ANDRÉ AUGUSTO MIRANDA TORRICELLI

**Efeitos de níveis elevados de poluição atmosférica
na superfície ocular de controladores de tráfego e
taxistas na cidade de São Paulo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Luiz Ribeiro Monteiro

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Torricelli, André Augusto Miranda

Efeitos de níveis de poluição atmosférica na superfície ocular de controladores de tráfego e taxistas na cidade de São Paulo / André Augusto Miranda Torricelli. -- São Paulo, 2013.

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

Orientador: Mário Luiz Ribeiro Monteiro.

Descritores: 1.Poluição do ar/efeitos adversos 2.Exposição ambiental 3.Túnica conjuntiva/citologia 4.Osmolaridade 5.Oftalmopatias

USP/FM/DBD-165/13

DEDICATÓRIA

À minha esposa **Simone**, minha alma gêmea e meu grande amor. O seu modo de ser, pensar e agir tornam-me a cada dia uma pessoa melhor. Obrigado pela cumplicidade e apoio constante.

Aos meus pais, **Reinaldo e Léa**, por me transmitirem seus valores de vida e pelo amor incondicional. São meus espelhos e fontes de inspiração e orgulho.

Aos meus irmãos, **Fábio e Andressa**, pelo constante incentivo e por estarem presente em todas as etapas de minha vida. Aos meus co-irmãos, **André, Carmem e Heloísa**, por toda confiança e por me incentivarem com seus exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Mário Luiz Ribeiro Monteiro**, por uma irretocável e excelente orientação e por me mostrar o caminho para a ciência crítica e de mais alta qualidade. Modelo não só de ética, mas também de conhecimento e dedicação.

Ao Prof. Dr. **Samir Jacob Bechara**, chefe da disciplina de Cirurgia Refrativa da FMUSP, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida e pelo incentivo constante durante a minha formação.

Ao Prof. Dr. **Milton Ruiz Alves**, chefe da disciplina de Córnea e Doenças Externas da FMUSP, pela postura profissional, amizade e pelos conhecimentos transmitidos durante toda a pós-graduação.

Ao Prof. Dr. **Paulo Hilário do Nascimento Sadiva**, chefe do Departamento de Patologia da FMUSP e do Laboratório de Poluição Ambiental, por viabilizar a realização deste projeto.

À Dra. **Priscila Novaes**, por me permitir dar continuidade a sua linha de pesquisa, pela amizade, sugestões e constante apoio.

À Dra. **Monique Matsuda**, por todo o auxílio e suporte através do Laboratório de Investigação Médica em Oftalmologia – LIM 33.

Ao Dr. **Alfésio Luiz Ferreira Braga**, por toda a contribuição e atenção dispensados através da análise estatística dos resultados deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Acácio Alves de Souza Lima e Filho** e a Dra. **Andréia Lourenço**, pelo incentivo à pesquisa e por auxiliarem o processamento das amostras de lágrima no Laboratório Ophthalmos.

Ao Dr. **Fabício Witzel de Medeiros**, pelo apoio e amizade inestimável. Pessoa determinante para minha formação profissional e pessoal.

À Senhora **Regina Ferreira de Almeida**, cuja ajuda e atuação presente tornam-se fundamentais para a realização dos nossos projetos na pós-graduação na Disciplina de Oftalmologia da FMUSP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro por meio da bolsa de doutorado demanda social e do programa de doutorado sanduíche no exterior (Nº 8923-12-4).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (Nº 306487/2011-0 e 555223/2006-0).

Aos pacientes, sem os quais esta pesquisa não seria possível.

À todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

(Arthur Schopenhauer)

SUMÁRIO

lista de Abreviaturas.....	xiii
lista de Símbolos.....	xiv
lista de Figuras.....	xv
lista de Tabelas.....	xvii
Resumo.....	xix
Summary.....	xxii
 1 INTRODUÇÃO.....	 1
 2 OBJETIVOS.....	 4
2.1 Objetivo geral	5
2.2 Objetivos específicos	5
 3 REVISÃO DE LITERATURA.....	 6
3.1 Poluição do ar	7
3.2 Superfície ocular	10
3.3 Avaliação clínica e laboratorial da superfície ocular	16
3.4 Efeitos da poluição do ar na superfície ocular	26
 4 MÉTODOS.....	 31
4.1 Contexto	32
4.2 Aspectos éticos	32
4.3 Grupos de estudo.....	33
4.4 Critérios de inclusão.....	33
4.5 Critérios de exclusão.....	34
4.6 Mensuração da exposição à poluição atmosférica.....	34
4.7 Avaliação clínica - primeira e terceira avaliações.....	38
4.7.1 Ocular Surface Disease Index (OSDI)	38
4.7.2 Tempo de ruptura do filme lacrimal	40
4.7.3 Corantes vitais fluoresceína e lissamina verde.....	41
4.7.4 Teste de Schirmer	43

4.8	Avaliação laboratorial - segunda e quarta avaliações	44
4.8.1	Osmolaridade lacrimal	44
4.8.2	Citologia de impressão	45
4.9	Análise estatística	47
5	RESULTADOS	48
6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÕES.....	61
8	ANEXOS.....	63
9	REFERÊNCIAS	65

Apêndices

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AQG WHO	<i>Air Quality Guideline World Health Organization</i> (Diretrizes sobre Qualidade do Ar da Organização Mundial de Saúde)
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Dr.	Doutor
FL	Filme Lacrimal
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OSDI	<i>Ocular Surface Disease Index</i>
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i> (Ácido Periódico de Schiff)
TRFL	Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
cm	centímetro
CO	Monóxido de Carbono
et al.	e colaboradores
mL	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetros quadrados
mOsmol/Kg	miliosmol por quilograma
O ₃	Ozônio
<i>p</i>	probabilidade de erro
PM	<i>Particulate Matter</i> (Material Particulado)
PM _{2,5}	Partículas com diâmetro aerodinâmico menor que 2,5 µm
PM ₁₀	Partículas com diâmetro aerodinâmico menor que 10 µm
<i>p</i>	probabilidade de erro
Q	Quartil
SO ₂	Dióxido de Enxofre
µg/m ³	micrograma por metro cúbico
µL	microlitro
µm	micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema da interface superfície ocular-filme lacrimal segundo Gipson ³⁰ . Nota-se, na estrutura do filme lacrimal, a presença da camada lipídica externa e uma camada única muco-aquosa interna 12
Figura 2.	Ciclo inflamatório da superfície ocular, modificado do Dry Eye Work Shop (DEWS) ³² . FL = filme lacrimal 13
Figura 3.	Teste do fenol vermelho. Fio impregnado com corante fenol é posicionado no terço lateral da margem palpebral inferior e, após 15 segundos, mede-se a extensão do fio com a coloração avermelhada modificada pela lágrima 22
Figura 4.	Teste de cristalização da lágrima de paciente com olho seco (a esquerda) e de voluntário normal (a direita). Quanto maior o número de ramificações durante a cristalização, melhor a qualidade da lágrima..... 23
Figura 5.	Amostras de citologia de impressão conjuntival de indivíduos expostos a diferentes níveis de poluição ambiental. Hiperplasia das células caliciformes (a direita) em resposta à poluição do ar 28
Figura 6.	Impactador gravimétrico (a esquerda) utilizado para medição de material particulado e aparelho posicionado dentro de um suporte junto ao voluntário (a direita)..... 35
Figura 7.	(A) Tubo passivo para medição de NO ₂ alocado dentro de uma capa protetora. (B) Papel de celulose com substância absorvente (seta) posicionado dentro de um tubo plástico com uma de suas extremidades abertas ao ar ambiente..... 36
Figura 8.	Questionário de sintomas oculares OSDI - <i>Ocular Surface Disease Index</i> . Composto por 12 questões, subdividido em três subescalas, a fim de se calcular e quantificar as queixas oculares referentes aos últimos sete dias 39

Figura 9.	Tempo de ruptura do filme lacrimal. Corante fluoresceína instilado na superfície ocular, sendo o tempo entre o último piscar completo e a visualização do rompimento do filme lacrimal (seta) medido com auxílio do filtro azul-cobalto.....	40
Figura 10.	Desenho esquematizado da divisão da superfície ocular e da córnea para pontuação das colorações com lissamina verde e fluoresceína	42
Figura 11.	Teste de Schirmer I. Fita de papel Whatman N° 41 posicionada na junção entre o terço médio e lateral da margem palpebral inferior; após 5 minutos a extensão molhada na fita é observada.....	43
Figura 12.	Coleta de lágrima no canto lateral do olho direito por meio de um microcapilar de 10 µL.....	44
Figura 13.	Coleta de amostra para citologia de impressão pela aplicação do papel filtro de acetato de celulose na conjuntiva ocular com o auxílio de uma pinça.....	46
Figura 14.	Efeitos da exposição de PM _{2,5} (quartis) na osmolaridade lacrimal (mOsmol/Kg) dos taxista e controladores de tráfego da cidade de São Paulo	53
Figura 15.	Efeitos da exposição de NO ₂ (quartis) na osmolaridade lacrimal (mOsmol/Kg) dos taxistas e controladores de tráfego da cidade de São Paulo	53
Figure 16.	Fotografia da citologia de impressão conjuntival. Seta indicando célula caliciforme	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Variações entre as concentrações anuais de material particulado com diâmetro aerodinâmico menor que 10 μm (PM ₁₀), dióxido de nitrogênio (NO ₂) e dióxido de enxofre (SO ₂) em diferentes áreas do mundo (em $\mu\text{g}/\text{m}^3$) baseados na Organização Mundial de Saúde ¹⁶	8
Tabela 2.	Exames diagnósticos para a avaliação da superfície ocular	17
Tabela 3.	Média $\pm$ desvio padrão (DP) dos níveis de dióxido de nitrogênio (NO ₂) e de material particulado menor que 2,5 μm (PM _{2,5}) nas visitas 1 a 4 nos taxistas e controladores de tráfego da cidade de São Paulo	49
Tabela 4.	Média $\pm$ desvio padrão (DP) dos valores do questionário OSDI, Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) e teste de Schirmer na primeira e terceira visita em 71 taxistas e controladores de tráfego da cidade de São Paulo	50
Tabela 5.	Frequências nas pontuações dos corantes vitais fluoresceína e lissamina verde na primeira e terceira visita em taxistas e controladores de tráfego da cidade de São Paulo	51
Tabela 6.	Média e desvio padrão (DP) da osmolaridade lacrimal (mOsmol/Kg) e da densidade de células caliciformes (células/mm ²) na segunda e quarta visita nos taxista e controladores de tráfego da cidade de São Paulo	52

RESUMO

Torricelli AAM. Efeitos de níveis elevados de poluição atmosférica na superfície ocular de controladores de tráfego e taxistas na cidade de São Paulo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 77p.

Objetivo: Avaliar os efeitos de níveis altos de poluição ambiental do ar na superfície ocular de controladores de tráfego e taxistas da cidade de São Paulo, incluindo avaliação de sinais e sintomas, da osmolaridade lacrimal e da quantidade de células caliciformes obtidas na citologia de impressão conjuntival. Verificar a correlação destes achados entre si e com os níveis de dióxido de nitrogênio (NO_2), e de material particulado menor que $2,5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$) a que foram expostos. **Métodos:** Taxistas e controladores de tráfego de São Paulo, Brasil participaram do estudo. Foram mensuradas as médias individuais de 24 horas de exposição ao NO_2 e ao $\text{PM}_{2,5}$ em quatro diferentes ocasiões. Na primeira e terceira visitas, os indivíduos foram submetidos ao questionário *Ocular Surface Disease Index* (OSDI), avaliação na lâmpada de fenda, estimação do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL), teste de Schirmer e tingimento com corantes vitais da córnea e conjuntiva. Na segunda e quartas visitas, amostras de lágrima foram coletadas do olho direito para análise da osmolaridade, enquanto amostras de citologias de impressão conjuntivais foram coletadas do olho esquerdo. Foram realizadas as análises descritivas das variáveis do estudo. Para estimar os efeitos dos poluentes ($\text{PM}_{2,5}$ e NO_2) nos desfechos ao longo do período do estudo adotamos equações de estimavas generalizadas considerando efeitos fixos para medidas repetidas. Correlações entre os níveis de NO_2 ou $\text{PM}_{2,5}$, os achados clínicos, o valor da osmolaridade lacrimal e a quantidade de células caliciformes foram investigadas. **Resultados:** Setenta e um taxistas e controladores de tráfego, entre 31 e 65 anos de idade, aderiram ao estudo. Os níveis de exposição à poluição do ar permaneceram muito elevados, como notado pelos níveis médios de $\text{PM}_{2,5}$ de $40 \mu\text{m}/\text{m}^3$ e pelos níveis médios de NO_2 constantemente acima de $100 \mu\text{m}/\text{m}^3$ durante todo o estudo. Poucos sintomas foram relatados no questionário OSDI com pontuação (média $\pm$ desvio padrão) de $9,18 \pm 6,81$ e $8,27 \pm 11,92$ na primeira e terceira visita, respectivamente. O TRFL foi reduzido com valores médios de 5 segundos, enquanto o teste de Schirmer apresentou valores médios acima de 10 mm com ampla variabilidade. O tingimento com corante vital fluoresceína foi menor do que quatro em todos os olhos, exceto por um (0,7%) indivíduo com pontuação de 5. A pontuação do corante vital lissamina verde foi normal em 124 (87,3%) olhos na primeira visita e em 120 (84,5%) olhos na terceira visita. Os resultados do análise da osmolaridade lacrimal na segunda e quarta visitas foram dentro dos limites da normalidade com médias $\pm$ desvio padrão de $298,56 \pm 23,19$ e $303,73 \pm 23,52$ mOsmol/Kg,

respectivamente. No que se refere a densidade de células caliciformes, os valores médios $\pm$ desvio padrão foram $464,42 \pm 256,66$ e $407,82 \pm 269,18$ células/mm² na conjuntiva bulbar e $735,52 \pm 295,87$ e $707,92 \pm 272,51$ células/mm² na conjuntiva tarsal, na segunda e quarta visita, respectivamente. Uma significativa e negativa correlação foi encontrada entre PM_{2,5} e osmolaridade lacrimal ($p < 0.05$). Um aumento de 10 $\mu\text{m}/\text{m}^3$ nos níveis de PM_{2,5} foi associado a uma diminuição de 10,9 mOsmol/Kg na osmolaridade lacrimal. Também houve uma correlação negativa, embora não estatisticamente significativa, entre NO₂ e osmolaridade lacrimal. Nenhuma correlação foi encontrada entre a contagem de células caliciformes conjuntivais e os níveis de NO₂ ou PM_{2,5} assim como nenhuma correlação foi encontrada entre o questionário OSDI ou os achados clínicos e a exposição à poluição do ar. **Conclusão:** Exposição à altos níveis de poluição do ar diminui a osmolaridade do filme lacrimal e influencia a estabilidade do filme lacrimal embora não seja acompanhada de sintomas e outros sinais clínicos em indivíduos sem doenças oculares. Alterações no filme lacrimal junto com modificações na densidade de células caliciformes podem fazer parte de uma resposta adaptativa da superfície ocular a exposição à poluição do ar.

Descritores: 1.Poluição do ar/Efeitos adversos 2.Exposição ambiental 3.Túnica conjuntiva/citologia 4.Osmolaridade 5.Oftalmopatias

SUMMARY

Torricelli AAM. *Effects of high levels of environmental air pollution on ocular surface of traffic controllers and taxi drivers in Sao Paulo city* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013. 77p.

Purpose: To evaluate the effect of high levels of environmental air pollution on ocular surface of taxi drivers and traffic controllers of São Paulo, including the assessment of signs and symptoms, tear osmolarity assays, and goblet cells count from conjunctival impression cytology. To verify whether there is correlation between such findings as well as with nitrogen dioxide (NO₂) levels and particulate matter smaller than 2.5 µm (PM_{2.5}) levels to which they were exposed. **Methods:** Taxi drivers and traffic controllers from São Paulo, Brazil were enrolled into the study. Mean individual levels of 24-hours exposure to nitrogen dioxide (NO₂) and particulate matter smaller than 2.5 µm (PM_{2.5}) were assessed on 4 different occasions. On the first and third visits, subjects were submitted to clinical evaluations including the administration of the Ocular Surface Disease Index (OSDI) questionnaire, slit-lamp examination, estimation of tear breakup time (BUT), the Schirmer test, and vital staining of the cornea and conjunctiva. On the second and fourth visits, tear samples were collected from right eye for osmolarity assays, while conjunctival impression cytology was collected from left eye. Descriptive analyses of the study variables were performed. To estimate the effect of the air pollutants (NO₂ and PM_{2.5}) on the endpoints throughout the study generalized estimating equations were adopted. Correlations between NO₂ or PM_{2.5} levels, clinical findings, tear osmolarity and goblet cells density were investigated. **Results:** Seventy-one taxi drivers and traffic controllers, aged from 31 to 65, were enrolled in the study. Air pollution exposure levels remained very high, as noted by the mean PM_{2.5} levels of 40 µm/m³ and the mean NO₂ levels constantly above of 100 µm/m³ during the period of study. Few symptoms were reported in the OSDI questionnaire with score (mean ± standard deviation) of 9.18 ± 6.81 e 8.27 ± 11.92 at the first and third visit, respectively. BUT was low with mean values of 5 seconds, while Schirmer test showed mean values above 10 mm with wide variability. The corneal vital staining score with fluorescein was inferior to 4 in all but one eye (0.7%) with a score of 5. The conjunctival vital staining score with lissamine green was considered normal in 124 eyes (87.3%) in the first visit and in 120 eyes (84.5%) in the third visit. The results of the osmolarity assay at the second and fourth visits were within normal limits with mean ± standard deviation of 298.56 ± 23.19 and 303.72 ± 23.52 mOsmol/kg, respectively. Regarding goblet cells density, the mean ± standard deviation values were 464.42 ± 256.66 and 407.82 ± 269.18 cells/mm² on bulbar conjunctiva and 735.52 ± 295.87 and 707.92 ± 272.51 cells/mm² on the tarsal conjunctiva, at the second and fourth

visit, respectively. A significant and negative correlation was found between $PM_{2.5}$ and tear film osmolarity ($p < 0.05$). An increase of $10 \mu m^3$ in $PM_{2.5}$ levels was associated with 10.9 mOsmol/Kg decrease in tear osmolarity. There also was a negative correlation, though not statistically significant, between NO_2 and tear osmolarity. No correlation was found between conjunctival goblet cells count and NO_2 or $PM_{2.5}$ levels as well as no correlation was found between OSDI questionnaire or clinical findings and air pollution exposure. **Conclusion:** Exposure to high levels of air pollution reduces tear film osmolarity and influences tear film stability, although it is not associated with symptoms and other clinical signs in individual without ocular disease. Alterations on tear film osmolarity combined to goblet cells density modification may be part of an adaptive ocular surface response to air pollution exposure.

Descriptors: 1.Air pollution/Adverse effects 2.Environmental exposure 3.Conjunctiva/cytology 4.Osmolarity 5.Eye disease

1 INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica é uma mistura complexa de partículas sólidas e líquidas suspensas no ar, denominadas material particulado (PM), que variam em tamanho, composição e origem, e de diferentes tipos de gases tais como ozônio (O_3), dióxido de nitrogênio (NO_2), carbonos orgânicos voláteis, monóxido de carbono (CO) e dióxido de enxofre (SO_2)^{1, 2}. Nos últimos anos houve interesse considerável nos efeitos a curto e longo prazo da exposição à poluição do ar na saúde humana. A crescente industrialização e o progressivo aumento do número de veículos automotores nos grandes centros urbanos são os principais causadores da poluição atmosférica¹.

Estudos prévios indicaram que o aumento da poluição do ar, em especial do material particulado, tem aumentado a taxa de mortalidade tanto nos Estados Unidos^{2, 3} quanto na Europa⁴. Dois estudos de coorte prospectivos também relataram que o risco de mortalidade foi 26% mais alto em pessoas que vivem em cidades com níveis elevados de poluição, mesmo após o ajuste para outros fatores de risco, tais como o tabagismo^{2, 5}. Um importante aumento na prevalência de asma e outros sintomas respiratórios também são atribuídos a tais alterações ambientais^{6, 7}.

Os efeitos adversos do PM e dos demais poluentes ambientais são, portanto, bem conhecidos e seus efeitos nos sistemas respiratório e cardiovascular já foram bem estudados^{8, 9}. Entretanto, ainda são pouco conhecidos os efeitos destes poluentes sobre a superfície ocular, tão ou mais exposta às substâncias tóxicas presentes no ar do que estes outros dois

sistemas. Alterações na superfície ocular relacionadas a exposição à poluição do ar já foram sugeridas em estudos prévios^{10, 11}. Gupta et al¹² e Saxena et al¹³ por meio de exames clínicos, como o tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) e o teste de Schirmer, constataram uma maior instabilidade do filme lacrimal em indivíduos expostos rotineiramente a elevados níveis de poluição. Por outro lado, Versura et al¹⁴ apenas por exames clínicos não observaram uma correlação adequada entre estes exames e exposição crônica aos poluentes ambientais. Entretanto, este foi o primeiro estudo a sugerir, por meio da citologia de impressão, que a poluição do ar pode causar alterações subclínicas no olho e que talvez os dados clínicos somente não fossem suficientes para se compreender o mecanismo pelo qual a poluição atmosférica afeta a superfície ocular. De fato, nos últimos anos, Novaes et al¹⁵ demonstraram a ocorrência de hiperplasia de células caliciformes conjuntivais como consequência de uma maior exposição ao NO₂.

Todos estes dados suportam a hipótese de que a poluição ambiental desorganiza a unidade funcional da superfície ocular. Até o momento, nenhum estudo prévio caracterizou as alterações clínicas e laboratoriais, avaliadas por meio da osmolaridade lacrimal e da citologia de impressão, em sujeitos expostos a elevados níveis de poluição do ar por meio da medição individual de PM e de NO₂.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar as alterações clínicas e laboratoriais que ocorreram na superfície ocular de voluntários expostos a níveis elevados de poluição ambiental (taxistas e controladores de tráfego) e correlacionar estes achados com os diferentes níveis individuais de poluição.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as alterações nos questionários de sintomas e na avaliação clínica por meio dos exames de tempo de ruptura do filme lacrimal, teste de Schirmer e tingimento com corantes vitais nos indivíduos expostos a diferentes níveis de poluição ambiental;
- Medir a osmolaridade do filme lacrimal de indivíduos expostos à poluição e verificar sua correlação com os diferentes níveis de exposição;
- Quantificar a densidade de células caliciformes por meio da citologia de impressão conjuntival em indivíduos expostos à poluição e sua associação com os diferentes níveis de exposição.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Poluição do ar

Poluição do ar é a contaminação interna ou externa do meio-ambiente por qualquer agente químico, físico ou biológico que modifique as características naturais da atmosfera. A combustão de aparelhos domésticos, veículos automotores, instalações industriais e incêndios florestais são fontes comuns de poluição do ar. Os poluentes de maior impacto em saúde pública incluem: PM, CO, O₃, NO₂ e SO₂ segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)¹⁶.

As diretrizes sobre qualidade do ar da OMS (*Air Quality Guideline World Health Organization - AQG WHO*) são uma referência internacional dos efeitos adversos dos poluentes do ar na saúde humana. Estas diretrizes resumem o conhecimento científico sobre os danos à saúde relacionados a poluição do ar, provêm as estimativas de risco para a exposição aos poluentes e recomenda os níveis adequados para se manter a qualidade do ar. A mais recente versão do AQG WHO foi publicada em 2006^{16, 17}. Nesta atualização as metas para controlar a poluição atmosférica a fim de proteger a saúde humana são: níveis médios de material particulado com diâmetro aerodinâmico menor de 2,5 µm (PM_{2,5}) inferiores a 25 µg/m³ em 24 horas e inferiores a 10 µg/m³ em um ano; níveis médios de NO₂ inferiores a 100 µg/m³ em 24 horas e inferiores a 40 µg/m³ em um ano e níveis médios de SO₂ inferiores a 20 µg/m³ em 24 horas e inferiores a 500 µg/m³ em 10 minutos.

A OMS também publicou dados referentes as concentrações médias anuais de material particulado com diâmetro aerodinâmico menor de 10 μm (PM_{10}), NO_2 e SO_2 ¹⁶ em diferentes áreas do mundo (Tabela 1).

Tabela 1. Variações entre as concentrações anuais de material particulado com diâmetro aerodinâmico menor que 10 μm (PM_{10}), dióxido de nitrogênio (NO_2) e dióxido de enxofre (SO_2) em diferentes áreas do mundo (em $\mu\text{g}/\text{m}^3$) baseados na Organização Mundial de Saúde¹⁶

Região	Concentração Anual Média		
	PM_{10}	NO_2	SO_2
África	40-150	35-65	10-100
Ásia	35-220	20-75	6-65
Canadá/Estados Unidos	20-60	35-70	9-35
Europa	20-70	18-57	8-36
América Latina	30-129	30-82	40-70

Na maioria das cidades européias e norte-americanas, os níveis médios de concentração de PM_{10} anuais são geralmente inferiores a 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Os maiores níveis de PM_{10} são encontrados na Ásia, África e América Latina. Na Ásia, o PM ainda é o poluente do ar mais importante, embora em algumas grandes cidades da China, tenha sido observada uma ligeira diminuição nos níveis de PM_{10} durante o desenvolvimento econômico que ocorreu durante as últimas décadas¹⁸. Os níveis de SO_2 vêm diminuindo na maior parte do mundo, particularmente nos Estados Unidos e na Europa. Em algumas cidades da Ásia (por exemplo, Bangkok, Nova Delhi e Jacarta) os níveis ambientais de SO_2 são relativamente baixos devido ao reduzido teor de enxofre no combustível

utilizado na região. Por outro lado, em cidades chinesas, embora o nível SO_2 tenha diminuído substancialmente, este ainda é elevado. Nas grandes cidades da América Latina e África também houve uma diminuição moderada dos níveis de SO_2 ¹⁶. Entretanto, tal tendência não tem sido observada para os poluentes do ar relacionados ao tráfego, isto é, NO_2 e O_3 . Pelo contrário, nos países em desenvolvimento, os níveis de NO_2 e O_3 tendem a aumentar devido ao aumento do número de veículos automotores. Grandes cidades onde as médias anuais de NO_2 excederam os critérios de qualidade do ar da OMS de $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ foram Pequim, Xangai, Tóquio, Osaka, Nova Iorque, Los Angeles, São Paulo e México, enquanto que em Nova Delhi, Mumbai e Calcutá as concentrações médias anuais de NO_2 foram inferiores a $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ¹⁷.

Diversos estudos de séries temporais têm explorado os efeitos à saúde associados com a exposição de curta e longa duração as partículas do ar¹⁹. Em uma meta-análise, um aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} foi associado com um aumento na mortalidade de 0,46% nos Estados Unidos (30 cidades estudadas), de 0,62% na Europa (21 cidades estudadas) e de 0,49% na Ásia (4 cidades estudadas)¹⁷. O estudo europeu APHEA-1 constatou um aumento de 1,3% nas mortes diárias por aumento de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de NO_2 ²⁰. Evidências combinadas a partir de estudos de séries temporais mostram uma associação positiva entre mortalidade diária e níveis de ozônio, independente dos efeitos do material particulado. E, finalmente, um estudo de meta-análise em 95 comunidades urbanas dos Estados Unidos mostrou que um aumento de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nos níveis de ozônio foi associado com um aumento de 0,52% na mortalidade geral e um aumento de 0,64% em mortalidade por causas respiratórias e cardiovasculares²¹.

3.2 Superfície ocular

O termo superfície ocular inclui os epitélios da córnea, conjuntiva, glândulas lacrimais principal e acessórias e as glândulas de meibômios, associados com suas matrizes apical (filme lacrimal) e basal (tecido conectivo); além das glândulas palpebrais de Moll e Zeiss, os componentes responsáveis pelo piscar e o ducto nasolacrimal²². Todos estes elementos estão unidos funcionalmente por continuidade e por sistemas endócrinos, vasculares e imunológicos. A razão pelo uso do termo superfície ocular deve-se a diversos motivos. Primeiro, a função sinérgica de todos os componentes do sistema para a manutenção da superfície refrativa e funcional da córnea. Segundo, todos os epitélios na superfície ocular são contínuos e todos derivam do ectoderma superficial. A comunicação entre estes epitélios ocorre através de gap junctions e citocinas²³⁻²⁵. Terceiro, todas as regiões produzem componentes para o filme lacrimal, uma vez que o epitélio corneano e conjuntival produzem mucinas que aderem a lágrima à superfície do olho; as glândulas lacrimais principal e acessórias secretam água e diversas proteínas; e as glândulas de meibômios fornecem a camada lipídica que previne a evaporação do filme lacrimal. Por fim, o ducto nasolacrimal absorve o filme lacrimal e acredita-se que, por meio do sistema vascular cavernoso, controle e regule a produção de lágrima, ajudando a manter um nível adequado de filme lacrimal – um fino balanço entre secreção e absorção²⁶.

A conjuntiva é composta por um epitélio escamoso não queratinizado de 2 a 10 camadas de células sendo importante na proteção contra estímulos

externos. Este epitélio, diferentemente de outros epitélios escamosos estratificados, apresenta entre suas células epiteliais células secretoras denominadas caliciformes^{22, 27}. Já a córnea apresenta células de três tipos diferentes. Um epitélio estratificado na parte anterior, ceratócitos dispersos no seu estroma e uma camada mais interna, o endotélio.

Apesar de suas diferenças morfológicas, a superfície ocular como um todo é fundamental para a manutenção e proteção da superfície refrativa da córnea e importante para uma boa saúde ocular e desempenho da visão²².

Um dos principais agentes de proteção das células da superfície ocular é o filme lacrimal. Todas as áreas da superfície ocular secretam componentes para o filme lacrimal para que, através do movimento palpebral contínuo, ele se espalhe regularmente sobre ela, deixando-a uniformemente lubrificada e nutrida²². As primeiras hipóteses sobre a estrutura do filme lacrimal separavam as secreções das glândulas de meibômios, glândulas lacrimais e as mucinas das células caliciformes em três camadas distintas dentro do filme lacrimal; as camadas lipídicas, aquosa e mucosa, respectivamente. Embora esteja claro que a camada lipídica derivada das glândulas de meibômios seja separada na superfície da camada aquosa, estudos mais recentes sugerem que a camada aquosa do filme lacrimal seja uma mistura de mucinas e fluido lacrimal, sem uma separação distinta da camada mucosa (Figura 1)^{28, 29}. A interface célula epitelial-lágrima é fundamental para a manutenção do filme lacrimal na córnea e conjuntiva.

Figura 1. Esquema da interface superfície ocular-filme lacrimal segundo Gipson³⁰. Nota-se, na estrutura do filme lacrimal, a presença da camada lipídica externa e uma camada única muco-aquosa interna

A disfunção da unidade do filme lacrimal pode levar a sintomas e sinais oculares causados por alteração no volume, composição, distribuição e *clearance* do filme lacrimal. Dois mecanismos interligados, a hiperosmolaridade e a estabilidade do filme lacrimal, já foram identificados³¹.

A hiperosmolaridade lacrimal causa lesão na superfície epitelial ativando uma cascata de eventos inflamatórios na superfície ocular e libera mediadores inflamatórios na lágrima. O epitélio danificado induz a morte celular por

apoptose, perda de células caliciformes e distúrbio na expressão de mucinas, resultando na instabilidade do filme lacrimal. Esta instabilidade, por sua vez, exacerba a hiperosmolaridade na superfície ocular e completa o ciclo vicioso. As principais causas de hiperosmolaridade lacrimal são: a redução da porção aquosa resultante da falência lacrimal e/ou o aumento da evaporação do filme lacrimal. O aumento da evaporação pode ser favorecido por condições ambientais como a baixa umidade e o aumento do fluxo de ar. O ciclo de eventos está demonstrado na figura 2³².

Figura 2. Ciclo inflamatório da superfície ocular, modificado do Dry Eye Work Shop (DEWS)³². FL = filme lacrimal

Dentre os componentes do fluido lacrimal encontram-se proteínas chamadas mucinas, vitais para a manutenção de uma superfície ocular hidratada e saudável. As mucinas formam um grupo de glicoproteínas altamente glicosiladas, caracterizadas por múltiplas repetições de aminoácidos ricos em serina e treonina no seu domínio central que provêem grande quantidade de sítios para glicosilação. As mucinas participam da retenção de água e de outros componentes do fluido lacrimal, contribuindo para lubrificação e integridade epitelial, além de servir como barreira à invasão microbiana^{33, 34}.

As mucinas estão presentes na superfície apical de todos os epitélios e glândulas secretoras saudáveis do nosso corpo. Baseado na presença de estruturas comuns dentro das suas sequência de aminoácidos, as mucinas são agrupadas em: mucinas secretadas e mucinas associadas a membrana³⁵.

Na superfície ocular, a mucina formadora de gel mais amplamente secretada é a MUC5AC, expressa por células caliciformes com a função de hidratar o filme lacrimal e atuar como agente lubrificante. As mucinas associadas a membrana mais estudadas são as MUC1, MUC4 e MUC16, que formam o denso glicocálice na interface epitélio-filme lacrimal³⁰ e servem como sinal para as células quando estas estão sendo agredidas, além de servirem como proteção. A MUC16 tem sido especificamente descrita como proteção epitelial para a penetração de corantes clínicos como o rosa bengala. Há também porções solúveis da MUC1 e MUC16 achadas no filme lacrimal; a função destas porções solúveis ainda não esta clara.

A quantidade e qualidade das mucinas são os principais fatores para um bom funcionamento da camada mucosa do filme lacrimal. A quantidade de mucinas depende da quantidade de células secretoras presentes no epitélio, quantas delas estão respondendo a estímulos e da taxa de síntese das mucinas pelas células produtoras. Já a qualidade das mucinas depende da estrutura e tipo de mucina secretada, além da hidratação e eletrólitos apropriados providos pela camada aquosa do filme lacrimal (secretada pelas células do epitélio conjuntival)³⁶.

Exemplos de doenças em que a síntese de mucinas está alterada na superfície ocular incluem: ceratoconjuntive atópica e vernal, olho seco ou ceratoconjuntivite sicca, ceratite herpética, queimadura por irradiação e penfigóide cicatricial^{37, 38}.

Acredita-se que a MUC1 associada a membrana possa fazer parte de eventos de sinalização que permitem o epitélio da superfície ocular responder às mudanças do ambiente³⁹.

3.3 Avaliação clínica e laboratorial da superfície ocular

Tradicionalmente uma combinação de testes diagnósticos têm sido utilizada para avaliar o grau de sintomas e sinais oculares associados a poluição do ar ambiente (Tabela 2). Junto com a história clínica, a utilização de questionários validados para os sintomas oculares é muito útil^{40, 41}. Existem vários questionários disponíveis para avaliar a intensidade dos sintomas, os impactos nas atividades diárias e na qualidade de vida. Tais ferramentas variam em tamanho, razão, forma de aplicação (auto-aplicação ou por meio de um entrevistador) e extensão da validação. Os questionários mais utilizados são: Ocular Surface Disease Index (OSDI), Canadian Dry Eye Epidemiology Study (CANDEES), Impact of Dry Eye on Everyday Life (IDEEL), National Eye-Institute-Visual Function Questionnaire (NEI-VFQ) e Women's Health Study Questionnaire³².

No exame, os elementos utilizados na avaliação da superfície ocular incluem: mensuração da acuidade visual, exame ocular externo e biomicroscopia realizada na lâmpada de fenda. Além disso, testes diagnósticos para a avaliação da instabilidade do filme lacrimal, lesões da superfície ocular e/ou fluxo da porção aquosa da lágrima também são realizados (Tabela 2).

Tabela 2. Exames diagnósticos para a avaliação da superfície ocular

1. Questionário de sintomas
2. Acuidade Visual
3. Exame ocular externo
4. Biomicroscopia <ul style="list-style-type: none">- Pálpebras- Cílios- Glândulas de Meibômios- Conjuntiva- Córnea- Menisco lacrimal- Filme Lacrimal
5. Testes para avaliar a estabilidade do filme lacrimal <ul style="list-style-type: none">Tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL)InterferometriaMeibomiometria
6. Corantes Vitais <ul style="list-style-type: none">FluoresceínaRosa bengalaLissamina verde
7. Estesiometria corneana
8. Testes diagnósticos quantitativos da lágrima <ul style="list-style-type: none">Teste de SchirmerTeste do fenol vermelho
9. Testes diagnósticos qualitativos da lágrima <ul style="list-style-type: none">Teste de cristalização da lágrimaOsmolaridade lacrimal
10. Citologia de impressão

A instabilidade do filme lacrimal é um dos achados mais comuns em pacientes com irritação ocular tanto por uma deficiência da porção aquosa quanto por um aumento da evaporação lacrimal. O método mais frequentemente utilizado para acessar a estabilidade do filme lacrimal é a mensuração do TRFL: intervalo entre o piscar completo e o aparecimento do primeiro rompimento do filme lacrimal pré-corneano após a instilação de fluoresceína^{42, 43}. Diversos mecanismos têm sido sugeridos para explicar este fenômeno ainda não completamente entendido. De acordo com a hipótese tradicional, a ruptura do filme lacrimal ocorre quando os lipídeos da superfície lacrimal difundem-se pela camada muco-aquosa tornando o filme lacrimal instável⁴⁴. Porém, esta teoria tem sido criticada e, alternativamente, acredita-se que a ruptura do filme lacrimal possa ocorrer devido a ruptura da camada mucosa. Norn and Lemp^{43, 45} descreveram um fenômeno no qual a ruptura do filme lacrimal é notada imediatamente após a abertura da pálpebra. Pflugfelder et al⁴⁶ interpretaram este fenômeno como uma deficiência na camada mucosa do filme lacrimal. Na prática, o TRFL pode ser realizado com a ajuda de fitas impregnadas com fluoresceína ou pela instilação com pipetas de 1 a 5 µL de solução de fluoresceína sódica variando entre 0,5% e 2% com o uso do filtro azul-cobalto na lâmpada de fenda. Apesar de amplamente utilizado para fins clínicos e de pesquisa, o TRFL apresenta baixa acurácia e reprodutibilidade^{47, 48}. Valores inferiores a 10 segundos são considerados anormais⁴⁹. Mais recentemente, valores menores que cinco segundos têm sido considerados anormais por alguns autores, que sugerem valores de corte mais baixos quando um volume menor de fluoresceína é instilado (1 µL de fluoresceína a 2%)⁵⁰. Optando-se

por valores mais baixos diminui-se a sensibilidade do teste, porém se aumenta sua especificidade.

Outros testes para se avaliar a estabilidade do filme lacrimal são: interferometria, o qual mede objetivamente a espessura da camada lipídica do filme lacrimal precorneano⁵¹⁻⁵³ e meibomiometria⁵⁴, que quantifica os níveis de lipídeos na margem da pálpebra. Tais exames são pouco utilizados na clínica oftalmológica.

As lesões na superfície ocular são normalmente acessadas por meio do tingimento com corantes vitais, tais como: rosa bengala, lissamina verde e fluoresceína. Fluoresceína sódica tem sido utilizada para detecção de defeitos epiteliais desde o final do século dezenove e atualmente representa um dos mais comuns métodos adotados para se avaliar a superfície ocular^{55, 56}. Não apresenta toxicidade celular⁵⁷ e pode ser instilada com o uso de papel impregnado (molhado com um gota de solução salina) ou por meio de colírios livres de preservativos a 1% ou 2%. Já o rosa bengala, descrito como corante ocular deste o século passado, tem sido empregado para se detectar danos na superfície ocular principalmente na conjuntiva, uma vez que apresenta baixo contraste com a córnea. Tradicionalmente, o rosa bengala cora células mortas e desvitalizadas, além de muco⁵⁸. Muitos oftalmologistas preferem instilar um colírio anestésico antes do rosa bengala para se reduzir a sensação de queimação provocada pelo mesmo, enquanto outros acreditam que esta prática pode induzir a resultados falso-positivos⁵⁹. Por fim, lissamina verde é um ácido orgânico sintético que cora a superfície ocular semelhantemente ao rosa

bengala sem causar irritação ocular. O tingimento pela lissamina verde é dose dependente e uma instilação de 10-20 µL é recomendada. Três sistemas para a quantificação dos padrões de tingimento ocular estão atualmente em uso: o sistema de Van Bijsterveld⁶⁰, o sistema Oxford⁶¹ e o sistema desenvolvido pelo estudo CLEK⁴⁷. O sistema Oxford e o CLEK utilizam uma quantificação mais detalhada do que o sistema van Bijsterveld, permitindo uma detecção mais precisa de alterações da superfície ocular. Nenhum estudo prévio definiu qual é o melhor sistema de quantificação³².

A mensuração da sensibilidade corneana avalia o ramo oftálmico do quinto nervo craniano (trigêmeo)⁶². O teste pode ser qualitativo ou quantitativo. O teste mais usado rotineiramente na prática clínica consiste no uso da ponta de um cotonete sobre a córnea, sendo um teste qualitativo e sem a aplicação de anestesia tópica. Estesiômetro é o aparelho usado para quantificar a sensibilidade da córnea. O teste quantitativo mais difundido utiliza o estesiômetro de Cochet-Bonnet, um aparelho que apresenta um monofilamento de nylon fino e retrátil com extensão de até seis cm. As principais causas de hiposensibilidade corneana são: infecção por herpes simplex ou zoster, trauma cirúrgico (pós-ceratomileusis in situ a laser, pós-ceratectomia fotorrefrativa), hanseníase, aneurismas e tumores (neurinoma do acústico, neurofibroma)⁶³.

No que se refere a porção aquosa, esta é normalmente avaliada pelo teste de Schirmer³². Descrito pela primeira vez em 1903 por Schirmer⁶⁴, o teste original utilizava um papel absorvente cortado em uma faixa de 35 por 5 mm, que era pendurado na margem palpebral inferior por 5 minutos e então a

extensão da tira umedecida pela lágrima era mensurada. Infelizmente o teste apresentava muitas desvantagens como baixa reprodutibilidade, além de frequente desconforto, risco de lesão para córnea e conjuntiva e falta de lugar definido para se colocar a tira de papel. Em 1953, De Roethth⁶⁵ estabeleceu o uso do papel filtro Whatman N° 41 e, em 1961, fitas padrões para o teste de Schirmer foram introduzidas por Halberg and Berens⁶⁶. Em relação ao posicionamento do papel na margem palpebral, diferentes lugares têm sido propostos, porém diversos estudos revelam não haver diferença entre a posição medial e lateral na margem palpebral inferior^{67, 68}. Anestésico tópico pode ou não ser aplicado. Pacientes são instruídos a não apertar as pálpebras e a não olhar para cima, além de piscar naturalmente durante o exame,⁶⁹ embora alguns estudo sugiram que se deva fechar as pálpebras^{70, 71}. Ainda não está claro se fechar as pálpebras e/ou a posição do olhar influenciam no teste⁶⁸. Atualmente, o teste de Schirmer é realizado de três maneiras. O teste de Schirmer I, sem aplicação de colírio anestésico, mede a secreção reflexa e basal de lágrima. O teste de Schirmer II, realizado com anestésico tópico e estimulação da mucosa nasal com um cotonete, mede a secreção reflexa. E a terceira técnica, com uso de colírio anestésico mas sem qualquer estimulação, mede a secreção basal apenas⁷². Os valores médios do teste de Schirmer em indivíduos saudáveis apresentam uma larga variabilidade, indo de 8,1 a 33,1 mm sem anestesia tópica e de 3,5 até 11,9 mm com anestesia tópica^{70, 73-75}. Os valores do teste de Schirmer tendem a diminuir com a idade.

Outros métodos para se avaliar a produção de lágrimas têm sido desenvolvidos. O teste do fenol vermelho é um desses testes e está disponível

comercialmente. Um fio de algodão impregnado com corante fenol é utilizado (Figura 3). O fenol vermelho é sensível ao pH e muda do amarelo para o vermelho quando molhado pela lágrima. A extremidade dobrada de um segmento de 70 mm é colocado na parte inferior do fundo de saco conjuntival. Após 15 segundos, mede-se o comprimento da mudança de cor sobre o fio, que indica o comprimento em mm do fio molhado pela lágrima. Medições normais estão entre 9 mm e 20 mm⁷⁶. Pacientes com os olhos secos têm valores inferiores a 9 mm.

Figura 3. Teste do fenol vermelho. Fio impregnado com corante fenol é posicionado no terço lateral da margem palpebral inferior e, após 15 segundos, mede-se a extensão do fio com a coloração avermelhada modificada pela lágrima

O teste da cristalização da lágrima reflete a composição da lágrima e oferece uma maneira qualitativa de se avaliar a integridade do filme lacrimal. Quando o muco seca ao ar numa lâmina de microscópio ocorre uma cristalização e arborização (em forma de samambaia) específicas, o que tem sido chamado de teste de cristalização. Rolando et al⁷⁷ identificaram diferenças entre os padrões de cristalização da lágrima e descreveram um sistema de classificação tornando o método uma ferramenta útil de diagnóstico. Estes autores descreveram quatro categorias qualitativas, que dependem da presença, do tamanho e da densidade das ramificações observadas (Figura 4).

Figura 4. Teste de cristalização da lágrima de paciente com olho seco (a esquerda) e de voluntário normal (a direita). Quanto maior o número de ramificações durante a cristalização, melhor a qualidade da lágrima

Rolando et al⁷⁷ relataram que o filme lacrimal normal comumente demonstra um padrão Tipo I ou II (com muita cristalização), enquanto os pacientes com ceratoconjuntivite sicca (KCS) apresentam padrões de cristalização do tipo III e IV (em que houve pouca ou cristalização ausente). Embora o sistema de classificação de Rolando et al^{77, 78} seja subjetivo, ele é simples, fácil, de boa reprodutibilidade e tem uma curva de aprendizado curta.

O aumento da osmolaridade lacrimal é tido como um marco na doença olho seco e é considerado um dos mecanismos centrais na patogênese da lesão da superfície ocular, como citado no Dry Eye Workshop Report (DEWS)³¹. A osmolaridade lacrimal tem sido relatada como o melhor marcador isolado para avaliação de olho seco³¹. O êxito da medição da osmolaridade lacrimal exigia a coleta de uma grande quantidade de lágrima, entretanto com os avanços tecnológicos na sua medição, a osmolaridade lacrimal é agora mais viável na avaliação do olho seco. Tomlinsom et al⁷⁹, por meio de uma meta-análise dos estudos recém-publicados em osmolaridade lacrimal, estabeleceram um valor de referência de 316 mOsmol/Kg, tendo valores superiores a esta marca uma acurácia superior a qualquer outro teste para o diagnóstico de olho seco quando aplicado isoladamente. Outros fatores comuns extrínsecos, tais como deficiência de vitamina A, alergias e uso de lentes de contato também têm demonstrado um aumento da osmolaridade lacrimal^{31, 80-82}.

Finalmente, a citologia de impressão conjuntival é um método rápido e não-invasivo para a avaliação da superfície ocular^{83, 84}. A descrição do

princípio básico da técnica da citologia de impressão conjuntival é creditada a Egbert et al⁸⁵, que notaram que após a aplicação de papel filtro de acetato de celulose na conjuntiva bulbar uma marca tornava-se nítida na região das células produtoras de muco. Estas células então foram visualizadas com a utilização do corante ácido periódico de Schiff (PAS). Egbert et al⁸⁵ também relataram que as células caliciformes e não caliciformes da conjuntiva poderiam ser removidas com o papel filtro. Embora Egbert et al⁸⁵ tivessem notado que a densidade de células pudesse variar enormemente, coube a Nelson e Wright⁸⁶ estabelecerem um sistema de graduação. Para uma conjuntiva normal foi estabelecido que a densidade de células caliciformes na superfície bulbar deveria ser maior que 500 células por mm²; valores específicos de 443 ± 266 e 1.972 ± 862 células por mm² foram descritos para a conjuntiva bulbar exposta (interpalpebral) e para a conjuntiva tarsal inferior, respectivamente. A citologia de impressão tem sido utilizada na avaliação de diversas alterações da superfície ocular como a ceratoconjuntivite sicca, a deficiência de vitamina A, o penfigóide cicatricial, a ceratoconjuntivite vernal e o efeito na superfície ocular de diversas terapias^{87, 88}.

3.4 Efeitos da poluição do ar na superfície ocular

Nos últimos anos, pacientes com sintomas subjetivos de irritação ocular, tais como sensação de corpo estranho, ardor, prurido, fotofobia e lacrimejamento, tornaram-se uma ocorrência comum. No entanto, na maioria das vezes o exame clínico não revela alterações oculares correspondentes¹⁴. Vários estudos têm tentado relacionar esses sintomas subjetivos com uma possível inflamação ocular subclínica devido a uma exposição prolongada à poluição do ar^{13, 14, 89}. Saxena et al¹³ por meio da comparação de dois grupos de voluntários saudáveis em Nova Delhi, encontraram maior anormalidade do filme lacrimal, avaliado tanto pelo TRFL quanto pelo teste de Schirmer, em indivíduos com uma rotina diária de exposição prolongada a poluição do ar. Estes autores concluíram que as condições ambientais aparentemente exercem um efeito importante na superfície ocular, visto que alterações subclínicas significativas foram detectadas na superfície ocular de pessoas que transitavam ou moravam em áreas com altos índices de poluição.

Por outro lado, Versura et al¹⁴ avaliaram 100 indivíduos expostos a diferentes níveis de poluição ambiental e não encontraram diferenças estatisticamente significantes nos testes de TRFL e de Schirmer entre diferentes grupos. Ao contrário do estudo anteriormente mencionado, os resultados dos testes não foram claramente associados com níveis de poluição. No entanto, neste estudo a citologia de impressão demonstrou, pela primeira vez, um aumento de células inflamatórias na superfície ocular em resposta a uma exposição mais elevada à poluição. Este achado torna-se

notável na medida que mostra a importância de exames complementares em casos em que a avaliação clínica não conduz a um diagnóstico. Além disso, sugere que não se deve confiar apenas nos sinais clínicos, pelo menos nos casos de etiologia questionável.

Sabe-se da literatura que a exposição direta da superfície ocular a várias substâncias irritantes provoca vasodilatação conjuntival neurogênica e imediato lacrimejamento⁹⁰. Substâncias químicas podem solubilizar-se no filme lacrimal e, possivelmente, sensibilizar subpopulações específicas de linfócitos, como já foi mostrado com o SO₂ na mucosa brônquica, que produz uma inflamação crônica após uma exposição prolongada. A inflamação parece influenciar a diferenciação epitelial e a densidade das células através de um mecanismo ainda desconhecido⁹¹.

De acordo com a definição³¹, olho seco é uma doença multifatorial da lágrima e da superfície ocular que resulta em sintomas de desconforto, perturbação visual e instabilidade do filme lacrimal com potencial dano à superfície ocular. É acompanhado por um aumento da osmolaridade do filme lacrimal e por inflamação da superfície ocular. Vários fatores podem funcionar independentemente ou interagirem uns com os outros, portanto testes diagnósticos complementares são geralmente realizados a fim de adicionar dados ao exame clínico.

A hiperplasia das células caliciformes em resposta a níveis elevados de poluição do ar já foi documentada na literatura. Novaes et al¹⁵ avaliaram os efeitos da poluição atmosférica sobre a superfície ocular por meio da comparação de indivíduos expostos a diferentes níveis de poluição ambiental.

Vinte e nove voluntários foram recrutados em dois lugares distintos: São Paulo, capital e cidade mais industrializada do estado de São Paulo e Divinolândia, pequena cidade do interior do estado de São Paulo, onde metade da população vive na zona rural. O NO_2 foi utilizado como indicador da exposição à poluição ambiental. Foi realizada a medição individual de exposição aos diferentes níveis de NO_2 durante sete dias. O estudo mostrou que os indivíduos residentes na cidade de São Paulo foram expostos a doses significativamente mais altas de NO_2 (média de $32,47 \mu\text{g}/\text{m}^3$, DP de 9,83) do que os de Divinolândia (média de $19,33 \mu\text{g}/\text{m}^3$, DP de 5,24) e que a contagem de células caliciformes aumentou proporcionalmente a exposição NO_2 com padrão dose-resposta¹⁵. Neste estudo observou-se uma associação positiva e significativa entre a exposição à poluição do ar e a hiperplasia de células caliciformes na conjuntiva humana (Figura 5); a combinação de medidas simples de exposição à poluição e citologia de impressão mostrou-se ser uma abordagem eficaz e não invasiva para caracterizar a resposta ocular a níveis ambientais de poluição do ar.

Figura 5. Amostras de citologia de impressão conjuntival de indivíduos expostos a diferentes níveis de poluição ambiental. Hiperplasia das células caliciformes (a direita) em resposta à poluição do ar

Em outro estudo, do mesmo grupo, foram avaliados 55 voluntários saudáveis recrutados entre os funcionários do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. O objetivo foi avaliar os efeitos da exposição à poluição atmosférica na superfície ocular, comparando queixas oculares subjetivas e resultados de testes clínicos de rotina com medidas individuais de exposição à poluição do ar e também avaliar a importância destas medidas como bioindicadores potenciais de poluição do ar. Este foi o primeiro estudo que associou medições subjetivas de sintomas oculares e de qualidade de vida com medidas individuais de exposição à poluição do ar ambiente. Os resultados do questionário clínico de sintomas foram correlacionados com quartis de exposição ao NO_2 (Q1: 9,9-20,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; Q2: 20,1-26,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; Q3: 26,1-35,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; Q4: > 35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) e um padrão claro de dose-resposta foi detectado⁹².

Todos estes resultados servem como base para a hipótese de que a exposição à poluição do ar induz alterações na superfície ocular secundárias a agressão ambiental. No entanto, embora muitos indivíduos tenham sintomas clínicos relevantes devido à poluição do ar, deve-se ressaltar que algumas pessoas convivem de forma adequada com essa poluição, apresentando poucos sintomas ou mesmo nenhum diante da mesma agressão. Portanto, é possível que essas pessoas tenham mecanismos adaptativos que bastam para defesa ou até mesmo para a recuperação funcional, quando submetidos a elevados níveis de poluição ambiental.

Os estudos disponíveis até o momento indicam que os achados ao exame oftalmológico clínico não se correlacionam adequadamente com as queixas e sinais apresentados pelos pacientes sujeitos a possíveis agressões causadas pelos poluentes ambientais. Portanto, exames complementares que possam oferecer dados mais objetivos, como avaliação das células caliciformes ou medição da inflamação ocular, parecem ser necessários para uma melhor interpretação das alterações na superfície ocular.

4 MÉTODOS

4.1 Contexto

O presente estudo foi planejado e executado no Laboratório de Investigação Médica da Clínica Oftalmológica em conjunto com o Laboratório de Poluição Ambiental do Departamento de Patologia Clínica, ambos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

O estudo recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio de bolsa de doutorado demanda social e do programa de doutorado sanduíche no exterior (Nº 8923-12-4), além do suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (Nº 306487/2011-0 e 555223/2006-0).

4.2 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq do HC-FMUSP, sob o processo número 0565/07 (Anexo A). Todos os sujeitos que concordaram em participar do estudo leram, compreenderam e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de ingressarem no mesmo.

4.3 Grupos de estudo

Controladores de tráfego e taxistas, adultos, saudáveis e do sexo masculino foram incluídos no estudo. Estes indivíduos, durante o trabalho, estão expostos constantemente à poluentes ambientais, como emissões automotivas, enquadrando-se no perfil desejado para o estudo.

Todos os indivíduos foram examinados em quatro diferentes ocasiões. Na primeira e terceira visitas, exame oftalmológico completo foi realizado, enquanto na segunda e quarta visitas foram realizadas coleta de lágrima e citologia de impressão.

4.4 Critérios de inclusão

- Viver e trabalhar na área do estudo há pelo menos cinco anos.
- Aceitar participar do estudo após leitura e assinatura do termo de consentimento informado.

4.5 Critérios de exclusão

- Ser fumante.
- A possibilidade de deslocamento para outras regiões que não a do estudo durante a vigência do monitoramento individual.
- Uso de lentes de contato, cirurgias oftalmológicas prévias e doenças oculares pré-existentes.

4.6 Mensuração da exposição à poluição atmosférica

No dia da exposição os participantes receberam pela manhã, às 8:00 horas, o sistema portátil de medidas de poluentes. No dia da avaliação, novamente pela manhã, às 8:00 horas, o equipamento de monitorização foi retornado ao nosso laboratório, perfazendo 24 horas de medida de exposição.

As avaliações (questionário, avaliação clínica e laboratorial) foram realizadas semanalmente em quatro momentos. Era esperado que os níveis de poluição variassem nestas quatro medidas como consequência das características do tráfego e das condições de dispersão dos poluentes. Como indicadores de exposição foram realizadas medidas de material particulado com diâmetro aerodinâmico menor que $2,5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$) e NO_2 . A medida do material particulado foi realizada por meio de um impactador gravimétrico a uma vazão de 1,8 litros/minuto (Figura 6). O ar ambiente foi aspirado para dentro do impactador

por uma bomba, onde um filtro captou o material particulado e as partículas em suspensão no ar, que foram então gravimetricamente calculados.

Figura 6. Impactador gravimétrico (a esquerda) utilizado para medição de material particulado e aparelho posicionado dentro de um suporte junto ao voluntário (a direita)

Adicionalmente foi utilizado um tubo passivo de baixo custo, desenvolvido em nosso laboratório para medida de NO_2 . Os indivíduos carregaram o sistema passivo, que incluía um filtro de celulose (Energética, Rio de Janeiro, Brasil) impregnado com uma solução absorbante composta por trietanolamina 2%, o-metoxifenol 0,05% e metabissulfito de sódio 0,025%, que foi colocado dentro de um tubo plástico com uma das extremidades abertas ao ar ambiente e depois alocado dentro de uma capa protetora (Figura 7).

A concentração de nitrito produzida durante o período de amostragem foi determinada colorimetricamente pela reação do reagente exposto com sulfanilamida e ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfônico a um comprimento de onda de 550 nm.

Figura 7. (A) Tubo passivo para medição de NO₂ alocado dentro de uma capa protetora. (B) Papel de celulose com substância absorbante (seta) posicionado dentro de um tubo plástico com uma de suas extremidades abertas ao ar ambiente

Antes do estudo a eficácia e a sensibilidade deste método foram avaliadas colocando-se os medidores perto de um monitor da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), sendo constatada acurácia de 98,6% e precisão de 80%¹⁵. A idéia básica foi montar um sistema portátil de medidas de poluição do ar, que pudesse acompanhar os voluntários em suas atividades diárias (ao longo de 24 horas). Os voluntários foram orientados a manter os equipamentos durante todas as suas atividades diárias e ao lado da sua cama a noite.

4.7 Avaliação clínica - primeira e terceira avaliações

Todos os pacientes foram submetidos ao teste de acuidade visual com o emprego da tabela de Snellen seguido de exame ocular de pálpebras, córnea e conjuntiva sob biomicroscopia na lâmpada de fenda.

4.7.1 Ocular Surface Disease Index (OSDI)

O questionário OSDI para a avaliação de sinais e sintomas de irritação ocular e olho seco, traduzido para o português⁹³, foi aplicado por um único examinador. Desenvolvido pelo grupo de pesquisa da empresa Allergan (Irvine, Califórnia, EUA), trata-se de um questionário composto por 12 itens que permite rápido acesso aos sintomas de irritação ocular consistentes com a doença do olho seco e seus impactos sobre a função visual⁹⁴ (Figura 8). O questionário inclui três subescalas: desconforto ocular (OSDI - sintomas), que mensura os sintomas como sensação de areia e dor ocular; função visual (OSDI - função), que mensura as limitações oculares nas atividades diárias como leitura ou trabalhar no computador; e desencadeantes ambientais (OSDI - desencadeantes), que mensura o impacto dos fatores ambientais como vento ou pó nos sintomas oculares⁹³. As questões são referentes aos últimos sete dias. As possíveis respostas são: em nenhum momento, em alguns momentos, metade do tempo, a maior parte do tempo e o tempo todo. As respostas ao OSDI podem ser quantificadas de 0 a 100, com maiores valores indicando maior desconforto⁹⁴.

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 todo (4)	A maior parte do tempo (3)	A metade do tempo (2)	Em alguns momentos (1)	Em nenhum momento (0)	Não estive em lugar assim na semana que passou
10	Lugares com vento?						
11	Lugares muito secos ou com pó?						
12	Lugares com ar-condicionado?						

Figura 8. Questionário de sintomas oculares OSDI - Ocular Surface Disease Index. Composto por 12 questões, subdividido em três subescalas, a fim de se calcular e quantificar as queixas oculares referentes aos últimos sete dias

4.7.2 Tempo de ruptura do filme lacrimal

Para medir o TRFL uma fita de fluoresceína (Ophthalmos, São Paulo, Brasil) com uma gota de solução salina foi aplicada na conjuntiva tarsal inferior e o paciente foi instruído a piscar naturalmente várias vezes para espalhar o corante. Após 10 a 30 segundos da aplicação, o paciente foi orientado a fixar o olhar sem piscar. Com uma magnificação de 10x na lâmpada de fenda e mantendo a iluminação constante (filtro azul-cobalto), o tempo entre o último piscar e o aparecimento da primeira ruptura no filme lacrimal foi medido (Figura 9). O teste foi repetido três vezes em cada olho e a média foi calculada⁴⁹.

Figura 9. Tempo de ruptura do filme lacrimal. Corante fluoresceína instilado na superfície ocular, sendo o tempo entre o último piscar completo e a visualização do rompimento do filme lacrimal (seta) medido com auxílio do filtro azul-cobalto

4.7.3 Corantes vitais fluoresceína e lissamina verde

O padrão de impregnação da fluoresceína foi usado na córnea e o padrão de impregnação da lissamina verde foi usado na conjuntiva^{95, 96}. Na fita de fluoresceína (Ophthalmos, São Paulo, Brasil) é aplicada uma única gota de solução salina, o excesso de solução é retirado e a pálpebra inferior do olho direito é puxada para baixo, sendo a fita colocada gentilmente na conjuntiva tarsal inferior. O processo foi repetido no olho esquerdo. Filtro azul-cobalto da lâmpada de fenda é utilizado para a visualização e graduação do corante. No seguimento do exame, a fita de lissamina verde (Ophthalmos, São Paulo, Brasil) foi aplicada de forma similar a de fluoresceína em ambos os olhos e o padrão de impregnação da conjuntiva foi analisado. O sistema de Van Bijsterveld⁶⁰ foi utilizado para mensurar o tingimento dos corantes. Esta escala divide a superfície ocular em três zonas (Figura 10). Cada zona é avaliada pela densidade da coloração no valor de 0 a 3, sendo 0 a ausência do corante e 3 sua impregnação confluenta, podendo somar um total máximo de 9 por olho. Um valor total igual ou maior a 4, para um olho, constituiria um teste positivo.

Pontuação com Lissamina Verde
Pontuação máxima total = 9

Pontuação com Fluoresceína
Pontuação máxima total = 9

Figura 10. Desenho esquematizado da divisão da superfície ocular e da córnea para pontuação das colorações com lissamina verde e fluoresceína

4.7.4 Teste de Schirmer

A fita de Schirmer (Ophthalmos, São Paulo, Brasil) foi colocada no fórnice inferior, entre o terço médio e o terço lateral da pálpebra inferior, e o olho foi mantido fechado por 5 minutos (Figura 11). O papel foi removido após 5 minutos e a mensuração foi realizada. O teste foi realizado sem a utilização de anestesia tópica. A extensão da área molhada foi medida conforme escala contida na fita. Os valores variam de 0 a 35 milímetros com valores abaixo de 10 mm indicando alteração na produção de lágrima⁹⁷.

Figura 11. Teste de Schirmer I. Fita de papel Whatman N° 41 posicionada na junção entre o terço médio e lateral da margem palpebral inferior; após 5 minutos a extensão molhada na fita é observada

4.8 Avaliação laboratorial - segunda e quarta avaliações

4.8.1 Osmolaridade lacrimal

Amostras de lágrimas foram coletadas do menisco inferior do canto lateral do olho direito por meio de capilares de 10 μ L, sendo estas imediatamente armazenadas e congeladas a -80°C (Figura 12).

Figura 12. Coleta de lágrima no canto lateral do olho direito por meio de um microcapilar de 10 μ L

O Advanced micro-osmometer modelo 3300 (Advanced Instruments, Norwood, Massachusetts, EUA) foi utilizado para análise das amostras. Uma vez que o equipamento é desenvolvido para processar amostras de 20 μL , as amostras de lágrimas foram diluídas em água destilada e inseridas dentro de uma câmara térmica no osmômetro para se determinar a osmolaridade lacrimal baseado no ponto de congelamento. A osmolaridade lacrimal é calculada em miliosmol/Kg (mOsmol/Kg). A osmolaridade lacrimal como um único teste fisiológico apresenta a capacidade de definir e diferenciar olhos secos de olhos “normais” com um alto nível de acurácia (90%), sendo que um nível de corte de 316 mOsmol/Kg apresenta uma alta sensibilidade, especificidade e valor preditivo para olho seco^{79, 98}.

4.8.2 Citologia de impressão

A citologia de impressão é um método não invasivo para avaliação da superfície ocular, que inclui o epitélio da conjuntiva e da córnea⁸⁸. O papel filtro, quando aplicado sobre a superfície córneo-conjuntival, remove amostras que contêm de uma a três camadas de células epiteliais, e preserva as características morfológicas das células obtidas⁸⁴. Filtros semicirculares de 15 mm de diâmetro (poro de 22 μm , Millipore Corp., Bedford, EUA), foram justapostos à conjuntiva tarsal temporal inferior e bulbar temporal após a instilação de uma gota de colírio anestésico (tetracaína 0,5%) no olho esquerdo (Figura 13).

Figura 13. Coleta de amostra para citologia de impressão pela aplicação do papel filtro de acetato de celulose na conjuntiva ocular com o auxílio de uma pinça

Os fragmentos foram aplicados por aproximadamente 10 segundos e, após leve pressão com a ponta romba de uma pinça cirúrgica em toda extensão do fragmento, esses foram removidos suavemente por uma das extremidades e imediatamente imersos em pequenos tubos contendo 1,5 mL de álcool absoluto. Após a coleta, as amostras foram levadas ao Laboratório de Investigação Médica, onde foram processadas. Os espécimes foram então reidratados com álcool etílico a 70% e imersos sucessivamente em PAS, *alcian blue*, metabissulfito de sódio, hematoxilina de Gill e água de Scott. Na sequência foram lavados com álcool etílico a 95% e álcool absoluto. Depois foi utilizado xileno para tornar o papel filtro transparente. Os fragmentos de papel foram colocados nas lâminas com as células epiteliais viradas para cima (face da lamínula). As lâminas foram analisadas por microscopia óptica e foi

realizada a contagem do número de células caliciformes para a obtenção da média em 13 campos de alta magnificação (400x) por lâmina.

4.9 Análise estatística

Foi realizada a análise descritiva de todas as variáveis em estudo. As variáveis qualitativas foram apresentadas em termos de seus valores absolutos e relativos. As variáveis quantitativas foram apresentadas em termos de seus valores de tendência central e de dispersão. Para as variáveis quantitativas (questionário OSDI, tempo de ruptura do filme lacrimal, teste de Schirmer, osmolaridade lacrimal, citologia de impressão e perfil de mucinas) a aderência à curva normal e a homogeneidade das variâncias foram verificadas através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente.

Para estimar os efeitos dos poluentes ($PM_{2,5}$ e NO_2) nos desfechos ao longo do período do estudo adotamos equações de estimavas generalizadas considerando efeitos fixos para medidas repetidas. Este método foi proposto por Zeger e Liang⁹⁹ (1986) para análise de dados longitudinais ou de medidas repetidas onde medidas seriadas de determinada variável são realizadas ao longo de um período de tempo. Nesta situação assume-se a existência de correlações entre as medidas realizadas em um mesmo indivíduo. Associação entre as variáveis clínicas e laboratoriais foram determinadas usando correlação de Spearman.

O valor de significância adotado foi de p menor que 0,05.

5 RESULTADOS

Um total de 71 indivíduos, sendo 54 taxistas e 17 controladores de tráfego, adentraram ao estudo. A idade dos voluntários variou entre 31 e 65 anos (média e DP de $46,79 \pm 9,7$ anos). A temperatura ambiente durante a realização dos exames variou entre 17,4 e 22,4°C e a umidade relativa do ar entre 52 e 76% ($63,35\% \pm 6,15\%$). Os níveis médios de NO_2 e $\text{PM}_{2,5}$ em cada visita estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Média $\pm$ desvio padrão (DP) dos níveis de dióxido de nitrogênio (NO_2) e de material particulado menor que 2,5 μm ($\text{PM}_{2,5}$) nas visitas 1 a 4 nos taxistas e controladores de tráfego da cidade de São Paulo

	Média $\pm$ DP			
	VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3	VISITA 4
$\text{PM}_{2,5}$ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	42,42 $\pm$ 24,04	40,49 $\pm$ 18,25	39,58 $\pm$ 19,1	33,8 $\pm$ 14,99
NO_2 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	201,14 $\pm$ 43,26	179,75 $\pm$ 43,44	196,35 $\pm$ 48,97	187,5 $\pm$ 45,8

Os níveis de exposição à poluição do ar foram muito elevados durante todo o estudo com níveis médios de $\text{PM}_{2,5}$ de 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Os níveis médios de NO_2 permaneceram constantemente acima de 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, nível recomendado pela diretriz sobre qualidade do ar da OMS¹⁶, em todas as semanas.

A tabela 4 resume os dados relativos ao OSDI, assim como os valores do TRFL e do teste de Schirmer. Os valores médios de cada parâmetro foram semelhantes em ambas as avaliações. Não houve achados significativos nos

valores do OSDI, demonstrando que os indivíduos apresentaram baixo grau de sintomas durante o estudo. Os valores médios do TRFL foram reduzidos, sendo significativamente inferiores a 10 segundos em ambos os olhos. As médias do teste de Schirmer, por sua vez, permaneceram acima de 10 mm para ambos os olhos, embora uma grande variabilidade tenha sido observada.

Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão (DP) dos valores do questionário OSDI, Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL) e teste de Schirmer na primeira e terceira visita em 71 taxistas e controladores de tráfico da cidade de São Paulo

	Média $\pm$ DP	
	VISITA 1	VISITA 3
OSDI	9,18 $\pm$ 6,81	8,27 $\pm$ 11,92
TRFL (segundos)		
OD	5,9 $\pm$ 3,4	5,2 $\pm$ 3,1
OE	5,6 $\pm$ 2,9	4,9 $\pm$ 3,0
Teste de Schirmer (mm)		
OD	12,43 $\pm$ 8,9	11,53 $\pm$ 8,5
OE	13,27 $\pm$ 9,8	10,35 $\pm$ 8,6

OD = Olho Direito, OE = Olho Esquerdo

A tabela 5 mostra os valores obtidos com o tingimento dos corantes vitais fluoresceína e lissamina verde. A pontuação do corante vital fluoresceína foi menor do que quatro em todos os olhos, exceto por um (0,7%) indivíduo (com uma pontuação de 5). A pontuação do corante vital lissamina verde na

conjuntiva foi considerada normal, ou seja valor menor do que quatro, em 124 (87,3%) olhos na primeira visita e em 120 (84,5%) olhos na terceira visita.

Tabela 5. Frequências nas pontuações dos corantes vitais fluoresceína e lissamina verde na primeira e terceira visita em taxistas e controladores de tráfego da cidade de São Paulo

	Pontuação dos corantes vitais													
	VISITA 1							VISITA 3						
	0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	5	6
Fluoresceína OD	54	12	3	2	0	0	0	52	13	5	1	0	0	0
Fluoresceína OE	50	15	3	3	0	0	0	47	18	4	1	0	1	0
Lissamina Verde OD	23	12	10	16	8	1	1	24	18	7	13	6	2	3
Lissamina Verde OE	20	16	13	14	7	1	0	21	19	12	8	8	3	0

OD = Olho Direito, OE = Olho Esquerdo

Na análise laboratorial dos taxistas e controladores de tráfego, a média e o DP dos valores da osmolaridade lacrimal (média $\pm$ desvio padrão) foram $298,56 \pm 23,19$ e $303,72 \pm 23,52$ mOsmol/kg na segunda e quarta visita, respectivamente. As médias da osmolaridade lacrimal em ambas as visitas permaneceram dentro dos limites da normalidade. No que se refere a densidade de células caliciformes, as contagens de células (média $\pm$ desvio padrão) foram $735,52 \pm 295,87$ e $707,92 \pm 272,51$ células/mm² na conjuntiva tarsal e $464,42 \pm 256,66$ e $407,82 \pm 269,18$ células/mm² na conjuntiva bulbar, na segunda e quarta visita, respectivamente (tabela 6).

Tabela 6. Média e desvio padrão (DP) da osmolaridade lacrimal (mOsmol/Kg) e da densidade de células caliciformes (células/mm²) na segunda e quarta visita nos taxista e controladores de tráfego da cidade de São Paulo

	Média ± DP	
	Visita 2	Visita 4
Osmolaridade lacrimal	298,56 ± 23,19	303,72 ± 23,52
DCC tarsal	735,52 ± 295,87	707,92 ± 272,51
DCC bulbar	464,42 ± 256,66	407,82 ± 269,18

DCC = densidade de células caliciformes

Foram verificadas as correlações entre os níveis de poluição obtidas em cada indivíduo e os achados clínicos. Nenhuma associação significativa entre OSDI, TRFL, teste de Schirmer ou coloração dos corantes vitais e os níveis de PM_{2,5} e NO₂ foi observada.

Em relação à avaliação laboratorial, uma correlação significativa e negativa foi encontrada entre os valores de PM_{2,5} e os níveis de osmolaridade do filme lacrimal. As análises de equações de estimativas generalizadas indicaram que para cada aumento de 10 µg/m³ de PM_{2,5} houve uma diminuição de 10,9 mOsmol/kg na osmolaridade lacrimal ($p < 0,05$) (Figura 14). Também houve uma negativa, embora não significativa ($p > 0,05$), correlação entre os níveis de osmolaridade e os valores de NO₂ (Figura 15). Associações estatisticamente significativas entre os achados nas avaliações clínicas e a osmolaridade lacrimal não foram observadas.

Figura 14. Efeitos da exposição de $PM_{2,5}$ (quartis) na osmolaridade lacrimal (mOsmol/Kg) dos taxista e controladores de tráfego da cidade de São Paulo

Figura 15. Efeitos da exposição de NO_2 (quartis) na osmolaridade lacrimal (mOsmol/Kg) dos taxistas e controladores de tráfego da cidade de São Paulo

No que se refere a citologia de impressão conjuntival, as análises de equações de estimativas generalizadas não evidenciaram uma associação entre a densidade de células caliciformes e os indicadores de poluição ambiental ($p>0,05$). Também não foram encontradas correlações estatisticamente significativas entre a densidade de células caliciformes (figura 16) e os parâmetros clínicos (OSDI, TRFL, teste de Schirmer e corantes vitais), assim como não houve correlação entre a densidade de células caliciformes e a osmolaridade lacrimal.

Figure 16. Fotografia da citologia de impressão conjuntival. Seta indicando célula caliciforme

6 *DISCUSSÃO*

Recentemente, houve um crescente interesse na compreensão dos possíveis efeitos prejudiciais da poluição ambiental no aparelho visual¹⁰. Os efeitos agudos dos poluentes do ar sobre a superfície ocular são bem conhecidos e incluem prurido, lacrimejamento, sensação de corpo estranho e hiperemia dos olhos¹². No entanto, os efeitos oculares da exposição crônica à níveis elevados de poluição ainda são pouco conhecidos.

No presente estudo os indivíduos foram expostos à elevados níveis de $PM_{2,5}$ e NO_2 uma vez que estes níveis permaneceram significativamente acima dos limites recomendados pelas diretrizes da OMS publicadas em 2006¹⁶. Os níveis observados durante todo o nosso período de estudo podem ser considerados, portanto, como representativos de uma exposição alta e crônica à poluição atmosférica.

Além disso, também relatamos que os indivíduos cronicamente expostos à poluição ambiental apresentaram TRFL reduzido e que os níveis de osmolaridade lacrimal se correlacionaram com os níveis de $PM_{2,5}$. Nosso achado do TRFL reduzido está de acordo com estudos de Gupta et al¹² e Saxena et al¹³ que encontraram a mesma instabilidade do filme lacrimal como resultado da exposição a níveis elevados de poluição ambiental em Nova Dehli, na Índia. Adicionalmente, um estudo recente do nosso grupo envolvendo 55 voluntários mostrou a mesma instabilidade do filme lacrimal associada com a exposição a poluição atmosférica⁹². Todos estes dados são consistentes com a teoria de que a exposição crônica a poluição do ar interfere na unidade funcional da superfície ocular.

Este é o primeiro estudo a abordar a mensuração da osmolaridade do filme lacrimal e níveis ambientais de poluição do ar. A avaliação da osmolaridade da lágrima representa como única medida biofísica o saldo da dinâmica do filme lacrimal. Tem sido sugerido que a hiperosmolaridade lacrimal seja a principal causa de desconforto, de lesão da superfície ocular e de consequente inflamação em pacientes com olho seco¹⁰⁰⁻¹⁰². Em uma meta-análise realizada por Tomlinson et al⁷⁹, o ponto de intercepção entre as curvas de distribuição da osmolaridade em olhos “normais” e olhos com ceratoconjuntivite sicca foi de 316 mOsmol/Kg. Em nosso estudo, os níveis médios de osmolaridade lacrimal estão dentro dos limites da normalidade, entretanto foram claramente correlacionados com os níveis de PM_{2,5}; quanto maior o nível de PM_{2,5}, mais baixos os valores de osmolaridade lacrimal (Figura 14). Nossos dados mostraram que, mesmo em condição de exposição crônica à altas concentrações de poluição do ar e variando dentro de uma faixa relativamente pequena de poluição (~ 10 ug/m³ de PM_{2,5} e ~ 30 ug/m³ de NO₂, Tabela 3), uma resposta da superfície ocular em termos de modificações na osmolaridade do filme lacrimal pode ser documentada. A disponibilidade de medições individuais de poluição do ar, em nosso estudo, forneceu portanto uma acurácia suficiente para se correlacionar com as medidas de osmolaridade lacrimal.

A pontuação do questionário OSDI relativamente baixa e a falta de correlação entre os sintomas e os níveis de poluição do ar nos taxistas e controladores de tráfego difere de um estudo anterior realizado em nosso laboratório⁹², que demonstrou um padrão de dose-resposta entre a pontuação

do OSDI e os níveis de NO₂. No entanto, é importante considerar que Novaes et al⁹² recrutaram seus voluntários entre os funcionários do HC-FMUSP, tendo estes níveis relativamente baixos de exposição ao NO₂ (inferior a 40 µg/m³) em comparação ao atual estudo, que envolveu um grupo homogêneo de indivíduos (níveis de exposição de NO₂ acima de 175 µg/m³), presumivelmente adaptados aos níveis elevados de exposição à poluição do ar. Na presença de estimulação contínua ou repetida, receptores sensoriais exibem uma redução acentuada na capacidade de resposta. A adaptação perceptiva, uma propriedade fundamental de todos os sistemas sensoriais, altera-se para atenuar as respostas neurais a estímulos contínuos ou redundantes como meio de aumentar a detecção de um novo e transitório estímulo¹⁰³. Este mecanismo é comumente observado nos sistemas olfativo e auditivo, nos quais a adaptação é conseguida mudando a sensibilidade do receptor para concentrações mais elevadas de estímulo, aumentando assim a intensidade dos níveis de saturação ao estímulo^{104, 105}.

No que se refere a densidade de células caliciformes, apesar do presente estudo não estabelecer uma correlação significativa e positiva entre os elevados níveis de poluição e a contagem destas células, também torna-se importante enfatizar que a média da densidade de células caliciformes no atual estudo encontra-se bem acima (tabela 6) daquela relatada por Novaes et al¹⁵ (densidade de células caliciformes na conjuntiva tarsal: 325,80 ± 147,90 células/mm²), reforçando a suspeita de hiperplasia das células caliciformes em decorrência da poluição ambiental. De fato, estudos prévios em modelos animais¹⁰⁶ e em humanos¹⁰⁷ demonstraram a hiperplasia de células

caliciformes como uma resposta estereotipada das superfícies mucosas quando expostas a poluição do ar.

Assim, acreditamos que a relativa ausência de sintomas neste grupo seja uma indicação de adaptação dos indivíduos. Nossa hipótese baseia-se na exposição constante à níveis elevados de poluição do ar induzindo uma resposta adaptativa na superfície ocular. Elevados níveis de $PM_{2,5}$ e NO_2 , associados talvez a outros poluentes, induzem por uma via ainda não conhecida o aumento do número de células caliciformes. Supostamente estas células aumentam a concentração de mucinas no filme lacrimal, que por sua capacidade de retenção de água na superfície ocular, levam a uma consequente redução relativa da osmolaridade lacrimal. A manutenção da homeostasia da superfície ocular provavelmente é o que mantém os indivíduos livres de sintomas. Talvez, o teste de Schirmer e as pontuações dos corantes vitais dentro dos limites da normalidade sejam consequências desta adaptação. Por outro lado, os nossos dados (Tabelas 4, Figuras 14 e 15) mostram um grau substancial de variabilidade na resposta a níveis semelhantes de poluição do ar. Embora a média da osmolaridade lacrimal esteja dentro do valor de referência⁷⁹, alguns indivíduos apresentaram um valor acima de 316 mOsmol/kg, o que sugere que alguns indivíduos possam ter uma maior susceptibilidade a agentes tóxicos transportados pelo ar.

Além disso, a resposta hiperplásica das células caliciformes da conjuntiva ocular pode ter um limite de saturação. Presumivelmente, uma vez que estes mecanismos adaptativos (hiperplasia de células caliciformes,

aumento de mucinas e diminuição relativa da osmolaridade lacrimal) falhem como resultado da exposição crônica à poluição do ar, a diminuição de células caliciformes, associada a diminuição de mucinas e a hiperosmolaridade lacrimal, poderiam induzir aos sinais e sintomas de olho seco.

Em resumo, o presente estudo indica que a exposição crônica a níveis elevados de poluição ambiental induz uma alteração nos níveis de osmolaridade lacrimal. Nós propomos que talvez esta modificação junto com outras alterações, como hiperplasia de células caliciformes, estejam envolvidas na resposta adaptativa da superfície ocular. O mecanismo exato pelo qual a poluição do ar interfere no filme lacrimal, córnea e conjuntiva ainda permanece incerto. Novos estudos são necessários para se estabelecer quais indivíduos são capazes de compensar as modificações induzidas pela poluição ambiental e como as mucinas oculares participam deste processo. Tais informações podem ser úteis para se prevenir distúrbios crônicos consequentes da exposição à poluição ambiental.

7 CONCLUSÕES

- Nas condições deste estudo, exposição crônica à elevados níveis de poluição do ar induz a diminuição do tempo de ruptura do filme lacrimal. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre os níveis elevados dos poluentes $PM_{2,5}$ ou NO_2 e o questionário de sintomas OSDI, o teste de Schirmer e o tingimento com corantes vitais.
- Houve uma correlação negativa e significativa entre os níveis de $PM_{2,5}$ e de osmolaridade lacrimal. Houve uma tendência de associação negativa entre os níveis de NO_2 e de osmolaridade lacrimal. Não houve correlação estatisticamente significativa entre a contagem de células caliciformes tarsal ou bulbar e os níveis de poluição ambiental.
- Os achados presentes no estudo suportam a hipótese de alterações na superfície ocular como uma resposta adaptativa aos poluentes ambientais do ar. Supostamente, a diminuição da osmolaridade lacrimal junto com a hiperplasia de células caliciformes atuam para manter a homeostasia na superfície ocular e manter os indivíduos livres de sintomas oculares.

8 *ANEXOS*

Anexo A. Aprovação da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo

Ao

Departamento de Patologia

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, informa que o Protocolo de Pesquisa nº **0565/07**, intitulado: "**Avaliação dos efeitos da exposição aguda ao material particulado em controladores de tráfego da cidade de São Paulo**", que tem como pesquisador responsável o Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, contempla o sub-projeto intitulado: "Avaliação dos efeitos de diferentes níveis de poluição atmosférica sobre a superfície ocular de controladores de tráfego e taxistas na cidade de São Paulo", que será tese de doutorado do aluno **ANDRÉ AUGUSTO MIRANDA TORRICELLI**, pelo Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, tendo como orientador **PROF. DR. MÁRIO LUIZ RIBEIRO MONTEIRO**

CAPPesq, 28 de abril de 2011.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Coordenador

Comissão Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq

9 *REFERÊNCIAS*

1. Perez L, Rapp R, Kunzli N. The Year of the Lung: outdoor air pollution and lung health. *Swiss Med Wkly*. 2010;140:w13129.
2. Dockery DW, Pope CA, 3rd, Xu X, et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med*. Dec 9 1993;329(24):1753-1759.
3. Pope CA, 3rd, Schwartz J, Ransom MR. Daily mortality and PM10 pollution in Utah Valley. *Arch Environ Health*. May-Jun 1992;47(3):211-217.
4. Katsouyanni K, Touloumi G, Spix C, et al. Short-term effects of ambient sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities: results from time series data from the APHEA project. Air Pollution and Health: a European Approach. *BMJ*. Jun 7 1997;314(7095):1658-1663.
5. Pope CA, 3rd, Thun MJ, Namboodiri MM, et al. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med*. Mar 1995;151(3 Pt 1):669-674.
6. Bucchieri F, Puddicombe SM, Lordan JL, et al. Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Aug 2002;27(2):179-185.
7. Leitte AM, Schlink U, Herbarth O, et al. Size Segregated Particle Number Concentrations and Respiratory Emergency Room Visits in Beijing, China. *Environ Health Perspect*. Nov 30 2011.
8. Barnett AG, Williams GM, Schwartz J, et al. The effects of air pollution on hospitalizations for cardiovascular disease in elderly people in Australian and New Zealand cities. *Environ Health Perspect*. Jul 2006;114(7):1018-1023.

9. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thun MJ, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama*. Mar 6 2002;287(9):1132-1141.
10. Wolkoff P. Ocular discomfort by environmental and personal risk factors altering the precorneal tear film. *Toxicol Lett*. Dec 15 2010;199(3):203-212.
11. Wolkoff P, Karcher T, Mayer H. Problems of the "outer eyes" in the office environment: an ergophthalmologic approach. *J Occup Environ Med*. May 2012;54(5):621-631.
12. Gupta SK, Gupta V, Joshi S, Tandon R. Subclinically dry eyes in urban Delhi: an impact of air pollution? *Ophthalmologica*. Sep-Oct 2002;216(5):368-371.
13. Saxena R, Srivastava S, Trivedi D, Anand E, Joshi S, Gupta SK. Impact of environmental pollution on the eye. *Acta Ophthalmol Scand*. Oct 2003;81(5):491-494.
14. Versura P, Profazio V, Cellini M, Torreggiani A, Caramazza R. Eye discomfort and air pollution. *Ophthalmologica*. 1999;213(2):103-109.
15. Novaes P, do Nascimento Saldiva PH, Kara-Jose N, et al. Ambient levels of air pollution induce goblet-cell hyperplasia in human conjunctival epithelium. *Environ Health Perspect*. Dec 2007;115(12):1753-1756.
16. WHO's global air-quality guidelines. *Lancet*. Oct 14 2006;368(9544):1302.
17. Chen B, Kan H. Air pollution and population health: a global challenge. *Environ Health Prev Med*. Mar 2008;13(2):94-101.

18. Hao J, Wang L. Improving urban air quality in China: Beijing case study. *J Air Waste Manag Assoc.* Sep 2005;55(9):1298-1305.
19. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet.* Oct 19 2002;360(9341):1233-1242.
20. Touloumi G, Katsouyanni K, Zmirou D, et al. Short-term effects of ambient oxidant exposure on mortality: a combined analysis within the APHEA project. Air Pollution and Health: a European Approach. *Am J Epidemiol.* Jul 15 1997;146(2):177-185.
21. Bell ML, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, Dominici F. Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987-2000. *JAMA.* Nov 17 2004;292(19):2372-2378.
22. Gipson IK. The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Oct 2007;48(10):4390; 4391-4398.
23. Williams K, Watsky M. Gap junctional communication in the human corneal endothelium and epithelium. *Curr Eye Res.* Jul 2002;25(1):29-36.
24. Walcott B, Moore LC, Birzgalis A, et al. Role of gap junctions in fluid secretion of lacrimal glands. *Am J Physiol Cell Physiol.* Mar 2002;282(3):C501-507.
25. Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, et al. Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res.* Sep 2001;20(5):639-673.
26. Paulsen FP, Schaudig U, Thale AB. Drainage of tears: impact on the ocular surface and lacrimal system. *Ocul Surf.* Oct 2003;1(4):180-191.

27. Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res.* Sep 1999;19(3):201-211.
28. Spurr-Michaud S, Argueso P, Gipson I. Assay of mucins in human tear fluid. *Exp Eye Res.* May 2007;84(5):939-950.
29. Gipson IK, Hori Y, Argueso P. Character of ocular surface mucins and their alteration in dry eye disease. *Ocul Surf.* Apr 2004;2(2):131-148.
30. Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res.* Mar 2004;78(3):379-388.
31. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* Apr 2007;5(2):75-92.
32. Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* Apr 2007;5(2):108-152.
33. Dilly PN. Contribution of the epithelium to the stability of the tear film. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1985;104 (Pt 4):381-389.
34. Gipson IK, Inatomi T. Cellular origin of mucins of the ocular surface tear film. *Adv Exp Med Biol.* 1998;438:221-227.
35. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:607-634.

-
36. Dartt DA. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res.* Feb 2004;78(2):173-185.
 37. Lemp MA. Epidemiology and classification of dry eye. *Adv Exp Med Biol.* 1998;438:791-803.
 38. Mantelli F, Argueso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* Oct 2008;8(5):477-483.
 39. Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol.* Sep 2006;16(9):467-476.
 40. Perry HD. Dry eye disease: pathophysiology, classification, and diagnosis. *Am J Manag Care.* Apr 2008;14(3 Suppl):S79-87.
 41. The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* Apr 2007;5(2):93-107.
 42. Norn MS. Desiccation of the precorneal film. I. Corneal wetting-time. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1969;47(4):865-880.
 43. Lemp MA. Breakup of the tear film. *Int Ophthalmol Clin.* Spring 1973;13(1):97-102.
 44. Holly FJ, Lemp MA. Wettability and wetting of corneal epithelium. *Exp Eye Res.* Mar 1971;11(2):239-250.
 45. Norn MS. Desiccation of the precorneal film. II. Permanent discontinuity and dellen. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1969;47(4):881-889.

46. Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea*. Jan 1998;17(1):38-56.
47. Nichols KK, Mitchell GL, Zadnik K. The repeatability of clinical measurements of dry eye. *Cornea*. Apr 2004;23(3):272-285.
48. Lin YY, Carrel H, Wang IJ, Lin PJ, Hu FR. Effect of tear film break-up on higher order aberrations of the anterior cornea in normal, dry, and post-LASIK eyes. *J Refract Surg*. Sep-Oct 2005;21(5):S525-529.
49. Lemp MA, Hamill JR, Jr. Factors affecting tear film breakup in normal eyes. *Arch Ophthalmol*. Feb 1973;89(2):103-105.
50. Abelson MB, Ousler GW, 3rd, Nally LA, Welch D, Krenzer K. Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations. *Adv Exp Med Biol*. 2002;506(Pt B):1121-1125.
51. Norn MS. Semiquantitative interference study of fatty layer of precorneal film. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. Oct 1979;57(5):766-774.
52. Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR, Gilbert DJ. A non-invasive instrument for clinical assessment of the pre-corneal tear film stability. *Curr Eye Res*. Jan 1985;4(1):1-7.
53. Goto E, Dogru M, Kojima T, Tsubota K. Computer-synthesis of an interference color chart of human tear lipid layer, by a colorimetric approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Nov 2003;44(11):4693-4697.

-
54. Komuro A, Yokoi N, Kinoshita S, Tiffany JM, Bron AJ, Suzuki T. Assessment of meibomian gland function by a newly-developed laser meibometer. *Adv Exp Med Biol*. 2002;506(Pt A):517-520.
 55. Behrens A, Doyle JJ, Stern L, et al. Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations. *Cornea*. Sep 2006;25(8):900-907.
 56. Turner AW, Layton CJ, Bron AJ. Survey of eye practitioners' attitudes towards diagnostic tests and therapies for dry eye disease. *Clin Experiment Ophthalmol*. Aug 2005;33(4):351-355.
 57. Feenstra RP, Tseng SC. Comparison of fluorescein and rose bengal staining. *Ophthalmology*. Apr 1992;99(4):605-617.
 58. Norn MS. Dead, degenerate, and living cells in conjunctival fluid and mucous thread. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1969;47(5):1102-1115.
 59. Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Surv Ophthalmol*. Mar 2001;45 Suppl 2:S221-226.
 60. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol*. Jul 1969;82(1):10-14.
 61. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea*. Oct 2003;22(7):640-650.
 62. Pritchard N, Edwards K, Shahidi AM, et al. Corneal markers of diabetic neuropathy. *Ocul Surf*. Jan 2011;9(1):17-28.

-
63. Brennan NA, Bruce AS. Esthesiometry as an indicator of corneal health. *Optom Vis Sci.* Sep 1991;68(9):699-702.
 64. Savini G, Prabhawasat P, Kojima T, Grueterich M, Espana E, Goto E. The challenge of dry eye diagnosis. *Clin Ophthalmol.* Mar 2008;2(1):31-55.
 65. De Roetth A, Sr. Lacrimation in normal eyes. *AMA Arch Ophthalmol.* Feb 1953;49(2):185-189.
 66. Halberg GP, Berens C. Standardized Schirmer tear test kit. *Am J Ophthalmol.* May 1961;51:840-842.
 67. Jones LT, Marquis MM, Vincent NJ. Lacrimal function. *Am J Ophthalmol.* May 1972;73(5):658-659.
 68. Loran DF, French CN, Lam SY, Papas E. Reliability of the wetting value of tears. *Ophthalmic Physiol Opt.* 1987;7(1):53-56.
 69. Doughman DJ. Pathophysiology and diagnosis of tear film abnormalities. Clinical tests. *Int Ophthalmol Clin.* Spring 1973;13(1):199-217.
 70. Wright JC, Meger GE. A review of the Schirmer test for tear production. *Arch Ophthalmol.* May 1962;67:564-565.
 71. Pandher KS, Mengher LS, Duerden JM, Bron AJ. Effect of meibomian oils on Schirmer tear test. *Acta Ophthalmol (Copenh).* Dec 1985;63(6):695-697.
 72. Hanson J, Fikertscher R, Roseburg B. Schirmer test of lacrimation. Its clinical importance. *Arch Otolaryngol.* May 1975;101(5):293-295.

-
73. Lamberts DW, Foster CS, Perry HD. Schirmer test after topical anesthesia and the tear meniscus height in normal eyes. *Arch Ophthalmol*. Jun 1979;97(6):1082-1085.
 74. Shapiro A, Merin S. Schirmer test and break-up time of tear film in normal subjects. *Am J Ophthalmol*. Oct 1979;88(4):752-757.
 75. Jordan A, Baum J. Basic tear flow. Does it exist? *Ophthalmology*. Sep 1980;87(9):920-930.
 76. Hida RY, Nishiwaki-Dantas MC, Hida MM, Tsubota K. [Quantitative tear study using the red phenol test in the Brazilian population]. *Arq Bras Oftalmol*. Jul-Aug 2005;68(4):433-437.
 77. Rolando M, Baldi F, Calabria G. Tear mucus crystallization in children with cystic fibrosis. *Ophthalmologica*. 1988;197(4):202-206.
 78. Felberg S, Cordeiro H, Sato EH, et al. [Reproducibility of the classification of ocular ferning patterns in Sjogren's syndrome patients]. *Arq Bras Oftalmol*. Mar-Apr 2008;71(2):228-233.
 79. 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*. Oct 2006;47(10):4309-4315.
 80. Martin DK. Osmolality of the tear fluid in the contralateral eye during monocular contact lens wear. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. Oct 1987;65(5):551-555.
 81. Farris RL. Tear analysis in contact lens wearers. *CLAO J*. Apr-Jun 1986;12(2):106-111.

-
82. Iskeleli G, Karakoc Y, Aydin O, Yetik H, Uslu H, Kizilkaya M. Comparison of tear-film osmolarity in different types of contact lenses. *CLAO J.* Oct 2002;28(4):174-176.
 83. Doughty MJ. Goblet cells of the normal human bulbar conjunctiva and their assessment by impression cytology sampling. *Ocul Surf.* Jul 2012;10(3):149-169.
 84. Martinez AJ, Mills MB, Jaceldo KB, et al. Standardization of conjunctival impression cytology. *Cornea.* Sep 1995;14(5):515-522.
 85. Egbert PR, Lauber S, Maurice DM. A simple conjunctival biopsy. *Am J Ophthalmol.* Dec 1977;84(6):798-801.
 86. Nelson JD, Wright JC. Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disease. *Arch Ophthalmol.* Jul 1984;102(7):1049-1051.
 87. Singh R, Joseph A, Umapathy T, Tint NL, Dua HS. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol.* Dec 2005;89(12):1655-1659.
 88. Dart J. Impression cytology of the ocular surface--research tool or routine clinical investigation? *Br J Ophthalmol.* Nov 1997;81(11):930.
 89. Paschides CA, Stefaniotou M, Papageorgiou J, Skourtis P, Psilas K. Ocular surface and environmental changes. *Acta Ophthalmol Scand.* Feb 1998;76(1):74-77.
 90. Kjaergaard S. Assessment of eye irritation in humans. *Ann N Y Acad Sci.* Apr 30 1992;641:187-198.
 91. Tseng SC, Hirst LW, Maumenee AE, Kenyon KR, Sun TT, Green WR. Possible mechanisms for the loss of goblet cells in mucin-deficient disorders. *Ophthalmology.* Jun 1984;91(6):545-552.

-
92. Novaes P, Saldiva PH, Matsuda M, et al. The effects of chronic exposure to traffic derived air pollution on the ocular surface. *Environ Res*. May 2011;110(4):372-374.
 93. Prigol AM, Tenorio MB, Matschinske R, Gehlen ML, Skare T. [Translation and validation of ocular surface disease index to Portuguese]. *Arq Bras Oftalmol*. Jan-Feb 2012;75(1):24-28.
 94. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol*. May 2000;118(5):615-621.
 95. O'Donnell C, Wolffsohn JS. Grading of corneal transparency. *Cont Lens Anterior Eye*. Dec 2004;27(4):161-170.
 96. Toda I, Tsubota K. Practical double vital staining for ocular surface evaluation. *Cornea*. Jul 1993;12(4):366-367.
 97. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. Jun 2002;61(6):554-558.
 98. Suzuki M, Massingale ML, Ye F, et al. Tear osmolarity as a biomarker for dry eye disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Sep 2011;51(9):4557-4561.
 99. Zeger SL, Liang KY. Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics*. Mar 1986;42(1):121-130.
 100. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J*. Oct 1995;21(4):221-232.

-
101. Gilbard JP, Rossi SR, Heyda KG. Tear film and ocular surface changes after closure of the meibomian gland orifices in the rabbit. *Ophthalmology*. Aug 1989;96(8):1180-1186.
 102. Gilbard JP, Farris RL, Santamaria J, 2nd. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol*. Apr 1978;96(4):677-681.
 103. Scheidt RE, Kale S, Heinz MG. Noise-induced hearing loss alters the temporal dynamics of auditory-nerve responses. *Hear Res*. Oct 1 2010;269(1-2):23-33.
 104. Smith DW, Gamble KR, Heil TA. A novel psychophysical method for estimating the time course of olfactory rapid adaptation in humans. *Chem Senses*. Oct 2010;35(8):717-725.
 105. Munger SD, Lane AP, Zhong H, et al. Central role of the CNGA4 channel subunit in Ca²⁺-calmodulin-dependent odor adaptation. *Science*. Dec 7 2001;294(5549):2172-2175.
 106. Camargo Pires-Neto R, Julia Lichtenfels A, Regina Soares S, Macchione M, Hilario Nascimento Saldiva P, Dolhnikoff M. Effects of Sao Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res*. Jul 2006;101(3):356-361.
 107. Souza MB, Saldiva PH, Pope CA, 3rd, Capelozzi VL. Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. *Chest*. May 1998;113(5):1312-1318.

Apêndices

Apêndice I. Publicação na revista *Cornea*

CLINICAL SCIENCE

Correlation Between Signs and Symptoms of Ocular Surface Dysfunction and Tear Osmolarity With Ambient Levels of Air Pollution in a Large Metropolitan Area

André A. M. Torricelli, MD,* Priscila Novaes, MD,* Monique Matsuda, PhD,* Alfêso Braga, MD, PhD,† Paulo H. N. Saldiva, MD, PhD,† Milton R. Alves, MD, PhD,* and Mário L. R. Monteiro, MD, PhD*

Purpose: To evaluate the effect of high levels of environmental air pollution on tear osmolarity and its possible correlation with clinical signs and symptoms.

Methods: This was a panel study involving 71 taxi drivers and traffic controllers from São Paulo, Brazil. Mean individual levels of 24-hour exposure to nitrogen dioxide (NO₂) and particulate matter smaller than 2.5 μm (PM_{2.5}) were assessed on 4 different occasions. On the first and third visits, subjects were submitted to clinical evaluations including the administration of the Ocular Surface Disease Index questionnaire, slit-lamp examination, estimation of tear breakup time (BUT), the Schirmer test, and vital staining of the cornea and conjunctiva. On the second and fourth visits, tear samples were collected for osmolarity assays. Statistical analysis was performed using generalized estimating equations.

Results: Although the taxi drivers and traffic controllers in our sample were exposed to high levels of NO₂ and PM_{2.5}, few symptoms were reported on the Ocular Surface Disease Index questionnaire. BUT values were reduced, whereas vital staining and Schirmer test mean results were within normal limits, despite considerable variability. A significant and negative correlation was found between PM_{2.5} levels and tear film osmolarity levels ($P < 0.05$). An increase of 10 μg/m³ in PM_{2.5} was associated with a 10.9 mOsm/kg decrease in tear osmolarity. There also was a negative correlation, although not statistically significant, between NO₂ and tear osmolarity.

Conclusions: Exposure to air pollution reduces tear film stability and influences tear film osmolarity. Combining clinical examination with the assessment of tear osmolarity may help understand ocular surface response to high levels of air pollution.

Key Words: ocular surface, tear film osmolarity, air pollution
(*Cornea* 2013;32:e11–e15)

Air pollution is a complex mixture of thousands of pollutants. This mixture may consist of solid and liquid particles suspended in the air, namely particulate matter (PM), and different types of gases such as ozone, nitrogen oxides, volatile organic carbons, and carbon monoxide.¹ Epidemiological studies published in the past 10 to 15 years have provided strong evidence that current levels of air pollution have a negative impact on public health in general and in particular on the ocular mucosa, which is constantly exposed to the external environment.² Indeed, individuals living in areas with high concentrations of pollutants frequently report ocular symptoms,^{3,4} and previous studies have detected tear film abnormalities and subclinical changes on the ocular surface of individuals living in cities with high levels of air pollution.^{3,5} Moreover, a recent study reported a significant positive association between exposure to air pollution and goblet cell hyperplasia in the human conjunctiva.⁶

The clinical tools most commonly used for grading ocular surface disease severity are based on symptoms and on clinical tests such as the tear film breakup time (BUT), vital staining of the cornea and conjunctiva, and the Schirmer test.⁷ Most of these methods are not specific for one subtype of disease and rely on subjective judgment,^{8–10} rendering symptoms alone unreliable for diagnosis and disease severity determination.¹¹

In recent years, assessment of tear film osmolarity levels has been established as an important indicator of ocular surface injury. An increase in tear osmolarity has been considered the single best marker of dry eye disease.¹² Furthermore, increased tear osmolarity has been observed in association with other common ocular surface problems, such as vitamin A deficiency and allergies,¹² and contact lens wear.^{13–15}

Although previous studies have demonstrated subclinical ocular surface abnormalities, as a result of air pollution, to our knowledge no previous study has investigated the influence of environment air pollution levels in tear osmolarity. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of environmental air pollution levels on tear osmolarity levels and its possible correlation with clinical signs and symptoms in individuals from a large metropolitan area with high levels of ambient air pollution.

Received for publication April 12, 2012; revision received May 2, 2012; accepted May 8, 2012.

From the *Department of Ophthalmology, Laboratory for Investigation in Ophthalmology (LIM-33), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil; and †Department of Pathology, Laboratory of Experimental Air Pollution, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil. Supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (306487/2011-0 and 555223/2006-0), Brasília, Brazil.

The authors state that they have no conflicts of interest to disclose. Reprints: André A. M. Torricelli, Department of Ophthalmology, University of São Paulo Medical School, Av. Vereador Jose Diniz, 3300, Conjunto 208, São Paulo, SP CEP 04604-006 (e-mail: andre_torri39@yahoo.com.br). Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

Cornea • Volume 32, Number 4, April 2013

www.corneajrnl.com | e11

MATERIALS AND METHODS

Study Population

We prospectively studied 71 healthy male volunteers working as taxi drivers or traffic controllers in São Paulo, Brazil, one of the largest cities in Latin America, with high levels of air pollution.¹⁶ The subjects were examined once a week for 4 weeks. On the first and third visits, a complete clinical ophthalmic examination was performed, whereas on the second and fourth visits, tear samples were collected for osmolarity assays. The reason for repeating the clinical evaluation and tear film osmolarity assays was to investigate the effect of possible variations in air pollution exposure at different moments.

To be included, volunteers were required to have lived in the study area for at least 5 years and to sign an informed consent form. The exclusion criteria were as follows: smoking, inability to comply with the schedule of visits of the study protocol, wearing contact lenses, ophthalmic surgery, and preexisting ophthalmic diseases.

Approval from the institutional review board/ethics committee was obtained for the study. The study followed the principles of the Declaration of Helsinki, and informed consent was obtained from all participants.

Air Pollution Exposure Assessment

Nitrogen dioxide (NO₂) and PM smaller than 2.5 μm (PM_{2.5}) were used as indicators of exposure to air pollution. We employed a NO₂ passive tubes monitoring system because it is simple and efficient and does not interfere with daily activities, thereby favoring compliance. The subjects carried a passive sampler containing a cellulose filter (Energetica, Rio de Janeiro, Brazil) impregnated with an absorbent solution of 2% triethanolamine, 0.05% *o*-methoxyphenol, and 0.025% sodium metabisulfite inside a small plastic tube with one of its extremities open to ambient air. The nitrite produced during sampling was determined colorimetrically by reacting the exposed absorbing reagent with sulfanilamide and 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid at a wavelength of 550 nm. Before the study, we evaluated the efficiency and sensitivity of this measuring system by placing the filters near an automatic chemiluminescence monitor of the São Paulo State Environmental Sanitation Technology Company.¹⁷ Our method was found to have an accuracy of 98.6% and a precision of 80%.⁶ The PM was measured with a portable gravimetric impactor with a flow rate of 1.8 L/min. Air was aspirated into the impactor by a pump, PM was retained by a filter, and the particles in suspension in the air were measured gravimetrically. The subjects were instructed to carry the samplers at all times during their daily activities and to place them by the bedside at night (24 h/d started at 8 AM). Mean individual levels of 24-hour exposure to NO₂ and PM_{2.5} were assessed on 4 different occasions, at each visit to the clinic.

Clinical Examination

All subjects were evaluated using the Ocular Surface Disease Index (OSDI) questionnaire,¹⁸ translated into

Portuguese, containing 12 questions for the assessment of the presence or absence of ocular dryness, irritation, heaviness, fatigue, and itching over the preceding 7 days. The test scale ranged from 0 to 100, with higher scores representing greater disability. All clinical tests were performed at the same facility, with similar conditions of temperature and humidity, in the morning period and by the same examiner.

Subjects were submitted to the Schirmer test without topical anesthesia.^{19,20} Standardized strips of filter paper (Ophthalmos, São Paulo, Brazil) were attached to the lower eyelid rim, at lateral third. The strips did not touch the cornea. The subjects were requested to remain with their eyelids closed for 5 minutes. Wetting of the strip of <10 mm in at least 1 eye was considered abnormal.²¹

BUT was measured after staining the tear film with fluorescein strips (Ophthalmos, São Paulo, Brazil) wetted with 0.9% sodium chloride and gently applied to the inferior conjunctival fornix.²¹ No preservative or anesthetic was applied. BUT was estimated by measuring the time elapsed from the last complete blink and the appearance of the first black spot in the fluorescein-stained tear film without touching the eyelid.^{20,22} Values <10 seconds were considered abnormal.²³

Vital staining of the cornea and conjunctiva was performed using both fluorescein-impregnated and lissamine green-impregnated strips (Ophthalmos, São Paulo, Brazil) wetted with 0.9% sodium chloride and gently applied to the inferior fornix. Initially, fluorescein was applied and the corneal staining pattern was graded, followed by grading of the conjunctival lissamine green staining pattern. The Van Bijsterveld system was used for the quantification of the impregnation patterns.^{19,24,25} Scores >4 were considered abnormal.

Osmolarity Assays

Tear samples were collected from the inferior tear meniscus at the lower lid near the lateral canthus of the right eye using 10-μL microcapillaries. Samples were subsequently frozen at -80°C. The Advanced Micro-Osmometer Model 3300 (Advanced Instruments, Norwood, MA) was used to analyze the samples. Because the equipment was designed to process 20-μL samples, tear was diluted with distilled water and instilled into the thermal chamber of the tear osmometer to determine the osmolarity level, based on the freezing point. The osmolarity of the samples was expressed in milliosmoles per kilogram of water (mOsm/kg). Osmolarity as a single test of tear physiology makes it possible to define and differentiate dry eye and "normal" subjects with a relatively high degree of accuracy (90%). A cutoff level of 316 mOsm/L yields a high sensitivity, specificity, and predictive accuracy.^{26,27}

Statistical Analysis

Quantitative variables were presented in terms of central tendency and dispersion. Normal distribution of the variables was verified using the Kolmogorov-Smirnov test. To estimate the effects of pollutants (PM_{2.5} and NO₂) in the outcomes throughout the study period, we adopted generalized estimating

TABLE 1. Mean $\pm$ SD of Levels of NO₂ and PM_{2.5} Measured at Study Visits 1 Through 4

	Mean $\pm$ SD			
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4
PM _{2.5} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	42.42 $\pm$ 24.04	40.49 $\pm$ 18.25	39.58 $\pm$ 19.1	33.8 $\pm$ 14.99
NO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	201.14 $\pm$ 43.26	179.75 $\pm$ 43.44	196.35 $\pm$ 48.97	187.5 $\pm$ 45.8

equations (GEEs) considering fixed effects for repeated measures. This method was proposed by Zeger and Liang²⁸ for analysis of longitudinal data or repeated measures where serial measurements of a specific variable need to be performed over a period of time. To assess the pattern of relationship between air pollutants and tear osmolarity, we adopted quartiles of PM_{2.5} and NO₂ instead of continuous variables in GEE pollutant-specific models. The level of significance was set at 5%.

RESULTS

The subjects were aged from 31 to 65 years (mean $\pm$ SD: 46.79 $\pm$ 9.7 years). Throughout the study period, the ambient temperature varied from 17.4 to 22.4°C, whereas humidity fluctuated between 52% and 76% (63.35% $\pm$ 6.15%). The mean NO₂ and PM_{2.5} levels at each visit are shown in Table 1. Air pollution exposure levels were very high throughout the study (mean PM_{2.5} level: 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). The weekly average NO₂ level was invariably above the upper limit (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) established by the World Health Organization Air Quality Guidelines.¹⁶

Table 2 summarizes the obtained OSDI scores, BUT values, and Schirmer I test results. The mean values of each parameter were similar in both evaluations. No significant differences were observed in OSDI scores, indicating that the subjects experienced few ocular symptoms during the study. The mean OSDI score was 9.2 $\pm$ 6.8 and 8.3 $\pm$ 11.9 in the first and third weeks, respectively. Mean BUT values were significantly lower than 10 seconds in both eyes (Table 2). The mean Schirmer test results, in contrast, were >10 mm for both eyes, although a large variability was observed.

Table 3 shows the scores from the fluorescein and lissamine green vital staining tests observed in the first and third visits. The corneal vital staining score with fluorescein was <4 in all but one (0.7%) examination (with a score of 5 on a scale from 0 to 9). The conjunctival vital staining score with

lissamine green was considered normal in 124 eyes (87.3%) in the first visit and in 120 eyes (84.5%) in the third visit.

The result of the osmolarity assay at the second and fourth visits was 298.56 $\pm$ 23.19 and 303.72 $\pm$ 23.52 mOsm/kg, respectively. A significant and negative correlation was found between PM_{2.5} levels and tear film osmolarity levels. The GEE analysis indicated that for each increase of 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in PM_{2.5}, tear osmolarity decreased by 10.9 mOsm/kg ($P < 0.05$), with a dose-response pattern (Fig. 1). Despite the lack of statistical significance in the correlation between NO₂ and tear osmolarity, GEE model using quartiles of NO₂ showed that the higher the pollutant level, the lower was the tear osmolarity (Fig. 2). No significant correlation was observed between OSDI, BUT, Schirmer test scores, or vital staining scores and PM_{2.5} and NO₂ levels.

DISCUSSION

Recently, there has been an increased interest in the understanding of the possible detrimental effects of pollution and environmental toxins.²⁹ The acute effects of exposure of the ocular surface to airborne toxins are well known, which include watering, burning, and redness of the eyes.⁵ However, the effects of chronic exposure to high levels of environmental pollution are still largely unknown.

Our subjects were exposed to elevated levels of PM_{2.5} and NO₂ during the entire study period because the observed air pollution levels were significantly above the World Health Organization Air Quality Guidelines published in 2006,¹⁶ according to which average PM_{2.5} levels should not exceed 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in 24 hours or 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in 1 year, and average NO₂ levels should not exceed 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in 24 hours or 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in 1 year. The levels observed during the study period may therefore be considered representative of chronic exposure to intense air pollution.

In the current study, individuals chronically exposed to traffic-derived pollution presented reduced BUT and tear modifications on tear osmolarity levels. Our findings of reduced BUT values are in agreement with studies by Gupta et al⁵ and Saxena et al³ who found similar levels of lacrimal film instability in subjects exposed to high levels of environment pollution in Delhi, India. Moreover, a recent study from our group involving 55 volunteers showed lacrimal film instability associated with exposure to air pollution.³⁰ All these findings are consistent with the hypothesis that chronic exposure to air pollution interferes with the ocular surface functional unit represented by the cornea and conjunctival epithelia, tear film, and the glycocalyx junction.

To our knowledge, this is the first study to address the issue of tear film osmolarity and ambient levels of air pollution. It has been suggested that tear hyperosmolarity is

TABLE 2. Mean $\pm$ SD of OSDI Scores, BUT Values, and Schirmer Test Results at the First and Third Study Visits

	Mean $\pm$ SD	
	Visit 1	Visit 3
OSDI score	9.18 $\pm$ 6.81	8.27 $\pm$ 11.92
BUT (s)		
OD	5.9 $\pm$ 3.4	5.2 $\pm$ 3.1
OS	5.6 $\pm$ 2.9	4.9 $\pm$ 3.0
Schirmer test (mm)		
OD	12.43 $\pm$ 8.9	11.53 $\pm$ 8.5
OS	13.27 $\pm$ 9.8	10.35 $\pm$ 8.6

TABLE 3. Frequency of Vital Staining Score at the First and Third Study Visits

	Vital Staining Score													
	Visit 1							Visit 3						
	0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	5	6
Fluorescein														
OD	54	12	3	2	0	0	0	52	13	5	1	0	0	0
OS	50	15	3	3	0	0	0	47	18	4	1	0	1	0
Lissamine green														
OD	23	12	10	16	8	1	1	24	18	7	13	6	2	3
OS	20	16	13	14	7	1	0	21	19	12	8	8	3	0

the primary cause of discomfort, ocular surface damage, and inflammation in patients with dry eye.^{22,31,32} In a meta-analysis by Tomlinson et al,²⁶ the cutoff of the intercept between the distribution curves of normal eyes and eyes with keratoconjunctivitis sicca was found to be 316 mOsm/L. In our study, average tear osmolarity levels were within normal limits but were clearly correlated with PM_{2.5} measurements of airborne pollutants; the greater the PM_{2.5} level, the lower the tear osmolarity (Fig. 1), suggesting the existence of an adaptive response of the ocular surface in individuals constantly exposed to airborne pollution. Interestingly, our data showed that even in a condition of chronic exposure to air pollution varying within a relatively small range (~10 µg/m³ PM_{2.5} and ~30 µg/m³ NO₂; Table 1), an ocular surface response in terms of modifications in tear film osmolarity could be documented.

The relatively low OSDI score and the lack of correlation between symptoms and air pollution levels in the current study differ from our previous study³⁰ in which we reported a dose-response pattern between OSDI scores and NO₂ exposure levels. However, it is important to consider that Novaes et al³⁰ recruited their volunteers among the staff of a general hospital in São Paulo, with relatively low NO₂ exposure levels (<40 µg/m³), whereas the current study was based on a homogeneous sample of taxi drivers and traffic controllers presumably adapted to high levels of air pollution exposure (NO₂ >175 µg/m³). In the presence of continuous or repeated stimulation, sensory receptors exhibit

a marked reduction in responsiveness. Perceptual adaptation, a fundamental property of all sensory systems, functions to attenuate neural and perceptual responses to sustained or redundant stimulation as a means of enhancing the detection of new transient stimuli.³³ This mechanism is commonly noted in the olfactory and auditory systems, in which adaptation is accomplished by shifting the receptor sensitivity function to higher stimulus concentrations, thereby increasing stimulus intensity saturation levels.^{34,35} Therefore, we believe that the relative absence of symptoms in our subjects is an indication of adaptation to chronic exposure to air pollution. Furthermore, our subjects presumably still have functional adaptive mechanisms when submitted to elevated levels of air pollution, as indicated by the Schirmer test results and vital staining scores within normal limits. In contrast, our clinical data (Table 1; Figs. 1, 2) show a substantial degree of variability in the response to similar levels of air pollution within our study group. Although the tear film osmolarity average was within the reference values,²⁶ some subjects had tear film osmolarity >316 mOsm/kg, suggesting that susceptibility to airborne toxic agents varied between individuals.

Although previous studies have detected subclinical ocular surface changes (such as goblet cell hyperplasia) in response to high levels of environmental air pollution,⁶ this is to our knowledge the first study to correlate tear osmolarity with air pollution levels. The negative and significant correlation between PM_{2.5} and tear osmolarity (Fig. 1) and the

FIGURE 1. Effects of PM_{2.5} exposure (quartiles) on tear osmolarity (milliosmole per kilogram of water). **FIGURE 2.** Effects of NO₂ exposure (quartiles) on tear osmolarity (milliosmole per kilogram of water).

observed dose–response pattern are quite remarkable, and the same pattern can be observed for NO₂ effect (Fig. 2); in fact, they may be the result of an adaptive mechanism of the eye triggered by an increase in the aqueous portion of the lacrimal film. Along with goblet cell hyperplasia, the mechanism appears to protect the ocular surface from environmental aggression, reducing ocular complaints. Dry eye signs and symptoms may occur if the adaptive mechanism fails as a result of chronic exposure to air pollution, increased tear osmolarity, and loss of goblet cells.

In conclusion, as evidenced by the observed reduction in BUT values and the significant association between air pollution levels and tear film osmolarity, the findings of the current study support the notion that populations exposed to elevated ambient levels of air pollution are at increased risk for chronic ocular surface abnormalities. Our findings also suggest that the combination of clinical examination and tear film osmolarity assessment may be a useful noninvasive approach to investigate ocular surface response to high levels of air pollution.

REFERENCES

- Perez L, Rapp R, Kunzli N. The year of the lung: outdoor air pollution and lung health. *Swiss Med Wkly*. 2010;140:w13129.
- Kunzli N, Medina S, Kaiser R, et al. Assessment of deaths attributable to air pollution: should we use risk estimates based on time series or on cohort studies? *Am J Epidemiol*. 2001;153:1050–1055.
- Saxena R, Srivastava S, Trivedi D, et al. Impact of environmental pollution on the eye. *Acta Ophthalmol Scand*. 2003;81:491–494.
- Versura P, Profazio V, Cellini M, et al. Eye discomfort and air pollution. *Ophthalmologica*. 1999;213:103–109.
- Gupta SK, Gupta V, Joshi S, et al. Subclinically dry eyes in urban Delhi: an impact of air pollution? *Ophthalmologica*. 2002;216:368–371.
- Novaes P, do Nascimento Saldiva PH, Kara-Jose N, et al. Ambient levels of air pollution induce goblet-cell hyperplasia in human conjunctival epithelium. *Environ Health Perspect*. 2007;115:1753–1756.
- Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea*. 1998;17:38–56.
- Lucca JA, Nunez JN, Farris RL. A comparison of diagnostic tests for keratoconjunctivitis sicca: lactoplate, Schirmer, and tear osmolarity. *CLAO J*. 1990;16:109–112.
- Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR, et al. A non-invasive instrument for clinical assessment of the pre-corneal tear film stability. *Curr Eye Res*. 1985;4:1–7.
- Caffery BE, Josephson JE. Corneal staining after sequential instillations of fluorescein over 30 days. *Optom Vis Sci*. 1991;68:467–469.
- Begley CG, Chalmers RL, Abetz L, et al. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:4753–4761.
- 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;5:75–92.
- Martin DK. Osmolality of the tear fluid in the contralateral eye during monocular contact lens wear. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1987;65:551–555.
- Farris RL. Tear analysis in contact lens wearers. *CLAO J*. 1986;12:106–111.
- Iskeleli G, Karakoc Y, Aydin O, et al. Comparison of tear-film osmolarity in different types of contact lenses. *CLAO J*. 2002;28:174–176.
- WHO's global air-quality guidelines. *Lancet*. 2006;368:1302.
- CETESB. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo. 2006. Available at: http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/ar_geral.asp. Accessed July 6, 2007.
- Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, et al. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol*. 2000;118:615–621.
- van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol*. 1969;82:10–14.
- Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *Ocul Surf*. 2007;5:108–152.
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:554–558.
- Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J*. 1995;21:221–232.
- Lemp MA, Hamill JR Jr. Factors affecting tear film breakup in normal eyes. *Arch Ophthalmol*. 1973;91:103–105.
- Toda I, Tsubota K. Practical double vital staining for ocular surface evaluation. *Cornea*. 1993;12:366–367.
- Yoon KC, Im SK, Kim HG, et al. Usefulness of double vital staining with 1% fluorescein and 1% lissamine green in patients with dry eye syndrome. *Cornea*. 2011;30:972–976.
- Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, et al. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:4309–4315.
- Suzuki M, Massingale ML, Ye F, et al. Tear osmolarity as a biomarker for dry eye disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:4557–4561.
- Zeger SL, Liang KY. Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics*. 1986;42:121–130.
- Norn M. Pollution keratoconjunctivitis. A review. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1992;70:269–273.
- Novaes P, Saldiva PH, Matsuda M, et al. The effects of chronic exposure to traffic derived air pollution on the ocular surface. *Environ Res*. 2010;110:372–374.
- Gilbard JP, Farris RL, Santamaria J II. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol*. 1978;96:677–681.
- Gilbard JP, Rossi SR, Heyda KG. Tear film and ocular surface changes after closure of the meibomian gland orifices in the rabbit. *Ophthalmology*. 1989;96:1180–1186.
- Smith DW, Gamble KR, Heil TA. A novel psychophysical method for estimating the time course of olfactory rapid adaptation in humans. *Chem Senses*. 2010;35:717–725.
- Munger SD, Lane AP, Zhong H, et al. Central role of the CNGA4 channel subunit in Ca²⁺-calmodulin-dependent odor adaptation. *Science*. 2001;294:2172–2175.
- Scheidt RE, Kale S, Heinz MG. Noise-induced hearing loss alters the temporal dynamics of auditory-nerve responses. *Hear Res*. 2010;269:23–33.

Apêndice II. Publicação na revista Arquivos Brasileiros de Oftalmologia

ARTIGO DE REVISÃO | REVIEW ARTICLE

Ocular surface adverse effects of ambient levels of air pollution

Efeitos adversos na superfície ocular relacionados à poluição ambiental

ANDRÉ AUGUSTO MIRANDA TORRICELLI¹, PRISCILA NOVAES¹, MONIQUE MATSUDA¹, MILTON RUIZ ALVES¹, MÁRIO LUIZ RIBEIRO MONTEIRO¹

ABSTRACT

It is widely recognized today that outdoor air pollution can affect human health. Various chemical components that are present in ambient pollution may have an irritant effect on the mucous membranes of the body, particularly those of the respiratory tract. Much less attention has been focused on the adverse effect on the ocular surface, despite the fact that this structure is even more exposed to air pollution than the respiratory mucosa since only a very thin tear film separates the corneal and conjunctival epithelia from the air pollutants. So far, clinical data are the more widespread tools used by ophthalmologists for assessing possible aggression to the ocular surface; however, clinical findings alone appears not to correlate properly with the complaints presented by the patients pointing out the need for further clinical and laboratory studies on the subject. The purpose of this study is to review signs and symptoms associated with chronic long-term exposure to environmental air pollutants on the ocular structures currently defined as the ocular surface and to review clinical and laboratory tests used to investigate the adverse effects of air pollutants on such structures. We also review previous studies that investigated the adverse effects of air pollution on the ocular surface and discuss the need for further investigation on the subject.

Keywords: Air pollutants/adverse effects; Environmental exposure; Eye manifestations; Cornea; Conjunctiva; Irritants/toxicity; Air pollution; Climate; Fluorescent dyes/diagnostic use

RESUMO

Sabe-se hoje que a poluição ambiental pode afetar a saúde humana. Vários componentes químicos presentes na poluição atmosférica podem acarretar uma irritação nas mucosas, particularmente no trato respiratório. Pouca ênfase tem sido dada à superfície ocular, embora esta estrutura seja até mais exposta à poluição ambiental do que o trato respiratório visto que apenas uma fina camada de filme lacrimal separa a córnea e a conjuntiva dos poluentes presentes no ar. Até o momento, a avaliação clínica é o método mais utilizado pelos oftalmologistas para se detectar uma possível agressão à superfície ocular; entretanto esta avaliação apenas não parece correlacionar-se com as queixas e sinais apresentados pelos pacientes demonstrando a necessidade de mais estudos clínicos e laboratoriais sobre o assunto. O objetivo deste estudo é revisar os sinais e sintomas associados à exposição crônica aos poluentes ambientais no ar nas estruturas oculares definidas atualmente como superfície ocular e revisar os testes clínicos e laboratoriais usados para investigar os efeitos adversos dos poluentes em tais estruturas. Também revisamos estudos prévios que analisaram os efeitos adversos da poluição do ar na superfície ocular e discutimos a necessidade de mais estudos sobre o assunto.

Descritores: Poluentes do ar/efeitos adversos; Exposição ambiental; Manifestações oculares; Córnea; Conjuntiva; Irritantes/toxicidade; Poluição do ar; Clima; Corantes fluorescentes/uso diagnóstico

INTRODUCTION

Air pollution is a complex mixture of solid and liquid particles suspended in the air (the so called particulate matter) that vary in size, composition and origin, and different types of gases such as ozone (O₃), nitrogen oxides (NO_x), volatile organic carbons, and carbon monoxide (CO)^(1,2). In the recent years there has been considerable interest on the long and short-term effects of exposure to air pollution on human health. The growing industrialization and the progressive increase in the number of motor vehicles in large urban centers are the main causes of atmospheric pollution.

Previous studies have indicated that the short-time increase in pollutants levels, particularly of particulate material, have generally increased the mortality rate both in the USA^(2,3) and in Europe⁽⁴⁾. Two prospective cohort studies have also reported that the mortality risk was 26% greater for persons living in cities with elevated levels of air pollution^(2,5). An important increase on the prevalence of asthma and other respiratory symptoms has been attributed to such environmental abnormalities^(6,7).

The adverse effects of particulate matter and other environmental pollutants are therefore well known and their effects on the respiratory and circulatory systems have generally been stressed^(8,9).

However, only a few studies have systematically approached the effects of air pollution on the ocular system⁽¹⁰⁻¹³⁾. The purpose of this study is to review signs and symptoms associated to chronic long-term exposure to environmental air pollutants on the ocular structures currently defined as the ocular surface and to review clinical and laboratory tests used to investigate the adverse effects of air pollutants on such structures. We also review previous studies that investigated the adverse effects of air pollution on the ocular surface and discuss the need for further investigation on the subject.

AIR POLLUTION

Air pollution is the contamination of the indoor or outdoor environment by any chemical, physical or biological agent that modifies the natural characteristics of the atmosphere. Household combustion devices, motor vehicles, industrial facilities and forest fires are common sources of air pollution. Pollutants of major public health concern include particulate matter (PM), CO, O₃, NO_x and sulfur dioxide according to the World Health Organization (WHO)⁽¹⁴⁾.

The WHO Air Quality Guidelines (AQG) are an international reference on the adverse effects of exposure to air pollutants on human health. WHO summarized the scientific knowledge on health

Submitted for publication: August 2, 2011

Accepted for publication: October 16, 2011

¹ Physician, Division of Ophthalmology and the Laboratory for Investigation in Ophthalmology (LIM-33), Universidade de São Paulo - USP - São Paulo (SP), Brazil.

Funding: No specific financial support was available for this study.

Disclosure of potential conflicts of interest: A.A.M. Torricelli, None; P. Novaes, None; M. Matsuda, None; M.R. Alves, None; M.L.R. Monteiro, None.

Correspondence address: André A. M. Torricelli, Av. Vereador Jose Diniz, 3300, conjunto 208 - São Paulo - SP - 04604-006 - Brazil - E-mail: andre_torricelli@yahoo.com.br

hazards related to air pollutants, providing risk estimates for exposure to air pollutants and recommending air quality guidelines. The latest global updated version of the WHO AQG was published in 2006^(14,15). In this guideline, the goals for controlling air pollution in order to protect human health are: PM less than 10 μm in aerodynamic diameter (PM_{10}) levels lower than 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in 24 hours and lower than 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in 1 year averaging time; NO_2 lower than 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in 24 hours and lower than 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in 1 year averaging time and SO_2 level lower than 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in 24 hours and lower than 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in 10 minutes averaging time.

The WHO has also summarized the annual average concentrations of PM_{10} , NO_2 and SO_2 ⁽¹⁴⁾ in different areas of the world (Table 1). In most European and North American cities, the PM_{10} annual average concentration levels are generally lower than 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. The highest levels of PM_{10} are found in Asia, Africa and Latin America. In Asia, PM is still the major and most important air pollutant, though in some large cities in China, a slight decrease in PM_{10} levels has been noted during the economic development that took place over the last few decades⁽¹⁶⁾. SO_2 levels have been decreasing in most parts of the world, particularly in the United States and in Europe. In some Asian cities, (e.g., Bangkok, New Delhi, and Jakarta), the ambient SO_2 levels are low due to the low sulfur content of the fuel used there. On the other hand, in Chinese cities, although SO_2 level has declined quite substantially, it is still relatively high. In larger cities in Latin America and Africa, there has also been a moderate decline in SO_2 levels⁽¹⁴⁾. On the other hand, such a tendency has not been observed for traffic-related air pollutants, i.e., NO_2 and O_3 . On the contrary, in developing countries, levels of NO_2 and O_3 tend to increase due to the increased number of motor vehicles. Megacities where annual average NO_2 exceeded the WHO air quality criteria of 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ were Beijing, Shanghai, Tokyo, Osaka, New York, Los Angeles, Sao Paulo and Mexico, while in New Delhi, Mumbai and Calcutta the annual average NO_2 concentrations were lower than 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Table 1).

Many time-series studies have explored the acute health effects associated with short-term exposure to airborne particulates⁽¹⁷⁾. In a meta-analysis, an increase of 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ PM_{10} was associated with an increase in all-cause mortality of 0.46% in the United States (30 city studies), 0.62% in Europe (21 city studies), and 0.49% in Asia (4 city studies)⁽¹⁵⁾. The European APHEA-1 (Air Pollution and Health, a European Approach) study found a 1.3% increase in daily deaths (95% CI 0.9-1.8) per 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ increase of NO_2 ⁽¹⁸⁾. The effect remained statistically significant after adjusting for black smoke. Combined evidence from time-series studies show positive associations between daily mortality and ozone levels, independent of the effects of particulate matter. And finally, a meta-analysis on 95 United States urban communities studies showed that a 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ increase in ozone was associated with a 0.52% increase in total mortality and a 0.64% increase in cardiovascular and respiratory mortality⁽¹⁹⁾.

EFFECTS OF AIR POLLUTION ON THE OCULAR SURFACE

The ocular surface is composed of the surface and glandular epithelia of the cornea, conjunctiva, lacrimal gland, accessory lacri-

Table 1. Ranges of annual average concentrations of particulate matter less than 10 μm in aerodynamic diameter (PM_{10}), nitrogen dioxide (NO_2), sulfur dioxide (SO_2) in different areas of the world (in $\mu\text{g}/\text{m}^3$) based on the World Health Organization⁽¹⁴⁾

Region	Annual average concentrations		
	PM_{10}	Nitrogen dioxide	Sulfur dioxide
Africa	40-150	35-65	10-100
Asia	35-200	20-75	6-65
Canada/United States	20-60	35-70	9-35
Europe	20-70	18-57	8-36
Latin America	30-129	30-82	40-70

mal glands and meibomian gland, the eyelashes with the glands of Moll and Zeiss and the nasolacrimal duct. Each of these structures is in constant contact with the air pollution and can be affected leading to a large variety of clinical signs and symptoms^(20,21). It is widely recognized today that outdoor air pollution can affect human health. Various chemical components present in ambient pollution may have an irritant effect on the mucous membranes, particularly those of the respiratory tract. Less attention has been focused on the ocular surface, although this structure is even more exposed to air pollution than the respiratory mucosa since only a very thin tear film separates the corneal and conjunctival epithelia from the air pollutants⁽²²⁻²⁴⁾.

Dysfunction of any component of the ocular surface system can lead to ocular symptoms through two interrelated mechanisms of abnormality: the hyper-osmolarity and the instability of the lacrimal film⁽²⁵⁾. Lacrimal hyper-osmolarity may cause lesions on the epithelial surface by activating a series of inflammatory events on the ocular surface, which lead to the production of inflammatory mediators in the lacrimal film. Subsequent damage to the epithelium induces cell death due to apoptosis, loss of goblets cells and disorder of mucin expression, resulting in instability of the lacrimal film. This instability, on its hand, exacerbates the hyper-osmolarity of the eye surface forming a vicious cycle. This sequence of events is represented in figure 1⁽²⁶⁾.

CLINICAL EVALUATION OF THE OCULAR SURFACE: SIGNS AND SYMPTOMS

Traditionally, a combination of diagnostic tests has been used for assessing the degree of ocular symptoms and signs associated with ambient air pollution (Table 2). Along with the clinical history, the use of validated questionnaires for ocular symptoms is very helpful^(27,28). There are several questionnaires available for grading symptoms severity, impact on daily activities and in quality of life. Such tools vary in size, reason for application, way of delivering (self-applied or through an interviewer), and extent of validation. The most commonly used questionnaires are: Ocular Surface Disease Index (OSDI), Canadian Dry Eye Epidemiology Study (CANDEES), Impact of Dry Eye on Everyday Life (IDEEL), National Eye Institute-Visual Function Questionnaire (NEI-VFQ) e Women's Health Study Questionnaire⁽²⁶⁾.

On examination, elements used for ocular surface evaluation include: visual acuity assessment, external eye examination and slit lamp biomicroscopy. Additionally, diagnostic tests for evaluating instability of the lacrimal film, lesions of the ocular surface, and the flow of the watery tear portion are also carried out (Table 2). The instability of the lacrimal film is evaluated through the duration of tear break-up test (TBUT), a widespread method that involves the instillation of fluorescein dye in the eye and measuring the time

Figure 1. Inflammatory cycle of the ocular surface, modified from Dry Eye Work Shop.

elapsed from the blinking until the tear film breaks up^(26,29). Values below 10 seconds are considered abnormal⁽³⁰⁾. More recently, values of less than five seconds have been considered abnormal by some authors who suggest lower cut points when a smaller volume of fluorescein is instilled (5 micro-litres of fluorescein at 2%)⁽³¹⁾. Choosing lower values decreases the test sensibility and increases its specificity. Others tests to evaluate the tear film stability are: the interferometry, that measures the central precorneal tear film thickness noninvasively using an interference thin-film thickness measurement device⁽³²⁻³⁴⁾ and the meibomimetry, that uses a new laser meibometer to measure meibomian lipid levels on the lid margin by blotting meibomian gland oil into a piece of plastic and monitoring its transparency in order to calculate the amount of oil and its rate of delivery⁽³⁵⁾. These tools are not commonly used in daily routine.

The lesions on the ocular surface are normally evaluated through staining with vital dyes such as: rose Bengal (Figure 2), green lissamine, and fluorescein. Abnormal patterns of cornea or conjunctiva

staining are observed at slit lamp examination. The fluorescein dye is well tolerated. The results of such test may be variable. Testing with rose Bengal dye reveals more consistent results although it causes greater ocular discomfort when compared to green lissamine, which presents a staining pattern similar to rose Bengal and it is as well tolerated as fluorescein^(26,36,37). Three systems for the quantification of the impregnation patterns are currently in use: the Van Bijsterveld system⁽³⁸⁾, the Oxford system⁽³⁹⁾ and the system developed by the CLEK study⁽⁴⁰⁾. The Oxford and CLEK studies use a more detailed quantification than the van Bijsterveld system, allowing for a more accurate detection of ocular surface abnormalities. No previous study has defined which is the best quantification system⁽²⁶⁾.

As far as the aqueous portion is concerned, it is normally assessed by the Schirmer's test⁽²⁶⁾. According to this test, when performed without topical anesthesia, less than 10 mm after 5 minutes in at least one eye is a criterion for diagnosing dry eye⁽⁴¹⁾. Many clinicians regard the Schirmer test as unduly invasive and of little value for mild to moderate dry eyes. Other less invasive methods to assess the adequacy of tear production have been developed. The phenol red thread test is one such test and is commercially available. A cotton thread impregnated with phenol red dye is used. Phenol red is pH sensitive and changes from yellow to red when wetted by tears. The crimped end of a 70 mm long thread is placed in the lower conjunctival fornix. After 15 seconds, the length of the color change on the thread, indicating the length in millimeters of the thread wetted by the tears. Normal measurements are between 9 mm and 20 mm⁽⁴²⁾. Patients with dry eyes have wetting values of less than 9 mm.

The tear ferning test reflects the tear composition and offers another way to assess tear film integrity and quality. When mucus is permitted to air dry on a microscope slide, a specific crystallization and arborisation (fern) occurs, which has been termed "ferning". Rolando⁽⁴³⁾ identified differences among tear ferning patterns and described a classification system that tear ferning became a useful diagnostic tool. The author described four qualitative categories, which depended on the presence, the size and density of the ferns observed (Figure 3). Rolando found that normal tear films often demonstrated a Type I or II pattern (with lots of ferning), whereas patients with keratoconjunctivitis sicca (KCS) had Type III and IV tear ferning patterns (in which there was scarce or absent ferning). Although Rolando's classification system^(43,44) is subjective, it remains simple, quick, repeatable and has a short learning curve.

An increase in tear osmolarity is a hallmark of dry eye disease and is thought to be the central mechanism in the pathogenesis of ocular surface damage, as noted in the Dry Eye Workshop Report (DEWS)⁽²⁵⁾. Tear osmolarity has been reported to be the single best marker for dry eye disease⁽²⁵⁾. Successful measurement of tear osmolarity was thought to necessitate collection of a large amount of tears. With technological advances in its measurement, tear osmolarity is now more feasible to use in assessing dry eye. Others common extrinsic problems such as vitamin A deficiency and allergies⁽²⁵⁾ or contact lens wear have also shown increased tear osmolarity⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾.

Finally, impression cytology is a non-invasive laboratory method for assessing the ocular surface, which includes the epithelium of the conjunctiva and the cornea⁽⁴⁸⁾. The filter paper, when applied on the corneo-conjunctiva surface, removes samples that contain from one to three layers of epithelial cells and preserves the morphological characteristics of the collected cells⁽⁴⁹⁾.

STUDIES INVESTIGATING OCULAR ADVERSE EFFECTS OF AIR POLLUTION

In recent years, patients seeking ophthalmic examination with subjective symptoms of eye irritation such as foreign body sensation, burning, itching, photophobia and whimpering has become a common occurrence. However, most often clinical examination does not reveal a corresponding ocular abnormality⁽¹⁰⁾.

Table 2. Diagnostic procedures for assessing the ocular surface

1. Questionnaires
2. Visual acuity assessment
3. External eye examination
2. Slit lamp biomicroscopy
 - 3.1. Eyelids
 - 3.2. Cilia
 - 3.3. Meibomian glands
 - 3.4. Conjunctiva
 - 3.5. Cornea
 - 3.6. Menisco tear
 - 3.7. Lacrimal Film
- 3 Tests to evaluate tear film stability
 - Tear break-up test (TBUT)
 - Interferometry
 - Meibomimetry
4. Vital Dyes
 - Fluorescein
 - Rose Bengal
 - Green lissamine
5. Quantitative diagnostic test of tear
 - Schirmer test
 - Red Phenol Test
7. Qualitative diagnostic test of tear
 - Ferning test
 - Osmolarity
8. Impression cytology

Figure 2. Ocular surface lesion staining with rose Bengal.

OCULAR SURFACE ADVERSE EFFECTS OF AMBIENT LEVELS OF AIR POLLUTION

Figure 3. Tear crystallization test in patients with dry eye (left) and in normal volunteers (right). The greater the number of branches during crystallization (ferning test) and more leafy, the better the quality of the tears (courtesy of Dr. Richard Hida and Dr. Ruth Santo).

Several studies have tried to relate these subjective symptoms to a possible subclinical ocular inflammation and to a prolonged exposition to air pollution^(10,13,50). Saxena et al.⁽¹³⁾ compared two groups of 500 healthy volunteers living in New Delhi and found greater instability of the lacrimal film, as evaluated both by the lacrimal film time of rupture test and the Schirmer's test, in individuals showing a daily routine of air pollution exposition. No significant difference was found, however, when Rose Bengal staining was evaluated⁽¹³⁾. According to this study, climatic conditions appear to have a very significant effect on the ocular surface. High levels of subclinical ocular surface abnormalities were found in persons traveling in highly polluted areas. These high levels may represent a reason for concern if they do reflect the ocular status of the general populations living in large metropolis such as Delhi.

On the other hand, Versura et al.⁽¹⁰⁾ through the analysis of 100 individuals exposed to different levels of environmental pollution, did not find statistically significant difference in the lacrimal film rupture tests and the Schirmer's test in different groups of individuals. On the contrary and in disagreement with the previously mentioned study, the results of the tests were not significantly related to high levels of pollution. However, in this study, the results of impression cytology studies from the ocular surface documents for the first time showed the occurrence of inflammation and indicated that it may be greater in individuals who are more exposed to the pollution. This finding is quite remarkable in that it shows the importance of cytological analysis in those cases where the clinical observation does not lead to a diagnosis, in addition it suggests that one should not rely solely on clinical signs only, at least in cases of questionable etiology.

It is known from the literature that direct exposition of the ocular surface to various irritant substances causes neurogenic conjunctive vasodilatation and immediate whimpering⁽⁵¹⁾. Chemical substances may solubilize in lacrimal film and, possibly, sensitize specific lymphocytes subpopulations, as it was already shown with the SO₂ in the bronchial mucous membrane, producing a chronic inflammation after a prolonged exposition. The inflammation seems to influence the epithelial differentiation and the density of the goblets cells through an yet unknown mechanism⁽⁵²⁾.

According to the last global definition dry eye is a multifactorial disease of tears and ocular surface that results in symptoms of discomfort, visual disturbance, and tear film instability with potential damage to the ocular surface. It is accompanied by increased osmolality of the tear film and inflammation of the ocular surface⁽²⁵⁾. Various factors may work independently or interact with each other, as a consequence, complementary diagnostic test are usually performed, to evaluate beyond the clinical picture.

Hyperplasia of the goblets cells in response to increased levels of air pollution levels has already been described in literature. Novaes et al.⁽¹²⁾ evaluated the effects of the atmospheric pollution on the ocular surface, by comparing individuals exposed to different levels of environmental pollution. Twenty-nine volunteers were recruited from two distinct places: São Paulo, the capital and most industrialized city in the State São Paulo and Divinolândia, a small town from the São Paulo State countryside where half of the population lives in the rural area. NO₂ was used as an indicator of exposition to environmental pollution. Individual measurement of exposition to the different levels of NO₂ was obtained during seven days. The study showed that the subjects living in the city of São Paulo were exposed to significantly greater doses of NO₂ (mean 32.47 µg/m³, SD 9.83) than those from Divinolândia (mean 19.33 µg/m³, SD 5.24) and the amount of goblets cells showed an increase proportional to the NO₂ exposition with a dose-response pattern⁽¹¹⁾. In this study a positive and significant association between exposure to air pollution and goblet cell hyperplasia in human conjunctiva was observed (Figure 4); the combination of simple measurements of exposure and impression cytology was shown to be an effective and non-invasive approach to characterize human response to ambient levels of air pollution.

In another study, the same group evaluated 55 healthy volunteers recruited among the staff of the General Clinics Hospital of the University of São Paulo Medical School. The purpose of this study was to evaluate the effects of exposure to air pollution produced by traffic sources on the ocular surface, by comparing subjective ocular complains and results of routine clinical tests with individual measures of exposure to air pollution and also evaluate the importance of these measures as potential bioindicators of air pollution. This was the first study that has associated subjective measurements of ocular symptoms and disease specific quality of life and clinical assessment to individual measures of exposure to ambient air pollution. The clinical questionnaires were computed across quartiles of NO₂ exposure into four quartiles (Q1: 9.9-20.0 µg/m³; Q2: 20.1-26.0 µg/m³; Q3: 26.1-35.0 µg/m³; Q4: >35 µg/m³), a clear dose-response pattern was detected; besides a significant correlation between NO₂ quartiles and ocular irritation was observed⁽¹²⁾.

All these results serve as a basis for the hypothesis that the exposition to air pollution induces alterations on the ocular surface secondary to an environmental aggression. However, although many individuals have relevant clinical symptoms due to air pollution, it must be stressed that some people cohabit adequately with such pollution, presenting few symptoms or even none before such very same aggression. Therefore it is possible that these individuals have adaptation mechanisms that sufficed for defense or even for the

Figure 4. Impression cytology samples showing cellular hyperplasia response to air pollution.

functional recovery when submitted to elevated levels of environmental pollution.

So far, clinical data are the more widespread tools used by ophthalmologists for assessing a possible aggression to the ocular surface; however, this evaluation alone seems not to correlate with the complaints and signs presented by the patients. Therefore, more objective data, such as the evaluation of the goblets cells or other objective inflammation measurements for the evaluation of the ocular surface seem necessary.

The role and the exact mechanism through which the environmental pollution contributes to the several ocular complaints seem yet to be a large field for study and research.

FINAL CONSIDERATIONS

In recent years, a dramatic increase in atmospheric pollution in large cities throughout the world has led to an increased concern regarding its adverse effects on health. As the eye is constantly exposed to the external environment individuals living in areas with high concentrations of pollutants frequently have ocular complaints related to tear film abnormalities and ocular surface pathology with symptoms such as watering, burning and redness of the eyes. However, the ocular mechanisms involved in chronic long-term exposure to a high degree of environmental pollution are still largely unclear.

As pointed out in this review while many studies have been performed investigating air pollution adverse effects towards the circulatory and respiratory system, similar studies directed to understanding the effect on the ocular surface are very scarce. The marked advances in understanding the physiology and in the methods of assessing the ocular surface in recent years are therefore in striking contrast with the lack of studies investigating air pollution effect on ocular surface both of healthy subjects as well as diseased patients. We hope that in the near future studies can be performed to clarify such issues, to better understand the clinical and laboratorial abnormalities of the ocular surface, the relationship between ocular and systemic effects as well as possible mechanism of adaptations involved in the important subject of adverse effects of air pollution in the ocular surface.

REFERENCES

- Perez L, Rapp R, Kunzli N. The Year of the Lung: outdoor air pollution and lung health. *Swiss Med Wkly*. 2010;140:w13129.
- Dockery DW, Pope CA 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med*. 1993;329(24):1753-9. Comment in: *N Engl J Med*. 1993;329(24):1807-8. *N Engl J Med*. 2004;350(2):198-9. *N Engl J Med*. 1994;330(17):1237-8.
- Pope CA 3rd, Schwartz J, Ransom MR. Daily mortality and PM10 pollution in Utah Valley. *Arch Environ Health*. 1992;47(3):211-7.
- Katsouyanni K, Touloumi G, Spix C, Schwartz J, Balducci F, Medina S, et al. Short-term effects of ambient sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities: results from time series data from the APHEA project. *Air Pollution and Health: a European Approach*. BMJ. 1997;314(7095):1658-63. Comment in: *BMJ*. 1998;316(149):1982.
- Pope CA 3rd, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DM, Evans JS, Speizer FE, et al. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(3 Pt 1):669-74.
- Bucchieri F, Puddicombe SM, Lordan JL, Richter A, Buchanan D, Wilson SJ, et al. Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27(2):179-85.
- Leitte AM, Schlink U, Herbarth O, Wiedensohler A, Pan XC, Hu M, et al. Size segregated particle number concentrations and respiratory emergency room visits in Beijing, China. *Environ Health Perspect*. 2011;119(4):508-13.
- Barnett AG, Williams GM, Schwartz J, Best TL, Neller AH, Petroeschevsky AL, et al. The effects of air pollution on hospitalizations for cardiovascular disease in elderly people in Australian and New Zealand cities. *Environ Health Perspect*. 2006;114(7):1018-23.
- Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002;287(9):1132-41. Comment in: *JAMA*. 2002;288(7):830; author reply 830.
- Versura P, Profazio V, Cellini M, Torreggiani A, Caramazza R. Eye discomfort and air pollution. *Ophthalmologica*. 1999;213(2):103-9.
- Novaes P, do Nascimento Saldiva PH, Kara-Jose N, Macchione M, Matsuda M, Racca L, et al. Ambient levels of air pollution induce goblet-cell hyperplasia in human conjunctival epithelium. *Environ Health Perspect*. 2007;115(12):1753-6.
- Novaes P, Saldiva PH, Matsuda M, Macchione M, Rangel MP, Kara-Jose N, et al. The effects of chronic exposure to traffic derived air pollution on the ocular surface. *Environ Res*. 2010;110(4):372-4.
- Saxena R, Srivastava S, Trivedi D, Anand E, Joshi S, Gupta SK. Impact of environmental pollution on the eye. *Acta Ophthalmol Scand*. 2003;81(5):491-4.
- WHO's global air-quality guidelines. *Lancet*. 2006;368(9544):1302.
- Chen B, Kan H. Air pollution and population health: a global challenge. *Environ Health Perspect*. 2008;116(2):94-101.
- Hao J, Wang L. Improving urban air quality in China: Beijing case study. *J Air Waste Manag Assoc*. 2005;55(9):298-305.
- Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet*. 2002;360(9341):1233-42.
- Touloumi G, Katsouyanni K, Zmirou D, Schwartz J, Spix C, de Leon AP, et al. Short-term effects of ambient oxidant exposure on mortality: a combined analysis within the APHEA project. *Air Pollution and Health: a European Approach*. Am J Epidemiol. 1997;146(2):177-85.
- Bell ML, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, Dominici F. Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987-2000. *JAMA*. 2004;292(19):2372-8.
- Gipson IK. The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(10):4390-4391-8.
- Argueso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, Keutmann HT, Dana MR, Gipson IK. Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjogren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(4):1004-11.
- Altshuler AP. Eye irritation as an effect of photochemical air pollution. *J Air Pollut Control Assoc*. 1977;27(11):1125-6.
- Klopper J. Effects of environmental air pollution on the eye. *J Am Optom Assoc*. 1989;60(10):773-8.
- Okawada N, Mizoguchi I, Ishiguro T. Effects of photochemical air pollution on the human eye: concerning eye irritation, tear lysozyme and tear pH. *Nagoya J Med Sci*. 1979;41(1-4):9-20.
- 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;5(2):75-92.
- Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *Ocul Surf*. 2007;5(2):108-52.
- Perry HD. Dry eye disease: pathophysiology, classification, and diagnosis. *Am J Manag Care*. 2008;14(3 Suppl):S79-87.
- The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). *Ocul Surf*. 2007;5(2):93-107.
- Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J*. 1995;21(4):221-32.
- Lemp MA, Hamill JR Jr. Factors affecting tear film break-up in normal eyes. *Arch Ophthalmol*. 1973;91(2):103-5.
- Abelson MB, Ousler GW 3rd, Nally LA, Welch D, Krenzer K. Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations. *Adv Exp Med Biol*. 2002;506(Pt B):1121-5.
- Nom MS. Semiquantitative interference study of fatty layer of precorneal film. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1979;57(5):766-74.
- Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR, Gilbert DJ. A non-invasive instrument for clinical assessment of the pre-corneal tear film stability. *Curr Eye Res*. 1985;4(1):1-7.
- Goto E, Dogru M, Kojima T, Tsubota K. Computer-synthesis of an interference color chart of human tear lipid layer, by a colorimetric approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(11):4693-7.
- Komuro A, Yokoi N, Kinoshita S, Tiffany JM, Bron AJ, Suzuki T. Assessment of meibomian gland function by a newly developed laser meibometer. *Adv Exp Med Biol*. 2002;506(Pt A):517-20.
- Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:607-34.
- Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol*. 2006;16(9):467-76.
- van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol*. 1969;82(1):10-4.
- Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea*. 2003;22(7):640-50.
- Nichols KK, Mitchell GL, Zadnik K. The repeatability of clinical measurements of dry eye. *Cornea*. 2004;23(3):272-85.
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RL, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH. European Study Group on Classifica-

OCULAR SURFACE ADVERSE EFFECTS OF AMBIENT LEVELS OF AIR POLLUTION

- tion Criteria for Sjögren's Syndrome et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(6):554-8.
42. Hida RY, Nishiwaki-Dantas MC, Hida MM, Tsubota K. [Quantitative tear study using the red phenol test in the Brazilian population]. *Arq Bras Oftalmol*. 2005;68(4):433-7. Portuguese.
43. Rolando M, Baldi F, Calabria G. Tear mucus crystallization in children with cystic fibrosis. *Ophthalmologica*. 1988;197(4):202-6.
44. Felberg S, Cordeiro H, Sato EH, Martini Filho D, Nishiwaki-Dantas MC, Endo RM, et al. [Reproducibility of the classification of ocular ferning patterns in Sjögren's syndrome patients]. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(2):228-33. Portuguese.
45. Martin DK. Osmolality of the tear fluid in the contralateral eye during monocular contact lens wear. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1987;65(5):551-5.
46. Farris RL. Tear analysis in contact lens wearers. *CLAO J*. 1986;12(2):106-11.
47. Iskeleli G, Karakoc Y, Aydin O, Yetik H, Uslu H, Kizilkaya M. Comparison of tear-film osmolarity in different types of contact lenses. *CLAO J*. 2002;28(4):174-6.
48. Martinez AJ, Mills MB, Jaceldo KB, Tio Fo, Aigbivbalu IB, Hilsenbeck SB, et al. Standardization of conjunctival impression cytology. *Cornea*. 1995;14(5):515-22.
49. Dart J. Impression cytology of the ocular surface—research tool or routine clinical investigation? *Br J Ophthalmol*. 1997;81(11):930. Comment on: *Br J Ophthalmol*. 1997;81(11):984-8.
50. Paschides CA, Stefanidou M, Papageorgiou J, Skourtis P, Psilas K. Ocular surface and environmental changes. *Acta Ophthalmol Scand*. 1998;76(1):74-7.
51. Kjaergaard S. Assessment of eye irritation in humans. *Ann NY Acad Sci*. 1992;641:187-98.
52. Tseng SC, Hirst LW, Maumenee AE, Kenyon KR, Sun TT, Green WR. Possible mechanisms for the loss of goblet cells in mucin-deficient disorders. *Ophthalmology*. 1984;91(6):545-52.