maior que os pacientes controle. Também observou-se aumento de INF-gama, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-31 e TNF-beta na lágrima quando comparadas ao grupo ceratocone. Porém, ao se comparar o valor das citocinas entre os subgrupos de AO (CAP,CAS,CCV,CCA), não foi possível encontrar diferença. Este achado é contraditório com alguns estudos que demonstram perfis de citocinas diferentes nas diversas subclasses de conjuntivite alérgica, especialmente na CCV, cujo nível de IL-4 e de eotaxina mais elevados têm sido descritos^{44, 98}

Dessa forma, pode-se inferir que algumas variáveis tenham sido responsáveis por este achado, entre elas, o fato de pacientes com ceratoconjuntivite, participantes do estudo, estarem sem medicação e, portanto, muito sintomáticos, o que pode ter favorecido o observado lacrimejamento aumentado e assim subestimando o nível das citocinas dosadas por diluição.

Outrossim, com os novos conhecimentos sobre as interações celulares e os mecanismos imunológicos mediados por IL, observa-se que as respostas inflamatórias para uma mesma doença podem variar em decorrência de fatores genéticos ou ambientais.

Deve-se ainda ressaltar que, embora não tenha sido pesquisada a presença de metaloproteinases nesse estudo, a presença de IL-6 associada ao índice OSDI no grupo com ceratocone e a presença de IL-17A aumentada no grupo com alergia apontam para uma provável ativação dessas enzimas⁹⁴. As metaloproteinases, em especial a 9 e a 13, têm forte associação com a degradação do colágeno, com o ceratocone e a conjuntivite alérgica. Em estudo recentemente publicado, o uso de ciclosporina foi capaz de reduzir a evolução do ceratocone e a atividade das metaloproteinases, confirmando a ação dessas enzimas e a presença de inflamação no ceratocone¹⁴.

Por outro lado, a presença de correlação positiva entre a diferença da osmolaridade entre os olhos e a dosagem de IL no grupo controle favorece a possibilidade de os fatores regionais, como altitude elevada e clima subtropical, contribuírem para uma instabilidade do filme lacrimal e por conseguinte, para a inflamação da superfície ocular nesses indivíduos.

A osmolaridade lacrimal tem sido considerada, isoladamente, o melhor marcador para diagnóstico e acompanhamento de síndrome do olho seco⁹⁹. Estudos apontam para valores médios de 308 mOsm/L a 316 mOsm/L^{74, 76} como ponto de corte para diferenciar pacientes normais, de pacientes com síndrome do olho seco. Outro estudo recente encontrou a média de 296,5 +/- 9,8mOsm/L¹⁰⁰ em pacientes sadios utilizando-se da mesma metodologia adotada no presente estudo. Outras pesquisas utilizam a diferença entre as

medidas de osmolaridade dos olhos, como fator preditivo de olho seco, por considerarem que diferença, quando elevada, indica instabilidade do filme lacrimal⁷⁶. Além disso, a correlação do aumento da osmolaridade lacrimal com elevadas altitudes, tem sido reportada¹⁰¹.

Vale ainda observar que na comparação entre os grupos, o grupo com ceratocone teve osmolaridade maior que o grupo CA, porém similar ao grupo controle e que a média da osmolaridade nestes dois grupos (controle e ceratocone) (314 ± 19 mOsm/L) foi maior que a observada na população em geral ($296,5 \pm 9,8$ mOsm/L)¹⁰⁰, evidenciando um fator que pode estar relacionado a características regionais. Contraditoriamente, os pacientes com CA tiveram níveis mais baixos de osmolaridade, embora níveis mais altos de OSDI, o que evidencia a diluição da lágrima por lacrimejamento e diminuição na osmolaridade.

Os índices OSDI e a dosagem de osmolaridade na lágrima, são instrumentos validados para abordagem no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com síndrome do olho seco⁹⁹. Neste estudo, não foi observada correlação entre essas duas medidas nos três grupos estudados. Porém, valores elevados da osmolaridade e índice OSDI nos casos de pacientes com ceratocone e alergia ocular, demonstram a presença de alteração na superfície dos olhos desses indivíduos.

Finalmente, não houve diferença significativa no nível das IL dosadas em períodos diferentes. Sendo assim, este estudo foi capaz de demonstrar adequada estabilidade das IL nas amostras de lágrima congeladas a -80°C por período prolongado (maior que 24 meses), o que pode favorecer a perspectiva de estudos mais amplos e multicêntricos conforme sugerido por outros

pesquisadores⁶⁹. No entanto, a padronização na coleta, diluição e análise são necessárias para viabilizar a comparação dos resultados entre diferentes estudos e possibilitar o esclarecimento da complexa fisiopatologia das doenças da superfície ocular e suas implicações na manifestação e evolução do ceratocone.

7. Conclusão

Nas condições de realização deste estudo, concluiu-se que:

1. Na região sul do Brasil, pacientes com ceratocone (CE) apresentam média de osmolaridade na lágrima elevada (314 ± 19 mOsmos/L), alta prevalência de formas leves de alergia ocular (conjuntivite alérgica sazonal e conjuntivite alérgica perene)(40,98%), alta prevalência de história familiar de ceratocone (31,15%) e intensidade de prurido ocular elevada. Pacientes com alergia ocular (AO) apresentam alta prevalência de rinite alérgica (96,3%), média de osmolaridade na lágrima inferior ao grupo CE ($303,4 \pm 8,8$ mOsmol/L) ($p=0,043$), intensidade de prurido ocular elevada e maior que grupo CE ($p < 0,001$), e alta prevalência de história familiar de ceratocone (9%).
2. Pacientes com AO apresentam níveis de IFN-gama, IL-13, IL-15, IL-17^A, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-31 e TNF-beta na lágrima mais elevados quando comparados ao grupo CE, comprovando perfil inflamatório.
3. O aumento no índice de doença de superfície ocular (OSDI) e a maior intensidade de prurido ocular nos grupos AO e CE comparados ao grupo CO, constata a presença de inflamação na superfície ocular nesses grupos. A correlação direta do índice OSDI com IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa ($p=0,044$; $p=0,010$; $p=0,0047$); elevada osmolaridade e intensidade de prurido, demonstram inflamação na superfície ocular do grupo CE. A presença de correlação direta entre a diferença da osmolaridade entre os olhos e o nível de citocinas no grupo controle, apontam para uma

instabilidade lacrimal na superfície ocular de pacientes da região sul do Brasil.

4. O grupo CE apresenta menor espessura da córnea, maior ceratometria média, menor ARTmax e maior BADd quando comparados ao grupo AO e CO. Pacientes com AO não apresentam parâmetros tomográficos de córnea estatisticamente diferentes dos pacientes controle.
5. Os pacientes com CE sem alergia ocular e CE com alergia ocular, não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos níveis de citocinas dosadas na lágrima.
6. Não houve diferença estatisticamente significativa na dosagem de citocinas entre os diferentes subtipos de alergia ocular estudados (CCA, CCV, CAS, CAP).
7. Foi possível encontrar IL-31 em todas as amostras de lágrimas estudadas, entretanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre intensidade do prurido e nível de IL-31.

ANEXO A - Aprovação do comitê de ética em pesquisa

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **25/09/2013**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **384/13** intitulado: **“INTERLEUCINA-31 EM LÁGRIMA: PRURIDO, ALERGIA OCULAR E CERATOCONEESTUDO TRANSVERSAL”** apresentado pelo **Departamento de OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: DRA. RUTH MIYUKI SANTO

Pesquisador (a) Executante: LEDA DAS NEVES ALMEIDA SANDRIN

CEP-FMUSP, 26 de Setembro de 2013.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B - Carta de autorização de diretor técnico da Clínica Sandrin

**À Clínica Oftalmológica
Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo**

Chapecó, 24 de janeiro de 2013.

Através desta declaro que o responsável pela Clínica Médica Sandrin S/S, localizada na rua Barão do Rio Branco, 300E, sala 314, centro, cidade de Chapecó, Santa Catarina, CNPJ: 05.916.336/0001-12, inscrição municipal: 0286966, está ciente do Projeto: **"IL-31 em lágrima: prurido, alergia ocular e ceratocone"** e autoriza a inclusão de seus pacientes neste estudo nos seguintes aspectos:

1. Seleção e recrutamento de cinquenta pacientes com ceratocone, cinquenta pacientes com alergia ocular e sem ceratocone e cinquenta pacientes controle sem ceratocone e sem alergia ocular, atendidos nesta Clínica, pelo Departamento de Alergia e Imunologia Clínica e ou Departamento de Oftalmologia, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido conforme protocolo do referido trabalho.
2. Exame clínico alergológico e oftalmológico, coleta de lágrima e citologia de impressão nas dependências desta clínica dos pacientes supracitados conforme protocolo da pesquisa, realizados pelos seguintes médicos:
 - Dra Leda das Neves Almeida Sandrin, CRM 6039/SC, especialista em Alergia e Imunologia Clínica.
 - Dr Luciano Sandrin, CRM 6040/SC, especialista em Oftalmologia e subespecialista em córnea.
3. Exame de topografia e tomografia de córnea e aferição da pressão intraocular.

Os seguintes aparelhos deste serviço serão disponibilizados para a pesquisa:

1. Tomógrafo PENTACAM, Oculus Pentacam HR TYP:70900.
2. Topógrafo Eye-Sys System 2000.
3. Tonômetro de contorno dinâmico Pascal, Ce0297, Mod 311111002
4. Refrator Topcon VT10
5. Projetor Optotipos Opto Science in Sight Magis
6. Biomicroscópio Topcon SI-7E
7. Tonômetro de aplanção Goldmann Haag-Streit 1250 AT 900

**Luciano Sandrin, CRM 6040
Diretor técnico**

Diretor Técnico: Dr. Luciano Sandrin | CRM 6040 | Especialista em Oftalmologia | Sub-especialista em Córnea | Membro Titular Ativo da American Academy of Ophthalmology (AAO) | Membro Titular Ativo da International Society of Refractive Surgery (ISRS)
Rua Barão do Rio Branco, 300-E | Ed. Policlínica Santo Antônio | SL 314 e 315 | Chapecó-SC | CEP: 89.802-100 | Fone: (49) 3323.9000 | 3323.1885
admsandrin@desbrava.com.br | www.clinicasandrin.com.br

ANEXO C - Termo de consentimento livre e esclarecido

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.

NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO:

BAIRRO:

CIDADE

CEP:.....

TELEFONE:

DDD

(.....)

2.RESPONSÁVEL

LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: N°

APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Interleucina-31 em lágrima: prurido, alergia ocular e ceratocone”.

PESQUISADOR responsável: Dra. Ruth Miyuki Santo

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente/Pesquisadora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N°: 57390/SP

UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Oftalmológica

PESQUISADOR executante: Dra Leda das Neves Almeida Sandrin

CARGO/FUNÇÃO: Pós-graduanda no serviço de oftalmologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N°: 6039/SC

UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Oftalmológica

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos (25/11/2013 a 25/11/2015).

1- DESENHO DO ESTUDO E OBJETIVO

Você está sendo convidado a participar de um estudo clínico envolvendo pessoas que apresentam conjuntivite alérgica (alergia ocular), ceratocone (córnea cônica) ou nenhuma das doenças anteriores. Sua participação deve ser voluntária.

A conjuntivite alérgica é uma doença que acomete a superfície ocular, causando inflamação de conjuntiva (olho vermelho e inchado), secreção e lacrimejamento. Pode se apresentar como quadros leves e crônicos (em casos de alergia a poeira doméstica) ou leves e sazonais (em casos de alergia a pólen). Outras vezes, as conjuntivites alérgicas são mais intensas (casos de ceratoconjuntivite vernal e atópica). Todas as conjuntivites alérgicas apresentam um sintoma comum: O prurido (coceira) nos olhos.

O ceratocone, é uma doença degenerativa da córnea, que causa a alteração da curvatura da mesma e consequente alteração visual como miopia e astigmatismo irregular, sendo seu aparecimento frequente na adolescência. Embora a doença tenha características clínicas bem determinadas, não estão totalmente esclarecidos seus mecanismos causais e tem sido descrito que um dos fatores que favorece o aparecimento do mesmo é o prurido constante nos olhos. Sabe-se também, que alguns tipos de conjuntivites alérgicas crônicas favorecem ao aparecimento precoce do ceratocone.

A região de Chapecó tem características climáticas e espécies cultivadas que favorecem a dispersão de pólen. É frequente durante os meses de agosto a dezembro o aparecimento de um grande número de pacientes com sintomas de rinoconjuntivite alérgica, popularmente denominada de “polinose”. Estudos demonstraram recentemente uma nova substância que pode ser responsável pelo prurido em pacientes alérgicos. Esta substância chama-se interleucina-31

O objetivo deste trabalho é pesquisar a presença da interleucina-31 na lágrima de pacientes com alergia ocular, ceratocone e comparar com pacientes sem alergia e sem ceratocone, correlacionando com a intensidade do prurido, da alergia, do ceratocone e dos tipos de alérgenos aos quais os pacientes estão sensibilizados (presença de alguns fatores ambientais da região) e comprovar a produção desta interleucina-31 nos olhos através da pesquisa genética da expressão da interleucina-31 e de seu receptor. Os resultados poderão demonstrar novos possíveis mecanismos para estas doenças e compreensão do perfil de alergia nestes pacientes.

2. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS

Para isso, você será submetido a exame clínico com médico alergista e oftalmologista rotineiros, tomografia e topografia da córnea, coleta de lágrima, coleta de material da conjuntiva do olho (parte branca), coleta de sangue da veia de seu braço (10ml, equivalente a uma colher de sopa cheia). Todos estes exames serão agendados e realizados em um único dia.

O exame médico com alergista e oftalmologista servirão para diagnosticar a intensidade de sua doença ou a inexistência da mesma. A coleta de lágrima servirá para medir a interleucina-31 e outras interleucinas e também para medir sua osmolaridade. Do material da citologia, será extraído o RNA da IL-31 e seu receptor. Com o sangue, será realizada a pesquisa para quais alérgenos você está sensibilizado (o que lhe causa alergia).

3. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ROTINEIROS E COMO SERÃO REALIZADOS

A. Exame clínico com alergista e oftalmologista de rotina, sem dilatação da pupila: Você responderá diretamente a um questionário escrito e padronizado sobre alergia ocular e olho seco, serão examinados olhos, nariz, ouvido, garganta e pulmão em exame clínico de rotina. Para exame oftalmológico completo, será utilizada uma gota de colírio anestésico em ambos os olhos. Tempo previsto de 30 minutos.

B. Realização de topografia e tomografia de córnea: São dois exames , realizados respectivamente com topógrafo eyesys e pentacam onde você ficará sentado, com o queixo apoiado e será orientado a olhar para uma pequena luz por período curto de tempo. Os aparelhos não encostam no olho. Tempo previsto de 4 minutos.

C. Dosagem de osmolaridade de lágrima: exame realizado através do aparelho TEARLAB^R, com chips descartáveis e individuais para cada paciente onde ocorre o contato do chip com a lágrima no canto inferior de ambos os olhos. Trata-se de um aparelho que encosta apenas na lágrima, com ponteiros descartáveis. O exame será realizado no momento da consulta oftalmológica. Tempo previsto: 30 segundos.

D. Coleta de dez microlitros de lágrima (menos de meia gota): Para este procedimento, o oftalmologista utilizará uma pipeta de vidro (pequeníssimo tubo de vidro não cortante e descartável), sob iluminação e visualização com lâmpada de fenda. A pipeta será colocada em contato com a lágrima na região inferior e lateral do olho escolhido para o estudo, sem encostar no tecido do olho para não estimular o lacrimejamento. Para coleta, o tempo previsto está descrito no item A.

E. A coleta do material da conjuntiva (parte branca do olho), consiste na aplicação de colírio anestésico (a mesma gota utilizada na consulta com o oftalmologista) e aplicação de um pequeno pedaço de papel filtro esterilizado na região inferior medial e lateral do olho escolhido para o estudo (parte branca inferior do globo ocular) com pequena pressão e logo após retirada deste papel, em um único olho. Tempo previsto: 30 segundos.

F. Coleta de sangue: Serão coletados 10ml de sangue periférico (uma seringa média cheia) por punção de veia com agulha estéril e descartável na região anterior do antebraço esquerdo ou direito, no laboratório do Hospital da Unimed de Chapecó. Esta coleta será realizada por técnico especializado do referido laboratório, que fica em frente a Clínica Médica Sandrin.

4. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS NOS PROCEDIMENTOS DOS ITENS 2 E 3

Os riscos esperados neste estudo são mínimos. Os seus dados para o estudo serão obtidos em uma única consulta pré-agendada, na qual você fará o exame clínico com o oftalmologista, alergista, responderá aos dois questionários validados (para olho seco e para alergia ocular) e fará os exames complementares.

A. O exame clínico não causará nenhum tipo de risco. Algum desconforto, tipo ardência ocular poderá ocorrer com o uso do colírio de anestésico local.

B. Topografia e tomografia de córnea: exames de imagem. Não causam nenhum tipo de desconforto. Não oferece risco a você. A tomografia utiliza método fotográfico e não radioativo.

C. A dosagem da osmolaridade da lágrima com aparelho Tearlab^R não oferece desconforto, tampouco risco.

D. A coleta de lágrima com microtúbulos não lhe oferecerá riscos. Entretanto, poderá causar algum desconforto relacionado ao tempo para coleta (cinco a dez minutos), tempo no qual você estará sentado e com queixo e testa acomodados ao biomicroscópio com iluminação fraca e deverá movimentar-se o mínimo possível.

E. Coleta de citologia de impressão conjuntival: Será realizada sob anestesia tópica (colírio, a mesma gota utilizada para exame de pressão intraocular). Poderá lhe causar pequena sensação de corpo estranho (cisco) no olho no qual foi realizada por pequeno tempo com recuperação espontânea.

F. Coleta de sangue: Serão coletados 10 ml, o que corresponde a uma seringa média cheia ou aproximadamente meia colher de sopa de sangue de uma veia do antebraço, parte anterior. Poderá causar desconforto relacionado à coleta (dor devido à picada) ou pós-coleta (hematoma discreto no local da coleta que desaparecerá em cerca de quatro a cinco dias, se ocorrer).

5. BENEFÍCIOS PARA O PARTICIPANTE

Não há benefício direto ou imediato a você. Entretanto, a pesquisa ajudará no melhor entendimento do mecanismo das doenças estudadas, particularmente na região sudoeste do Brasil podendo contribuir em futuros casos. Não há compensação financeira aos participantes do estudo.

6. RELAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS QUE POSSAM SER VANTAJOSOS, PELOS QUAIS O PACIENTE PODE OPTAR

Não se aplica

7. GARANTIA DE ACESSO

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas:

Dra. Leda das Neves Almeida Sandrin. Telefone 49 33239000. Rua Barão do Rio Branco, 300E, sala 314. Chapecó, Santa Catarina. **(Pesquisadora executante).**

Dra. Ruth Miyuki Santo. Telefone 11 26617871. Rua Dr Enéas de Carvalho, 255, 6º andar. **(Pesquisadora Principal).**

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Av. Dr. Arnaldo, 455 Cerqueira César - São Paulo – SP CEP: 01246-903 Fone/Fax: 55+11+3061-8004 E-mail: cep.fm@usp.br .

8. É GARANTIDA A LIBERDADE DA RETIRADA DE CONSENTIMENTO A QUALQUER MOMENTO E DEIXAR DE PARTICIPAR DO ESTUDO, SEM QUALQUER PREJUÍZO À CONTINUIDADE DE SEU TRATAMENTO NA INSTITUIÇÃO

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você não perderá benefícios de tratamento de saúde que de outra forma teria, se decidir não participar ou se desistir de participar do estudo a qualquer momento. Você ou seu representante legal, poderá a qualquer momento, e sem qualquer prejuízo, retirar o consentimento da guarda deste material, desde que formalizado por escrito, assinado, valendo a data deste.

9. DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE - AS INFORMAÇÕES OBTIDAS SERÃO ANALISADAS EM CONJUNTO COM OUTROS PACIENTES, NÃO SENDO DIVULGADO A IDENTIFICAÇÃO DE NENHUM PACIENTE

Qualquer informação coletada é estritamente confidencial. Seu nome nunca será revelado nos relatórios do estudo e sua identidade não será comunicada a terceiros, podendo ser fornecido apenas aos médicos envolvidos nesta pesquisa. Os dados obtidos na pesquisa poderão ser utilizados para futuras publicações, respeitando-se a sua confidencialidade.

10. DIREITO DE SER MANTIDO ATUALIZADO SOBRE OS RESULTADOS PARCIAIS DAS PESQUISAS, QUANDO EM ESTUDOS ABERTOS, OU DE RESULTADOS QUE SEJAM DO CONHECIMENTO DOS PESQUISADORES

Você poderá ter acesso a qualquer informação e qualquer dúvida sobre os resultados finais e parciais desta pesquisa.

11. DESPESAS E COMPENSAÇÕES: NÃO HÁ DESPESAS PESSOAIS PARA O PARTICIPANTE EM QUALQUER FASE DO ESTUDO, INCLUINDO EXAMES E CONSULTAS. TAMBÉM NÃO HÁ COMPENSAÇÃO FINANCEIRA RELACIONADA À SUA PARTICIPAÇÃO. SE EXISTIR QUALQUER DESPESA ADICIONAL, ELA SERÁ ABSORVIDA PELO ORÇAMENTO DA PESQUISA

Você não terá despesas com consultas e exames relacionados ao estudo. Não há compensação financeira para participação no estudo.

12. COMPROMISSO DO PESQUISADOR DE UTILIZAR OS DADOS E O MATERIAL COLETADO SOMENTE PARA ESTA PESQUISA

Os materiais doados para análise (sangue, lágrima e citologia de impressão) serão coletados na cidade de Chapecó, Santa Catarina. Sendo o sangue coletado no laboratório do Hospital da Unimed e a citologia de impressão e a lágrima na Clínica Médica Sandrin, com acompanhamento da pesquisadora executante, serão congelados a -80° C e transportados por empresa especializada até o LIM 60 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde ficarão armazenados.

Você será notificado em caso de extravio do material. Você, ou seu representante legal, poderá a qualquer momento e sem qualquer prejuízo, retirar o consentimento da guarda deste material, desde que formalizado por escrito, assinado, valendo a data deste.

Não haverá utilização comercial deste material.

O tempo de armazenamento previsto para este material é de 2 anos, podendo ser estendido por um período máximo de 10 anos, de acordo com normas do CONEP.

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO D - Questionário para alergia ocular

QUESTIONÁRIO PARA ALERGIA OCULAR

Questões 2,3,5 e 8 valem dois pontos cada. Outras questões, valem 1 ponto cada.

Conjuntivite alérgica = 10 pontos

1. Você alguma vez teve problema de coceira nos olhos?

Sim Não

2. Nos últimos 12 meses, você teve problemas com coceira nos olhos?

Sim Não

3. Alguma vez o problema com coceira nos olhos foi acompanhado de qualquer uma destas alterações: sair lágrima dos olhos, dificuldade para olhar para a luz ou sensação de areia nos olhos?

Nenhuma 1 a 3 4 a 12 Mais de 12

4. Nos últimos 12 meses, quantas vezes você apresentou qualquer uma destas alterações: sair lágrima dos olhos, dificuldade para olhar para a luz ou sensação de areia nos olhos?

Nenhuma 1 a 3 4 a 12 Mais de 12

5. Nos últimos 12 meses, quantas vezes você teve problemas com coceira nos olhos?

Nenhuma 1 a 3 4 a 12 Mais de 12

6. Nos últimos doze meses, de que forma o problema com os olhos interferiu nas suas atividades normais?

Nada Um pouco Moderado Muito

7. Nos últimos 12 meses, em que meses você teve problemas com os olhos?

☐ Janeiro	☐ Abril	☐ Julho	☐ Outubro
☐ Fevereiro	☐ Maio	☐ Agosto	☐ Novembro
☐ Março	☐ Junho	☐ Setembro	☐ Dezembro

8. Você já teve conjuntivite alérgica?

Sim Não

9. Alguma vez no passado teve chiado no peito?

Sim Não

10. Nos últimos 12 meses teve chiado no peito?

Sim Não

11. Alguma vez no passado você teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal quando não estava resfriado?

Sim Não

12. Nos últimos 12 meses, você teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal quando não estava resfriado?

Sim Não

13. Alguma vez na sua vida você teve mancha com coceira na pele (eczema), que aparecia e desaparecia por pelo menos seis meses?

Sim Não

14. Nos últimos 12 meses, você teve estas manchas na pele?

Sim Não

15. Alguma vez, essas manchas com coceira (eczema) afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos *Sim Não*

ANEXO E – Questionário de sintomas de doença ocular (OSDI)

OSDI

Data: _____ Nome: _____

Responda as perguntas abaixo e marque com um X a resposta que o senhor/senhora acha a mais correta.

Nos últimos 7 (sete) dias, você teve algumas dessas sensações:

		O tempo todo (4)	A maior parte do tempo (3)	A metade do tempo (2)	Em alguns momentos (1)	Em nenhum momento (0)
1	Olhos sensíveis à luz?					
2	Sensação de areia nos olhos?					
3	Dor ou irritação nos olhos?					
4	Visão embaçada?					
5	Olhos pesados ou cansados?					

Nos últimos 7 (sete) dias, por causa dos problemas nos seus olhos, o senhor/senhora teve dificuldades para realizar as seguintes tarefas - *mesmo quando o senhor estava usando óculos* :

		O tempo todo (4)	A maior parte do tempo (3)	A metade do tempo (2)	Em alguns momentos (1)	Em nenhum momento (0)	Não realizei esta atividade.
6	Ler?						
7	Dirigir ou ver nome do ônibus à noite?						
8	Trabalhar com o computador ou usar caixa eletrônico?						
9	Assistir à TV?						

Nos últimos 7 (sete) dias, seus olhos incomodaram o senhor/senhora em alguma destas situações:

	O tempo	A maior	A metade	Em alguns	Em nenhum	Não estive em lugar
--	---------	---------	----------	-----------	-----------	---------------------

		todo(4)	parte do tempo(3)	do tempo (2)	momentos (1)	momento (0)	assim na semana que passou
10	Lugares com vento?						
11	Lugares muito secos ou com pó?						
12	Lugares com ar- condicionado?						

ANEXO F- Ficha do paciente avaliação com alergista**FICHA DO PACIENTE - IL-31 em lágrimas- ALERGISTA**

1. Queixa Principal: _____

2. Antecedentes Pessoais de Atopia: _____

3. Antecedentes Familiares de Atopia: _____

4. Alergia Sistêmica (exame físico): _____

Asma:*

☐

Intermitente

☐

Persistente

☐

Leve

☐

Moderada

☐

Grave

Idade do diagnóstico: _____

Rinite Alérgica:**

☐

Intermitente

☐

Persistente

☐

Leve

☐

Moderada

☐

Grave

Idade do diagnóstico: _____

Dermatite Atópica:***

Localização: _____

Idade do diagnóstico: _____

* Classificação IV diretrizes brasileiras para manejo da asma – 2006

** Classificação ARIA

*** Diagnóstico segundo critérios de Hanifin e Rajka

ANEXO G - Ficha do paciente – avaliação com oftalmologista**1. Identificação**

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Raça:*

- indígena / branca / amarela / parda / preta

Profissão: _____

Endereço: _____ Nº _____

Comp.: _____ Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: _____

2. Queixa Principal: _____
_____**3. Sintomas Oculares**☐*Prurido*☐*Hiperemia*☐*Fotofobia*☐*Lacrimejamento*☐*Ardência*☐*Secreção*☐*Sensação de corpo estranho*

Registrar sintomas de acordo com a escala abaixo:

*0. Ausente**1. Presente, porém sem desconforto**2. Presente, produz desconforto**3. Presente, desconforto interfere nas atividades diárias do paciente**4. Incapacitante*

Outros: _____

4. Ceratocone

Idade do Diagnóstico: _____

5. Alergia Ocular

Idade do Diagnóstico: _____

Início dos Sintomas: _____

☐

Perene

☐

Sazonal

☐

Paroxístico

☐

Perene com paroxismo

6. Antecedente Familiar:

Ceratocone:

Não Sim Grau de Parentesco: _____

Alergia Ocular:

Não Sim Grau de Parentesco: _____

7. Medicamentos em Uso:

Sistêmicos: _____

Colírio: _____ Parou há: _____

8. Óculos:

Tempo de Uso: _____

Prescrição: OD: _____ OE: _____ Adição: _____

9. Lentes de Contato:

Tempo: _____ Tipo: _____ Parou há: _____

10. Exame Oftalmológico:

Acuidade visual sc OD: _____ OE: _____

cc OD: _____ OE: _____

OD: _____ OE: _____

PIO (Aplanação): _____

PIO (Pascall):

OD: _____

OE: _____

Osmolaridade TearLab

OD: _____

OE: _____

BIOMICROSCOPIA (assinalar se presente)

SINAIS	OD	OE
<i>Anel de Fleisher</i>		
<i>Estrias de Vogt</i>		
<i>Sinal de Rizzutti</i>		
<i>Espessamento de nervo</i>		
<i>Cicatrizes corneanas</i>		
<i>Sinal de Munson</i>		
<i>Afinamento do estroma</i>		
<i>Espessamento epithelial</i>		
<i>Hiperemia</i>		
<i>Edema palpebral</i>		
<i>Edema de conjuntiva bulbar</i>		
<i>Nódulos de Tranta</i>		
<i>Papilas (tarso superior)</i>		
<i>Papilas (tarso inferior)</i>		
<i>Edema de limbo</i>		
<i>Neovascularização</i>		
<i>Ceratite difusa</i>		
<i>Ceratite localizada</i>		

11. Diagnóstico:☐

Ceratocône: OD: _____

OE: _____

Grau: *

☐

Alergia Ocular:*

☐

CCV

☐

CCA

☐

CAS

☐

CAP

Outro: _____

* Critérios clínicos Asmler-Krumeich

12. Coleta de lágrima:

OD: _____

OE: _____

13. Citologia de Impressão: (conjuntiva bulbar temporal e medial inferior)

OD: _____ *OE:* _____

9. Referências Bibliográficas

1. Wisse RP, Kuiper JJ, Gans R, Imhof S, Radstake TR, Van der Lelij A. Cytokine Expression in Keratoconus and its Corneal Microenvironment: A Systematic Review. *Ocul Surf*. 2015 Oct;13(4):272-83.
2. Moreira LB, Alchieri JC, Belfort R, Jr., Moreira H. [Psychological and social aspects of patients with keratoconus]. *Arq Bras Oftalmol*. 2007 Mar-Apr;70(2):317-22.
3. Zadnik K, Barr JT, Edrington TB, Everett DF, Jameson M, McMahon TT, et al. Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998 Dec;39(13):2537-46.
4. Weed KH, MacEwen CJ, Giles T, Low J, McGhee CN. The Dundee University Scottish Keratoconus study: demographics, corneal signs, associated diseases, and eye rubbing. *Eye (Lond)*. 2008 Apr;22(4):534-41.
5. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998 Jan-Feb;42(4):297-319.
6. Jonas JB, Nangia V, Matin A, Kulkarni M, Bhojwani K. Prevalence and associations of keratoconus in rural maharashtra in central India: the central India eye and medical study. *Am J Ophthalmol*. 2009 Nov;148(5):760-5.
7. Varssano D, Kaiserman I, Hazarbassanov R. Topographic patterns in refractive surgery candidates. *Cornea*. 2004 Aug;23(6):602-7.
8. Ambrosio R, Jr., Alonso RS, Luz A, Coca Velarde LG. Corneal-thickness spatial profile and corneal-volume distribution: tomographic indices to detect keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2006 Nov;32(11):1851-9.
9. Ambrosio R, Jr., Klyce SD, Wilson SE. Corneal topographic and pachymetric screening of keratorefractive patients. *J Refract Surg*. 2003 Jan-Feb;19(1):24-9.
10. Jun AS, Cope L, Speck C, Feng X, Lee S, Meng H, et al. Subnormal cytokine profile in the tear fluid of keratoconus patients. *PLoS One*. 2011 Jan 27;6(1):e16437. PubMed PMID: 21298010.
11. Balasubramanian SA, Wasinger VC, Pye DC, Willcox MD. Preliminary identification of differentially expressed tear proteins in keratoconus. *Mol Vis*. 2013;19:2124-34. PubMed PMID: 24194634.
12. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Effects of eye rubbing on the levels of protease, protease activity and cytokines in tears: relevance in keratoconus. *Clin Exp Optom*. 2013 Mar;96(2):214-8.
13. Galvis V, Sherwin T, Tello A, Merayo J, Barrera R, Acera A. Keratoconus: an inflammatory disorder? *Eye (Lond)*. 2015 Jul;29(7):843-59. PubMed PMID: 25931166.

14. Shetty R, Ghosh A, Lim RR, Subramani M, Mihir K, Reshma AR, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-9 and inflammatory cytokines in keratoconus patients is inhibited by cyclosporine A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Feb 03;56(2):738-50.
15. Vichyanond P, Pacharn P, Pleyer U, Leonardi A. Vernal keratoconjunctivitis: a severe allergic eye disease with remodeling changes. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014 Jun;25(4):314-22.
16. Gautam V, Chaudhary M, Sharma AK, Shrestha GS, Rai PG. Topographic corneal changes in children with vernal keratoconjunctivitis: A report from Kathmandu, Nepal. *Cont Lens Anterior Eye*. 2015 Dec;38(6):461-5.
17. Santos MS, Alves MR, Freitas D, Sousa LB, Wainsztein R, Kandelman S, et al. Ocular allergy Latin American consensus. *Arq Bras Oftalmol*. 2011 Nov-Dec;74(6):452-6.
18. Leonardi A, Bogacka E, Fauquert JL, Kowalski ML, Groblewska A, Jedrzejczak-Czechowicz M, et al. Ocular allergy: recognizing and diagnosing hypersensitivity disorders of the ocular surface. *Allergy*. 2012 Nov;67(11):1327-37.
19. Ono SJ, Abelson MB. Allergic conjunctivitis: update on pathophysiology and prospects for future treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jan;115(1):118-22.
20. Sharma N, Rao K, Maharana PK, Vajpayee RB. Ocular allergy and keratoconus. *Indian J Ophthalmol*. 2013 Aug;61(8):407-9.
21. Solomon A. Corneal complications of vernal keratoconjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015 Oct;15(5):489-94.
22. McMonnies CW, Boneham GC. Keratoconus, allergy, itch, eye-rubbing and hand-dominance. *Clin Exp Optom*. 2003 Nov;86(6):376-84.
23. Lapp T, Auw-Haedrich C, Reinhard T, Evans R, Rodriguez E, Weidinger S, et al. Analysis of filaggrin mutations and expression in corneal specimens from patients with or without atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;163(1):20-4.
24. Netto MV, Ambrosio R, Jr., Chalita MR, Krueger RR, Wilson SE. [Corneal wound healing response following different modalities of refractive surgical procedures]. *Arq Bras Oftalmol*. 2005 Jan-Feb;68(1):140-9.
25. Nygaard U, Hvid M, Johansen C, Buchner M, Folster-Holst R, Deleuran M, et al. TSLP, IL-31, IL-33 and sST2 are new biomarkers in endophenotypic profiling of adult and childhood atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016 May 6.
26. Raap U, Weissmantel S, Gehring M, Eisenberg AM, Kapp A, Folster-Holst R. IL-31 significantly correlates with disease activity and Th2 cytokine levels in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012 May;23(3):285-8.

-
27. Eyerich K, Pennino D, Scarponi C, Foerster S, Nasorri F, Behrendt H, et al. IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jan;123(1):59-66 e4.
28. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010.
29. Lorenzon J. 02-Sucesso do PRV em produção de leite no oeste de SC, mais que uma técnica um sistema de manejo. *Cadernos de Agroecologia*. 2011;6(1).
30. Rover OJ, Lanzarin A. O cooperativismo de leite do oeste de Santa Catarina/Brasil e a inclusão sócio-econômica de agricultores familiares em condições vulneráveis. 2008.
31. Moreira PF, Gangl K, Vieira Fde A, Ynoue LH, Linhart B, Flicker S, et al. Allergen Microarray Indicates Pooideae Sensitization in Brazilian Grass Pollen Allergic Patients. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128402.
32. Sopelete MC, Moreira PF, Silva DA, Cunha-Junior JP, Vieira FA, Sung SS, et al. Sensitization to *Lolium multiflorum* grass pollen in pollinosis patients: evaluation of allergenic fractions recognized by specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;140(2):121-30.
33. Trocme SD, Sra KK. Spectrum of ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2002 Oct;2(5):423-7.
34. Rosario N, Bielory L. Epidemiology of allergic conjunctivitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011 Oct;11(5):471-6.
35. Blaiss MS, Dykewicz MS, Skoner DP, Smith N, Leatherman B, Craig TJ, et al. Diagnosis and treatment of nasal and ocular allergies: the Allergies, Immunotherapy, and Rhinoconjunctivitis (AIRS) surveys. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014 Apr;112(4):322-8 e1.
36. Marback PM, de Freitas D, Paranhos Junior A, Belfort Junior R. [Epidemiological and clinical features of allergic conjunctivitis in a reference center]. *Arq Bras Oftalmol*. 2007 Mar-Apr;70(2):312-6.
37. Vieira FA, Ferreira EN, Cruz AA. Grass allergy increases the risk of tree pollen sensitization: a warning to urban planners. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Oct;102(4 Pt 1):700-1.
38. Saban DR. The chemokine receptor CCR7 expressed by dendritic cells: a key player in corneal and ocular surface inflammation. *Ocul Surf*. 2014 Apr;12(2):87-99. PubMed PMID: 24725321.

-
39. O'Mahony L, Akdis M, Akdis CA. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Dec;128(6):1153-62.
40. Siddique M, Manzouri B, Flynn TH, Ono SJ. Allergy and contact lenses. *Chem Immunol Allergy*. 2007;92:166-75.
41. Hodges MG, Keane-Myers AM. Classification of ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Oct;7(5):424-8.
42. Contreras-Ruiz L, Ghosh-Mitra A, Shatos MA, Dartt DA, Masli S. Modulation of conjunctival goblet cell function by inflammatory cytokines. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:636812. PubMed PMID: 24453426.
43. Irving K. Asthma and allergy: Complementing the IL-17 axis in asthma. *Nat Rev Immunol*. 2010 Oct;10(10):676.
44. Leonardi A, Curnow SJ, Zhan H, Calder VL. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clin Exp Allergy*. 2006 Jun;36(6):777-84.
45. Leonardi A. Allergy and allergic mediators in tears. *Exp Eye Res*. 2013 Dec;117:106-17.
46. Dantas PEC, Alves MR, Nishiwaki-Dantas MC. Topographic corneal changes in patients with vernal keratoconjunctivitis. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2005;68:593-8.
47. Kim TH, Moon NJ. Clinical correlations of dry eye syndrome and allergic conjunctivitis in Korean children. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2013 Mar-Apr;50(2):124-7.
48. Moon JH, Lee MY, Moon NJ. Association between video display terminal use and dry eye disease in school children. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2014 Mar-Apr;51(2):87-92.
49. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):701-21 e1-70.
50. Cornelissen C, Luscher-Firzlaff J, Baron JM, Luscher B. Signaling by IL-31 and functional consequences. *Eur J Cell Biol*. 2012 Jun-Jul;91(6-7):552-66.
51. Kasraie S, Niebuhr M, Werfel T. Interleukin (IL)-31 induces pro-inflammatory cytokines in human monocytes and macrophages following stimulation with staphylococcal exotoxins. *Allergy*. 2010 Jun 1;65(6):712-21.

52. Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol.* 2004 Jul;5(7):752-60.
53. Zhang Q, Putheti P, Zhou Q, Liu Q, Gao W. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 Oct-Dec;19(5-6):347-56. PubMed PMID: 18926762.
54. Lei Z, Liu G, Huang Q, Lv M, Zu R, Zhang GM, et al. SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma. *Allergy.* 2008 Mar;63(3):327-32.
55. Tanaka A, Arita K, Lai-Cheong JE, Palisson F, Hide M, McGrath JA. New insight into mechanisms of pruritus from molecular studies on familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Br J Dermatol.* 2009 Dec;161(6):1217-24.
56. Neis MM, Peters B, Dreuw A, Wenzel J, Bieber T, Mauch C, et al. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Oct;118(4):930-7.
57. Fujishima H, Okada N, Dogru M, Baba F, Tomita M, Abe J, et al. The role of Staphylococcal enterotoxin in atopic keratoconjunctivitis and corneal ulceration. *Allergy.* 2012 Jun;67(6):799-803.
58. Ambrosio R, Jr., Caiado AL, Guerra FP, Louzada R, Roy AS, Luz A, et al. Novel pachymetric parameters based on corneal tomography for diagnosing keratoconus. *J Refract Surg.* 2011 Oct;27(10):753-8.
59. Kim SH, Mok JW, Kim HS, Joo CK. Association of -31T>C and -511 C>T polymorphisms in the interleukin 1 beta (IL1B) promoter in Korean keratoconus patients. *Mol Vis.* 2008;14:2109-16.
60. Lambiase A, Merlo D, Mollinari C, Bonini P, Rinaldi AM, M DA, et al. Molecular basis for keratoconus: lack of TrkA expression and its transcriptional repression by Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 15;102(46):16795-800.
61. Lema I, Duran JA. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology.* 2005 Apr;112(4):654-9.
62. Lema I, Sobrino T, Duran JA, Brea D, Diez-Feijoo E. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Br J Ophthalmol.* 2009 Jun;93(6):820-4.
63. Ruiz-Morales ML, Verdiguél-Sotelo K, Hernandez-Lopez A. [Keratoconus and corneal transplant clinical study]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2010 May-Jun;48(3):309-12.

-
64. Wagner H, Barr JT, Zadnik K. Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study: methods and findings to date. *Cont Lens Anterior Eye*. 2007 Sep;30(4):223-32.
65. Romero-Jimenez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: a review. *Cont Lens Anterior Eye*. 2010 Aug;33(4):157-66; quiz 205.
66. Ambrosio R, Jr., Kara-Jose N, Wilson SE. Early keratocyte apoptosis after epithelial scrape injury in the human cornea. *Exp Eye Res*. 2009 Oct;89(4):597-9. PubMed PMID: 19523947.
67. Kim WJ, Rabinowitz YS, Meisler DM, Wilson SE. Keratocyte apoptosis associated with keratoconus. *Exp Eye Res*. 1999 Nov;69(5):475-81.
68. Bykhovskaya Y, Margines B, Rabinowitz YS. Genetics in Keratoconus: where are we? *Eye Vis (Lond)*. 2016;3:16. PubMed PMID: 27350955.
69. Hagan S, Tomlinson A. Tear fluid biomarker profiling: a review of multiplex bead analysis. *Ocul Surf*. 2013 Oct;11(4):219-35.
70. Hagan S, Martin E, Enriquez-de-Salamanca A. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J*. 2016;7:15.
71. Rajka G. Atopic dermatitis. Correlation of environmental factors with frequency. *Int J Dermatol*. 1986 Jun;25(5):301-4.
72. Bolanos-Jimenez R, Navas A, Lopez-Lizarraga EP, de Ribot FM, Pena A, Graue-Hernandez EO, et al. Ocular Surface as Barrier of Innate Immunity. *Open Ophthalmol J*. 2015;9:49-55.
73. Fonseca EC, Arruda GV, Rocha EM. [Dry eye: etiopathogenesis and treatment]. *Arq Bras Oftalmol*. 2010 Mar-Apr;73(2):197-203.
74. Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C, Benitez Del Castillo JM, Geffen D, Tauber J, et al. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am J Ophthalmol*. 2011 May;151(5):792-8 e1.
75. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf*. 2007 Apr;5(2):75-92.
76. Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Oct;47(10):4309-15.

77. Saijyothi AV, Angayarkanni N, Syama C, Utpal T, Shweta A, Bhaskar S, et al. Two dimensional electrophoretic analysis of human tears: collection method in dry eye syndrome. *Electrophoresis*. 2010 Oct;31(20):3420-7.
78. Taketomi EA, Sopelete MC, de Sousa Moreira PF, de Assis Machado Vieira F. Pollen allergic disease: pollens and its major allergens. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006 Jul-Aug;72(4):562-7.
79. Balasubramanian SA, Mohan S, Pye DC, Willcox MD. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol*. 2012 Jun;90(4):e303-9.
80. Neter J, Kutner, M., Nachtsheim, C., and Wasserman, W. *Applied Linear Statisitcal Models*. 4th ed. Illinois: Richard D. Irving; 1996 1996. 1408 p.
81. Vergamini MS. Aerobiology study of the atmosphere of Caxias do Sul in 2007. *Rev bras alerg imunopatol*. 2012;35(3):5.
82. Goulart DA, Tacla MA, Marback PM, Sole D, Paranhos Junior A, Perez HB, et al. [Artificial neural networks applied to study allergic conjunctivitis screening questionnaire]. *Arq Bras Oftalmol*. 2006 Sep-Oct;69(5):707-13.
83. Santo RM, Ribeiro-Ferreira F, Alves MR, Epstein J, Novaes P. Enhancing the cross-cultural adaptation and validation process: linguistic and psychometric testing of the Brazilian-Portuguese version of a self-report measure for dry eye. *J Clin Epidemiol*. 2015 Apr;68(4):370-8.
84. Bos JD, Van Leent EJ, Sillevs Smitt JH. The millennium criteria for the diagnosis of atopic dermatitis. *Exp Dermatol*. 1998 Aug;7(4):132-8. PubMed PMID: 9758407.
85. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J bras penumol*. 2006 2016 Sep 03;32(Suppl 7):27. Epub 2006 Nov.
- 86.vIII Consenso brasileiro sobre rinites. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012 Nov/Dez;75(6):48.
87. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 May;113(5):832-6.
88. Santos MSd, Alves MR, Freitas Dd, Sousa LBd, Wainsztein R, Kandelman S, et al. Ocular allergy latin american consensus. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2011;74:452-6.
89. Belin MW, Villavicencio OF, Ambrosio RR, Jr. Tomographic parameters for the detection of keratoconus: suggestions for screening and treatment parameters. *Eye Contact Lens*. 2014 Nov;40(6):326-30.

-
90. Carreno E, Enriquez-de-Salamanca A, Teson M, Garcia-Vazquez C, Stern ME, Whitcup SM, et al. Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. *Acta Ophthalmol.* 2010 Nov;88(7):e250-8. PubMed PMID: 20738261.
91. Kirkwood BS, JAC. *Essential Medical Statistics*. 2nd ed. United Kingdom: Blackwell; 2006.
92. Mc Cullagh P NJ. *Generalized Linear Models* 1989.
93. Smith VA, Rishmawi H, Hussein H, Easty DL. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br J Ophthalmol.* 2001 Feb;85(2):147-53.
94. De Paiva CS, Chotikavanich S, Pangelinan SB, Pitcher JD, 3rd, Fang B, Zheng X, et al. IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol.* 2009 May;2(3):243-53. PubMed PMID: 19242409.
95. Agrawal VB. Characteristics of keratoconus patients at a tertiary eye center in India. *J Ophthalmic Vis Res.* 2011 Apr;6(2):87-91.
96. Caputo R, Versaci F, Pucci N, de Libero C, Danti G, De Masi S, et al. Very Low Prevalence of Keratoconus in a Large Series of Vernal Keratoconjunctivitis Patients. *Am J Ophthalmol.* 2016 Dec;172:64-71.
97. Wong CK, Leung KM, Qiu HN, Chow JY, Choi AO, Lam CW. Activation of eosinophils interacting with dermal fibroblasts by pruritogenic cytokine IL-31 and alarmin IL-33: implications in atopic dermatitis. *PLoS One.* 2012;7(1):e29815. PubMed PMID: 22272250.
98. Martinez R, Acera A, Soria J, Gonzalez N, Suarez T. [Allergic mediators in tear from children with seasonal and perennial allergic conjunctivitis]. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2011 Jun;86(6):187-92.
99. Herrero-Vanrell R, Peral A. [International Dry Eye Workshop (DEWS). Update of the disease]. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2007 Dec;82(12):733-4.
100. Versura P, Profazio V, Campos EC. Performance of tear osmolarity compared to previous diagnostic tests for dry eye diseases. *Curr Eye Res.* 2010 Jul;35(7):553-64.
101. Carracedo G, Recchioni A, Alexandre-Alba N, Martin-Gil A, Crooke A, Morote IJ, et al. Signs and Symptoms of Dry Eye in Keratoconus Patients: A Pilot Study. *Curr Eye Res.* 2015;40(11):1088-94.