Priscila Novaes

Efeitos da poluição atmosférica na superfície ocular

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

Programa de: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Newton Kara-José

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Novaes, Priscila

Efeitos da poluição atmosférica na superfície ocular / Priscila Novaes. -- São Paulo, 2011.

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

Orientador: Newton Kara-José.

Descritores: 1.Poluição atmosférica/efeitos adversos 2.Exposição ambiental
3.Conjuntiva/citologia 4.Hiperplasia 5.Oftalmopatias/epidemiologia

USP/FM/DBD-339/11

Em memória de meu pai, Dr. Gastão Novaes Filho,
por tudo que segue representando em minha vida.
À minha mãe, Marly, por seu amor infinito e seu apoio
incondicional em todos os momentos.

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.*

(Fernando Pessoa)

Agradecimentos

Aos nossos voluntários, pois sem sua participação este estudo não teria acontecido.

Ao prof. Dr. Alejandro Berra, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Ao prof. Dr. Newton Kara-José, Disciplina de Oftalmologia, FMUSP.

Ao prof. Dr. Paulo Hilário do Nascimento Saldiva, Departamento de Patologia, FMUSP.

Ao prof. Dr. Mário Luís Ribeiro Monteiro, Disciplina de Oftalmologia, FMUSP.

À Dra. Monique Matsuda, Laboratório de Oftalmologia – LIM 33, HCFMUSP.

À bióloga Maristela Peres Rangel, LIM HCFMUSP.

À Dra. Fany Solange Usuba, Divisão de Clínica Oftalmológica, HCFMUSP.

Ao Dr. José Eduardo Pazim, Divisão de Clínica Oftalmológica, HCFMUSP.

À equipe do LIM 05 – Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, HCFMUSP.

À Dra. Mariângela Macchione, LIM 05 HCFMUSP.

À enfermeira Maria Cecília Machado, Hospital Adhemar de Barros, CONDERG.

À Sra. Eliana Giantomassi, Hospital Adhemar de Barros, CONDERG.

Ao acadêmico Fernando Rodrigues, Engenharia Ambiental SENAC-SP.

Aos funcionários e colegas da Divisão de Clínica Oftalmológica do HCFMUSP.

À Regina Ferreira de Almeida, secretária da Pós-Graduação em Oftalmologia, HCFMUSP.

À minha família, meus amigos, e todas as pessoas que participaram da minha vida nesses últimos cinco anos, e que direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tese fosse concluída. Seja por participarem da execução do estudo e elaboração da tese, seja por me apoiarem na vida pessoal e acreditarem que tudo ia dar certo no final.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução	1
1.1	A poluição atmosférica nas grandes metrópoles	2
2	Objetivos	12
3	Métodos	14
	Etapa 1	15
	Monitoramento individual de exposição ao dióxido de nitrogênio	17
	Citologia de impressão	18
	Lisozima	19
	Etapa 2	20
	Avaliação subjetiva de sintomas	20
	Índice de Doença de Superfície Ocular – Ocular Surface Disease Index (OSDI)	20
	Avaliação de sintomas	21
	Avaliação Oftalmológica	21
	Biomicroscopia	21
	Teste de Schirmer	22
	Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal	22
	Tingimento da Superfície Ocular	22
	Análise estatística	24
4	Resultados	26
	Etapa 1	27
	Caracterização dos níveis de NO ₂	28
	Caracterização do número de células caliciformes	30
	Exposição ao NO ₂ e número de células caliciformes	30

Etapa 2	34
Caracterização dos níveis de NO ₂	35
Sintomas Oculares	35
Índice de Doença de Superfície Ocular - OSDI	37
Biomicroscopia e Testes Clínicos	41
Biomicroscopia	41
Teste de Schirmer	41
Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL)	41
Coloração Vital – Rosa Bengala e Fluoresceína	40
5 Discussão	41
6 Conclusões	47
7 Anexos	51
8 Referências	52
Apêndice	

Lista de abreviaturas e símbolos

NO ₂	Dióxido de Nitrogênio
PAS	Periodic Acid Schiff
OSDI	<i>Ocular Surface Disease Index</i>
TRFL	Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal
ANOVA	Análise de Variância
ρ	Coeficiente de Correlação de Spearman
OMS	Organização Mundial da Saúde
μm	micrômetro
μg	micrograma
R ²	coeficiente de determinação
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
PM	<i>particulate matter</i> (material particulado)
CO ₂	dióxido de carbono
CO	monóxido de carbono
NO _x	óxidos de nitrogênio
SO ₂	dióxido de enxofre
O ₃	Ozônio
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
Q	quartil de níveis de NO ₂
PM ₁₀	partículas com diâmetro aerodinâmico menor que 10 μm
PM _{2,5}	partículas com diâmetro aerodinâmico menor que 2,5 μm

Lista de Figuras

Figura 1:	Desenho esquematizado da divisão da superfície ocular e da córnea para pontuação das colorações com rosa bengala e fluoresceína.....	23
Figura 2:	Níveis de exposição individual ao NO ₂ em cada grupo de indivíduos, São Paulo (n=13) e Divinolândia (n=19). 2006.....	30
Figura 3:	Número de células caliciformes em conjuntiva tarsal inferior, em exemplares de citologia de impressão, distribuídos por grupo, evidenciando o outlier no grupo Divinolândia	30
Figura 4:	Número de células caliciformes em conjuntiva tarsal inferior, exemplares de citologia de impressão, distribuídos em função dos quartis de exposição ao NO ₂ . 2006.	31
Figura 5:	Contagem de células caliciformes por indivíduo, diferenciadas por localidade, distribuídas em função dos valores individuais de exposição ao NO ₂ . 2006.....	33
Figura 6:	Fotomicrografias de exemplares representativos de citologias de impressão de indivíduos nos 4 quartis. Aumento de 400x, microscopia ótica. 2006.....	32
Figura 7:	Distribuição dos valores individuais de NO ₂ , São Paulo, 2007.	35
Figura 8:	Variação nos escores do <i>Ocular Surface Disease Index</i> em relação aos níveis individuais de NO ₂ (µg/m ³). São Paulo. 2007.	37
Figura 9:	Distribuição dos escores do <i>Ocular Surface Disease Index</i> em função das categorias de NO ₂ . São Paulo. 2007.....	40
Figura 10:	Valores médios do TRFL em função da variação nos níveis individuais de exposição ao NO ₂ . São Paulo. 2007.	40

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estatística descritiva dos parâmetros dióxido de nitrogênio, células caliciformes e lisozima. São Paulo e Divinolândia. 2007.....	27
Tabela 2: Estatística descritiva dos parâmetros analisados na Etapa 2 – médias gerais e limites dos quartis. São Paulo. 2007.....	34
Tabela 3: Frequência de sintomas oculares distribuída por quartis de NO ₂ . São Paulo. 2007	36
Tabela 4: Frequência de fatores de piora baseado na avaliação subjetiva dos indivíduos para os sintomas oculares. São Paulo. 2007	36

Resumo

Novaes P. *Efeitos da poluição atmosférica na superfície ocular* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 59p.

Objetivo: Avaliar os efeitos de diferentes níveis de exposição ambiental sobre a superfície ocular, por meio da análise histológica da superfície ocular e da avaliação de parâmetros clínicos. **Métodos:** O estudo foi realizado em duas etapas. Em ambas as etapas foram realizadas medidas individuais de exposição ao dióxido de Nitrogênio (NO₂) atmosférico. Na primeira etapa foram selecionados 29 voluntários, em duas localidades diferentes: São Paulo (n=13) e Divinolândia (n=16) e foram coletados espécimes de citologia de impressão de conjuntiva tarsal inferior. Realizou-se a comparação entre o número de células caliciformes e os níveis de NO₂ entre os dois grupos e individualmente. Na segunda etapa foram avaliados 55 voluntários, residentes em São Paulo. Foi realizada uma avaliação subjetiva de sintomas oculares (OSDI e frequência de sintomas de desconforto ocular); teste de Schirmer I, biomicroscopia, coloração com fluoresceína e rosa bengala, e medida do TRFL, que foram comparados os níveis de NO₂. **Resultados:** *Etapa 1:* Os níveis de exposição individual ao NO₂ em São Paulo (média=32,47 ± 9,83 µg/m³) foram 68% mais altos do que em Divinolândia (média =19,33± 5,24 µg/m³); (p = 0,005), e houve uma correlação entre o número de células caliciformes e os níveis de NO₂ (p=0,566, p=0,001), tendo sido observado um padrão dose-resposta relativo à exposição. *Etapa 2:* Houve associação entre os níveis de NO₂ e os escores do OSDI (p<0,05), a frequência de irritação ocular (p<0,05), e os valores do TRFL (p<0,05, ρ = -0,316). **Conclusões:** Houve uma associação significativa entre exposição à poluição atmosférica e a hiperplasia de células caliciformes conjuntivais, sintomas de desconforto ocular e maior instabilidade do filme lacrimal. Observou-se uma repercussão tanto clínica quanto histológica da exposição a níveis mais elevados de NO₂, o que sugere que essas medidas podem ser usadas como biomarcadores dos efeitos adversos da poluição atmosférica sobre a superfície ocular.

Descritores: 1.Poluição Atmosférica/ efeitos adversos 2.Exposição Ambiental 3.Conjuntiva/ citologia 4.Hiperplasia 5.Oftalmopatias/ epidemiologia

Summary

Novaes P. *Effects of air pollution on the ocular surface* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 59p.

The purpose of this study was to assess the effects of different levels of ambient air pollution on the ocular surface, combining determinations of individual exposure with clinical and histological parameters. **Methods:** This study was conducted in two stages. During both stages mean individual levels of NO₂ exposure were assessed. *Stage 1:* A total of 29 volunteers from two locations - São Paulo (n=13) and Divinolândia (n=16) were selected. Impression cytology samples were obtained from inferior tarsal conjunctiva. Goblet cell counts and NO₂ exposure level were compared between the two groups, and between individual values. *Stage 2:* A total of 55 volunteers, who lived in São Paulo, were selected. All subjects underwent a subjective assessment of ocular symptoms (OSDI and a symptoms inventory), Schirmer I test, biomicroscopy, vital staining and tear break-up time (TBUT) assessment. OSDI scores, symptoms' frequency and clinical data were compared to individual NO₂ exposure values. **Results:** *Stage 1:* The NO₂ exposure levels were 68% higher for individuals living in São Paulo (mean = 32.47, SD = ± 9.83) than for those living in Divinolândia (mean 19.33, SD ± 5.24) (p = 0,005). There was a steady increase in goblet cell counts, proportional to NO₂ exposure (p=0.566, p=0.001). *Stage 2:* There was a significant association between NO₂ levels and OSDI scores (p<0.05), reported ocular irritation (p<0.05) and TBUT (p<0.05, $\rho = -0.316$). **Conclusions:** An association between exposure to higher levels of air pollution, goblet cell hyperplasia, ocular discomfort symptoms and tear film instability was detected; indicating that there are clinical and histological effects of NO₂ exposure, and that these measurements may be used as biomarkers of the adverse effects of air pollution on the ocular surface.

Descriptors: 1.Air pollution/ adverse effects 2.Environmental Exposure 3.Conjunctiva/ cytology 4.Hyperplasia 5.Eye disease/ epidemiology

1 Introdução

1.1 A poluição atmosférica nas grandes metrópoles

A poluição atmosférica é um problema que afeta centenas de milhões de habitantes de grandes centros urbanos, o que torna o estudo dos efeitos da poluição sobre a saúde humana um tema de grande importância em saúde pública.

O controle da poluição do ar nas grandes metrópoles é um desafio na atualidade, que se apresenta de forma contundente quando se consideram os possíveis efeitos adversos da poluição sobre a saúde e a magnitude da exposição, pois são milhões de indivíduos expostos continuamente a essas substâncias, e que podem ser potencialmente afetados, em maior ou menor grau, dependendo da susceptibilidade individual¹. Os efeitos da poluição sobre a saúde abrangem desde desfechos graves, como os efeitos cardiovasculares e respiratórios e aumento da mortalidade²⁻¹¹, bem como efeitos crônicos menos evidentes¹². Existe grande diversidade da qualidade do ar nos diferentes lugares do mundo, e o aumento dos níveis de poluição está associado ao uso de tecnologias obsoletas e à ausência de sistemas de controle¹³. A redução dos níveis de poluição é tecnicamente possível, porém isso depende das condições políticas e socioeconômicas e da capacidade organizacional de cada localidade. Os países desenvolvidos vêm apresentando maior controle de emissões e melhora da qualidade do ar na

últimas décadas, por causa da regulação da qualidade do ar, porém nos países em desenvolvimento a pobreza ainda pode ser um obstáculo¹⁴. A melhora continuada da qualidade do ar é necessária para reduzir o impacto da poluição, pois há evidência epidemiológica que mesmo níveis mais baixos de poluição, dentro dos padrões determinados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), causam possíveis efeitos adversos sobre a saúde¹². Para detectar esses efeitos menos evidentes existe a necessidade utilizar indicadores mais sensíveis dos efeitos da poluição sobre a saúde, como alterações da função pulmonar e marcadores de inflamação. Diretrizes atualizadas para o controle da qualidade do ar devem ser baseadas nestes indicadores e nos indicadores populacionais que têm sido tradicionalmente utilizados, como mortalidade e admissões hospitalares não programadas¹⁴.

Em grandes cidades latino-americanas, como São Paulo, Cidade do México e Santiago do Chile os altos índices de poluição são resultado de emissões de fontes veiculares, industriais e da própria topografia^{15, 16}. Na cidade de São Paulo, por exemplo, segundo dados do Departamento Estadual de Trânsito de São Paulo, circulavam em janeiro de 2011 aproximadamente 6.973.958 veículos¹⁷.

A poluição atmosférica possui características de composição físico-químicas variáveis, dependendo das fontes emissoras em cada região. As características regionais de temperatura, umidade e vento também interferem na composição e nas concentrações dos poluentes; por isso níveis semelhantes de poluição podem produzir diferentes efeitos sobre a saúde, dependendo da área e da cidade avaliada. Os principais contaminantes

ambientais são monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO_x), dióxido de enxofre (SO₂), ozônio e material particulado (PM)¹⁸.

A poluição atmosférica é uma mistura complexa e muito variável de diferentes substâncias, na fase líquida, gasosa ou sólida. Portanto, se torna impossível definir exatamente qual a mistura de cada local, existindo a necessidade de eleger alguns poluentes para serem monitorados, e que têm sido tradicionalmente associados a efeitos adversos sobre a saúde. A OMS monitora os níveis de quatro poluentes, utilizados como “sentinelas”, e correlaciona os indicadores de saúde com estas medidas. Para fins de associação com os efeitos adversos sobre a saúde são utilizados como indicadores pela OMS os seguintes poluentes¹⁹:

- PM: partículas com diâmetro aerodinâmico menor que 10µm (PM₁₀) e menor que 2,5 µm (PM_{2,5})
- O₃
- NO₂
- SO₂

É importante lembrar que a contaminação ambiental ocorre não só no ambiente externo (“outdoors”) como também no ambiente interno (“indoors”). A exposição humana à poluição é determinada pela quantidade de poluentes nos ambientes onde as pessoas passam seu tempo, e pelo tempo que permanecem nesses ambientes, que são denominados “microambientes”. A concentração “indoors” de um determinado poluente depende de fatores que afetam sua dispersão, como a taxa de ventilação e a presença ou não de

ar condicionado. A concentração de PM “indoors” é aproximadamente 65% da concentração “outdoors”, e para o NO₂ essa relação é de aproximadamente 40 a 50%²⁰.

1.1.1 NO₂

Entre os indicadores monitorados, destacamos o NO₂, por ser um poluente fácil de medir e que têm boa correlação com outros poluentes primários e secundários encontrados na complexa mistura que chamamos de “poluição atmosférica”. Devido a esses fatores a medida dos níveis de concentração de NO₂ pode ser usada como um indicador dos níveis de outros poluentes. É um dos óxidos de nitrogênio formados pela combinação do nitrogênio presente no combustível com o oxigênio atmosférico durante o processo de combustão em altas temperaturas. Aproximadamente 5% do NO₂ presente na atmosfera é poluente primário, ou seja, emitido diretamente pela fonte de combustão. A maior parte do NO₂ presente no ar ambiente é classificada como um poluente secundário, pois é resultado de transformações químicas atmosféricas do óxido nítrico (NO) produzido na combustão. É uma substância tóxica e suas concentrações estão correlacionadas as de outros poluentes, incluindo partículas ultrafinas. É um importante precursor do O₃, um poluente secundário que é produzido por transformação fotoquímica na atmosfera¹⁹.

Níveis mais altos de poluentes secundários como NO₂ e O₃ são medidos em grandes cidades, sendo que a principal fonte desses poluentes é a combustão veicular. O padrão atual para as concentrações de NO₂ adotado pela OMS é a média anual de 40µg/m³¹⁸.

1.1.2 Poluição Atmosférica e Saúde

Altos níveis de poluição têm sido associados a sérios problemas de saúde, por exemplo, baixo peso ao nascer, aumento de atendimentos de emergência de crianças, idosos e em hospitais gerais, problemas cardiovasculares e aumento de mortalidade^{2-5, 7-11, 21, 22}

Uma das maiores consequências da contaminação ambiental é seu efeito sobre o sistema respiratório, que é um dos principais locais de ação dos poluentes^{3, 4, 23-30}. As principais características patológicas associadas às doenças respiratórias crônicas são a inflamação e a hipersecreção mucosa associadas a aumento de células caliciformes em regiões do trato respiratório onde normalmente há poucas células caliciformes³¹. A poluição também parece estar associada ao aumento de condições pró-inflamatórias e a doenças auto-imunes³²⁻³⁴.

Os efeitos adversos sobre a saúde dependem do tipo, da concentração e da duração da exposição ao poluente, e alguns órgãos podem ser mais afetados do que outros. Consequências freqüentes são: irritação de olhos, nariz e garganta; diminuição da função pulmonar; aumento da susceptibilidade a infecções respiratórias e incidência aumentada de bronquite crônica. Essas alterações ainda podem ser agravadas por outros fatores como imunodeficiência, alergias, exposição ocupacional e exposição à fumaça de cigarro. As pessoas com afecções pré-existentes, p.ex. doenças cardiovasculares, as crianças e os idosos são as populações mais susceptíveis aos efeitos adversos da poluição ambiental³⁵⁻³⁷. Como a superfície ocular, junto com o trato respiratório e

pele, é uma das estruturas mais expostas aos efeitos da contaminação ambiental pressupõe-se que pode responder do mesmo modo que a mucosa respiratória ao estímulo inflamatório crônico ocasionado pela exposição aos poluentes^{38, 39}.

Além dos contaminantes presentes nos ambientes internos e externos, é importante lembrar que outros efeitos da poluição, como a destruição da camada de ozônio e o aumento da exposição à radiação ultravioleta também causam alterações na superfície ocular^{40, 41}.

1.1.3 Poluição Atmosférica e Superfície Ocular

A superfície ocular está constantemente exposta ao meio externo, sendo o filme lacrimal, junto com os epitélios da córnea e da conjuntiva, os primeiros locais de contato com agentes externos, como microorganismos, alérgenos, e poluentes. A proteção contra esses agentes requer mecanismos inespecíficos, como o aumento da frequência do ato de piscar, da quantidade de lágrimas e a presença de mucinas nas células epiteliais e no filme lacrimal, que formam uma barreira física e química para prevenir a infecção, alergia e inflamação ocular^{42, 43}. O filme lacrimal possui também mecanismos biológicos de defesa, como a lisozima e a lactoferrina, e a ativação específica de células do sistema imunológico por meio da indução de diversos complexos protéicos e sua interação com as células do tecido epitelial e vascular, que produzem IgA, IgE lacrimal e citocinas pró-inflamatórias⁴⁴.

O filme lacrimal, a córnea e a conjuntiva estão constantemente em contato com as toxinas e partículas suspensas no ar, que têm acesso direto a

estas estruturas e podem modificá-las, resultando em diminuição do tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL), sintomas de irritação ocular e desconforto, além de alterações epiteliais^{38, 39, 45, 46}. Em estudos realizados em Nova Delhi, uma grande proporção dos sujeitos estudados referiu sintomas oculares quando questionados, apesar de não terem sido considerados significativos para motivarem consulta prévia ao oftalmologista. Foram detectadas alterações do teste de Schirmer e do TRFL, evidenciando instabilidade do filme lacrimal, em pessoas mais expostas à poluição atmosférica. Estes autores concluíram que as condições ambientais aparentemente têm um efeito importante na superfície ocular, pois alterações subclínicas significativas da superfície ocular foram detectadas em pessoas que transitavam ou moravam em áreas com altos índices de poluição^{39, 46}.

A irritação é geralmente uma resposta a estímulo físico ou químico, e envolve alterações objetivas, como hiperemia e edema conjuntival localizados, e sensações subjetivas, como prurido e dor⁴⁷. Sintomas de irritação ocular têm sido usados em diversos estudos como indicador e parâmetro para avaliar os efeitos adversos da poluição sobre os olhos. Desde a década de 60, a irritação ocular é referida como resposta aos efeitos da poluição, sendo documentados sinais e sintomas como “hiperemia, edema e lacrimejamento, uma sensação de ressecamento dos olhos”⁴⁸. Entretanto, a medida da manifestação de irritação ocular é subjetiva, depende dos sintomas referidos pelos pacientes, de condições fisiológicas e psicológicas e da interação com outros fatores – como odores, por exemplo.

Pode existir uma variabilidade grande entre um estudo e outro, portanto existe a necessidade de correlacionar as medidas subjetivas de irritação sensorial com medidas objetivas de alterações oculares induzidas pela poluição⁴⁷. Na literatura pesquisada encontram-se poucos estudos que comprovam essa relação entre a percepção referida de irritação ocular e medidas objetivas de alteração na fisiologia ocular, que validem as medidas subjetivas e ajudem na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos das alterações induzidas pela poluição⁴⁹.

Em um estudo que avaliou pacientes que procuravam um serviço de emergência oftalmológica, houve uma maior frequência de pacientes com “síndrome do desconforto ocular”, associada à redução dos valores do teste de Schirmer e instabilidade do filme lacrimal, durante o verão e inverno, em dois períodos em que foram documentados picos de poluição³⁸. A “síndrome do desconforto ocular” foi caracterizada pelos autores como um conjunto de sintomas subjetivos de irritação ocular como sensação de peso nos olhos, sensação de corpo estranho, ardor, queimação e fotofobia, e que pode ser referida por pessoas expostas a diferentes níveis de contaminação ambiental. Foram também descritas alterações citológicas indicativas de inflamação ocular em pacientes que viviam em áreas mais poluídas. A contaminação ambiental também pode exacerbar os sinais e sintomas dos pacientes com olho seco e alergia^{36, 38}.

A contaminação dos ambientes internos também pode causar efeitos adversos sobre a saúde, e uma série de sinais e sintomas tem sido descritos nas últimas duas décadas nos trabalhadores de prédios de escritórios,

constituindo a chamada “Síndrome do Edifício Doente”, que inclui sintomas inespecíficos de irritação nos olhos, nariz e garganta, cefaléia, fadiga e falta de ar. Os componentes orgânicos voláteis presentes nos materiais sintéticos usados em casas e escritórios possivelmente contribuem para esses sintomas, atuando junto com as outras condições do micro clima do ambiente, como temperatura, umidade, iluminação e outras substâncias dispersas no ar⁵⁰⁻⁵⁵. Norn, em 1992, descreveu uma condição denominada ceratoconjuntivite por poluição, quando detectou em trabalhadores de “edifícios doentes” uma redução do TRFL alterações epiteliais com evidência de áreas de células desvitalizadas ou em sofrimento⁵⁶.

Na Nigéria, foi observado que crianças expostas a grande quantidade de poluentes gerados pela indústria petroquímica apresentavam maior incidência de ceratoconjuntivite por poluição, caracterizada por sintomas de coceira e sensação de corpo estranho e áreas de descoloração na conjuntiva bulbar e límbica⁵⁷.

Alterações da camada lipídica do filme lacrimal, associadas a exposição a contaminantes ambientais, também foram documentadas por meio de interferometria e do TRFL^{45, 56, 58, 59}.

Outro importante componente do filme lacrimal, que pode ser alterado pela exposição aos contaminantes ambientais é a camada de mucinas. As mucinas são componentes essenciais da lágrima, produzidos pelas células epiteliais da superfície ocular e compõem uma barreira física e química que protege a superfície ocular de patógenos, dessecação, trauma mecânico do ambiente externo e são secretadas para a camada mucosa do filme

lacrimal⁴². Os níveis de mucina liberados para o filme lacrimal são cruciais para a integridade da superfície ocular, e a alteração da quantidade e da qualidade da produção de mucinas pode ser um fator desencadeante de doenças⁴³.

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de elucidar a relação entre níveis de poluição, sintomas oculares, e alterações clínicas e histológicas da superfície ocular em indivíduos expostos a diferentes níveis de poluição atmosférica.

2 Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a correlação entre a exposição individual a um poluente atmosférico indicativo de um processo de combustão – o dióxido de Nitrogênio (NO₂), e alterações clínicas e histológicas da superfície ocular.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a correlação entre a exposição individual ao poluente atmosférico selecionado (NO₂) e as alterações da citologia de impressão em amostras de duas populações.
2. Avaliar a frequência de sintomas de desconforto ocular na amostra estudada e a relação com a exposição à diferentes níveis de poluição atmosférica.
3. Avaliar a presença de alterações clínicas da superfície ocular nos sujeitos estudados.

3 Métodos

Este estudo foi realizado em duas etapas. A Etapa 1 foi realizada durante o período de uma semana no mês de outubro de 2006 e a Etapa 2 durante o período de uma semana no mês de outubro de 2007.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq do HCFMUSP, sob o processo número 1154/06 (ANEXO 1), e pelo comitê de ética em pesquisa do CONDERG. Todos os sujeitos concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes do seu início.

Etapa 1

Selecionamos 2 grupos de voluntários expostos a diferentes gradientes de poluição, de localidades com níveis de atividade industrial e circulação de veículos automotores distintos. As duas cidades selecionadas foram São Paulo, cidade altamente industrializada, que têm 10.659.386 habitantes⁶⁰, e Divinolândia, com economia baseada em agricultura familiar, situada a 264km da cidade de São Paulo, que têm 11.116 habitantes⁶⁰.

O primeiro grupo de voluntários (n=13) foi composto por funcionários da Faculdade de Medicina e do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, HCFMUSP, que moravam na cidade de São Paulo.

O segundo grupo de voluntários (n=16) foi composto por funcionários do Hospital Regional Adhemar de Barros, CONDERG, que moravam na região de Divinolândia.

Foram escolhidas essas localidades pela possibilidade de avaliar a presença de alterações oculares em indivíduos vivendo em duas cidades com condições de poluição atmosféricas distintas.

Os critérios de inclusão e exclusão para todos os sujeitos envolvidos nas duas etapas do projeto foram:

Critérios de inclusão

- Ser parte do corpo de funcionários da instituição
- Viver e trabalhar na área do estudo há pelo menos 5 anos
- Aceitar participar do estudo após leitura e assinatura do termo de consentimento informado.

Critérios de exclusão

- Ser fumante
- A possibilidade de deslocamento para outras regiões que não a do estudo durante a vigência do monitoramento individual (7 dias).
- Contato com soluções químicas como solventes orgânicos, hipoclorito de sódio e formalina.
- Uso de lentes de contato, cirurgias oftalmológicas prévias e doenças oculares pré-existentes.
- Ser portador de doenças crônicas – Diabetes Mellitus, doenças auto-imunes, hipertensão arterial sistêmica, etc.

Monitoramento individual de exposição ao dióxido de nitrogênio

Foi usada uma medida de exposição individual ao dióxido de nitrogênio (NO₂) como indicador da exposição à poluição ambiental.

Foi utilizado um 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%⁶¹, que foi colocado dentro de um tubo plástico com uma das extremidades abertas ao ar ambiente, e depois posto dentro de uma capa protetora.

Após o período de exposição de sete dias, os filtros foram retirados dos amostradores, protegidos da luz solar, e transportados ao laboratório de Poluição Atmosférica Experimental – LPAE, HCFMUSP, onde foram processados. Inicialmente foi feita a extração da solução impregnada nos filtros, pela imersão desses filtros em metanol, e depois foi feita a reação da solução obtida com peróxido de hidrogênio, sulfanilamida e ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfônico (ANSA)⁶¹. A concentração de nitrito produzido durante o período de amostragem foi determinada colorimetricamente por espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro Ultrospec™ 4000 UV/ Visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech UK Ltd); e comparada com uma curva de calibração feita com uma solução de nitrito de sódio. O controle negativo foi um filtro tratado com a mesma solução, que não foi exposto ao meio ambiente, e foi submetido ao mesmo processamento.

Os amostradores passivos foram acoplados à vestimenta dos sujeitos da pesquisa, que foram instruídos a mantê-los consigo durante o dia, em todas as suas atividades, e na cabeceira da cama durante a noite. Foi utilizada a medida acumulada de uma semana de exposição, e o resultado foi dividido por 7, para determinar uma concentração média individual de NO₂. Esse parâmetro foi utilizado para comparação com as outras medidas do estudo ⁶².

Citologia de impressão

A técnica de citologia de impressão foi utilizada para a obtenção de amostras da camada superficial de células epiteliais de conjuntiva tarsal inferior ⁶³. Todos os espécimes foram coletados ao final do período de monitoramento de poluição (7 dias) e foram coletados no período da manhã.

Filtros semicirculares de 15mm de diâmetro (Millipore GVWP, PVDF, poro de 22µm, Millipore Corp., Bedford, MA, USA), foram justapostos à conjuntiva tarsal inferior após a instilação de uma gota de colírio anestésico (Anestalcon®, Alcon) em cada olho. Os fragmentos foram aplicados por aproximadamente 10s 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 com contendo 1,5 ml de álcool absoluto. Após a coleta, as amostras foram levadas ao Laboratório de Investigaciones Oculares da Universidade de Buenos Aires, onde foram processadas em um período de até um mês após a coleta.

Os espécimes foram então reidratados com álcool etílico a 70% e imersos sucessivamente em ácido periódico de Schiff (PAS), metabissulfito de sódio, hematoxilina de Gill e água de Scott. Na seqüência, 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 em 10 campos de alta magnificação (400x) por lâmina ⁶⁴. O mesmo pesquisador, que desconhecia o local de origem das amostras, realizou a análise de todas as lâminas.

Lisozima

Discos de papel filtro Whatman™ tipo 41 (GE Healthcare Sciences), com 5mm de diâmetro foram encostados em fórnice inferior e embebidos em filme lacrimal. Estes discos foram mantidos em freezer - 20°C, até serem transportados em gelo seco para o Laboratório de Investigaciones Oculares da Universidade de Buenos Aires, onde foram processados. As concentrações de lisozima no filme lacrimal foram medidas pelo tamanho do halo de lise em placas de ágar embebidas com *Micrococcus lysodeikticus*. Foram consideradas anormais concentrações abaixo de 1.000 mg/dl ⁶⁵.

Etapa 2

A segunda etapa do estudo foi realizada para avaliar possíveis alterações clínicas induzidas por diferentes níveis de poluição ambiental.

Foram analisados 55 indivíduos que viviam na cidade de São Paulo, e trabalhavam no mesmo local – o complexo da Faculdade de Medicina e do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, que está situado em um entroncamento de grandes avenidas e onde são registrados altos índices de poluição de origem veicular. Os sujeitos foram submetidos ao monitoramento individual de poluição como os sujeitos da etapa 1, à avaliação subjetiva de sintomas e à avaliação clínica oftalmológica e a testes clínicos (teste de Schirmer, TRFL e tingimento da superfície ocular com os corantes fluoresceína e rosa bengala).

Avaliação subjetiva de sintomas

Índice de Doença de Superfície Ocular – Ocular Surface Disease Index (OSDI)

Utilizamos uma versão em português do questionário *Ocular Surface Disease Index* (OSDI), que é um questionário desenvolvido na língua inglesa e validado para uso em pacientes com olho seco, com o intuito de avaliar sintomas de olho seco, impacto em atividades de vida diária e fatores ambientais desencadeantes ⁶⁶. Esse é um questionário composto por 12 questões, que fornece um escore, que varia de 0 a 100, e que pode ser comparado a parâmetros clínicos e laboratoriais – ANEXO 2.

Avaliação de sintomas

Foi elaborado um questionário com quatro perguntas relativas a quatro sintomas de desconforto ocular que poderiam estar associados à alterações de superfície ocular. Foi perguntado se os pacientes apresentavam esses sintomas (olhos secos, irritação ocular, olhos pesados/ cansados e coceira) e se havia algum fator de piora desses sintomas (poluição, ar-condicionado, cigarro, computador, ou outros fatores, e nesse caso quais).

Optamos por realizar dois tipos de medidas subjetivas para haver uma medida de comparação entre uma medida de formato fechado em que obteríamos um escore (OSDI) e uma forma de questionamento comum na prática clínica, que é a pergunta sobre a frequência de sintomas de desconforto ocular.

Avaliação Oftalmológica

Biomicroscopia

Todos os sujeitos foram submetidos à biomicroscopia na primeira avaliação, e foram avaliados os aspectos do filme lacrimal, das pálpebras, conjuntiva e córnea. Foram registradas a presença ou ausência de blefarite, meibomite, hiperemia conjuntival, pinguécua, pterígeo, papilas em conjuntiva tarsal superior e alterações corneanas. Portanto, a análise foi feita considerando a frequência desses achados.

Teste de Schirmer

Todos os pacientes foram submetidos ao teste de Schirmer I, sem anestesia^{67, 68}. Tiras de papel filtro do tipo Whatman I, graduada em milímetros (Ophthalmos[®], Brasil), foram colocadas no 1/3 distal do fórnice inferior, os sujeitos foram instruídos a fecharem os olhos, mantendo-se nessa posição, por 5 min. A fita foi retirada e lida após 1 min.

Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal

Para medida do TRFL foram utilizadas tiras de papel filtro impregnadas com fluoresceína (Ophthalmos[®], Brasil). No momento do exame adicionou-se à cada tira uma gota de solução fisiológica 0,9% que, na seqüência, foi instilada na superfície ocular de cada olho separadamente. Na lâmpada de fenda, utilizando o filtro azul cobalto, pediu-se para o paciente piscar 3 vezes, parar de piscar e o cronômetro foi acionado desse momento até o aparecimento da primeira mancha seca, e marcou-se o tempo. Foram realizadas 3 medidas consecutivas para cada olho, que foram somadas e divididas por 3 para obtenção do valor médio do TRFL. Para fins de análise e comparação usamos o TRFL médio dos 2 olhos. Valores menores que 10s foram considerados alterados⁶⁷.

Tingimento da Superfície Ocular

Fluoresceína: Utilizamos tiras impregnadas com fluoresceína, conforme descrito acima. Para fins de graduação, a córnea foi dividida em 3

regiões e foi utilizado um escore de 0 a 3 para cada região, podendo somar um total máximo de 9 por olho ^{68, 69} (Figura 1).

Rosa Bengala: Foram utilizadas tiras impregnados com rosa bengala (Ophthalmos[®], Brasil). No momento do exame adicionou-se à cada tira uma gota de solução fisiológica 0,9% que, na seqüência, foi instilada na região bulbar superior de cada olho separadamente. Para fins de graduação, a córnea foi dividida em 3 regiões e foi utilizado um escore de 0 a 3 para cada região, podendo somar um total máximo de 9 por olho ^{68, 69} (Figura 1).

Pontuação com Rosa Bengala
Pontuação máxima total = 9

Pontuação com Fluoresceína
Pontuação máxima total = 9

Figura 1: Desenho esquematizado da divisão da superfície ocular e da córnea para pontuação das colorações com rosa bengala e fluoresceína

Análise estatística

Etapas 1

As variáveis foram analisadas por meio de estatísticas descritivas e gráficos tipo box-plot, e utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov a fim de constatar a normalidade dos dados.

Os níveis de exposição ao NO₂, o número de células caliciformes, idade e sexo foram agrupados (São Paulo e Divinolândia) e comparados por meio do teste t de Student, com correção para variâncias heterogêneas quando aplicável (teste de Levene). A correlação entre o número de células caliciformes e os níveis individuais de exposição ao NO₂ foram determinadas por meio do coeficiente de correlação de Spearman.

Posteriormente foi verificada a possibilidade de relação dose-resposta entre o número de células caliciformes e o incremento interquartil de NO₂ por meio de inferência gráfica e utilizada a análise de variância (ANOVA) associada ao teste *post-hoc* de Bonferroni para averiguar as diferenças significantes. Determinamos o nível de significância estatística de 5% ($p=0,05$).

A contagem de células foi realizada no Laboratório de Investigaciones Oculares, Universidad de Buenos Aires, Argentina enquanto os filtros de NO₂ foram analisados no LPAE em São Paulo. Os dois bancos de dados só foram combinados após a conclusão das análises.

Etapas 2

Inicialmente foi realizada a estatística descritiva de todas as variáveis, composta por média, mediana, medidas de variância, gráficos, tabelas e testada a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. A associação entre os sintomas e alterações oculares e os quartis de NO₂ foi realizada por meio de tabelas de contingência e o teste Qui-Quadrado.

As variáveis contínuas (OSDI, TRFL, Schirmer I) e a presença de alterações oculares foram comparadas com o teste t de Student, e foi testada a correlação e força de associação com os níveis de NO₂, por meio da correlação de Spearman e por regressão linear bivariada, respectivamente.

A relação dose-dependente entre as medidas de OSDI e TRFL e o aumento na concentração de NO₂ foi averiguada por inferência gráfica, as variáveis clínicas foram agrupadas em função dos quartis de NO₂ e as diferenças nas médias testadas pela análise de variância (ANOVA) associada ao teste *post-hoc* de Tukey HSD.

O nível de significância estatística adotado foi de 5% ($p=0,05$) e todas as análises estatísticas foram conduzidas por meio do aplicativo Statistical Package for the Social Sciences (SPSS – versão 15.0).

4 Resultados

Etapa 1

Os grupos eram comparáveis do ponto de vista de idade (SP: média=36,9 $\pm$ 8,1 anos; D: média=32,1 $\pm$ 9,2 anos; p=0,14) e houve predominância de indivíduos do sexo feminino nos dois grupos (São Paulo =85%, Divinolândia = 94%).

A tabela 1 mostra a análise descritiva dos parâmetros NO₂, número de células caliciformes e lisozima.

Tabela 1: Estatística descritiva dos parâmetros dióxido de nitrogênio, células caliciformes e lisozima. São Paulo e Divinolândia. 2007

Variável	Localidade	n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC 95%	
NO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	São Paulo	13	32,4	9,8	2,7	26,5	38,4
	Divinolândia	16	19,3	5,2	1,3	16,5	22,1
	Total	29	25,2	10,0	1,9	21,4	29,0
Células Caliciformes (10 campos, 400x)	São Paulo	13	337,3	154,1	42,7	244,2	430,4
	Divinolândia	16	249,6	136,7	34,2	176,8	322,4
	Total	29	288,9	148,8	27,6	232,3	345,6
Lisozima (mg/dl)	São Paulo	11	1.564	829	250	1.006	2.121
	Divinolândia	14	1.382	925	247	848	1.916
	Total	25	1.462	871	174	1.102	1.822

Caracterização dos níveis de NO₂

Quando comparamos os níveis de NO₂ medidos em Divinolândia com os padrões de qualidade do ar recomendados pela OMS verificamos que estão dentro dos padrões aceitáveis de qualidade do ar. A concentração média de 19,3 µg/m³ (±5,2) esteve 52% abaixo da média anual de 40µg/m³ sugerida pela OMS. Os níveis de NO₂ medidos em São Paulo, quando comparados com os padrões de qualidade do ar recomendados pela OMS, também estão dentro dos padrões aceitáveis de qualidade do ar. A concentração média de 32,4 µg/m³ (±9,8) esteve 19% abaixo do da média anual sugerida pela OMS (40µg/m³).

Os níveis individuais de exposição ao NO₂ dos sujeitos que viviam em São Paulo foram significativamente mais altos que os dos sujeitos que viviam em Divinolândia (SP: média =32,47, dp=± 9.83; D: média=19,33, dp=5,24; p=0,005). Na figura 2 se encontra detalhada a distribuição da frequência dos valores de exposição ao NO₂ nas duas localidades, indicando que não somente a média foi mais baixa, mas também a frequência de exposição da população de Divinolândia esteve relacionada aos níveis mais baixos de NO₂.

Figura 2: Níveis de exposição individual ao NO₂ em cada grupo de indivíduos, São Paulo (n=13) e Divinolândia (n=19). 2006

Caracterização do número de células caliciformes

A média do número de células caliciformes em 10 campos (400x) foi de $243,37 \pm 132,67$ em Divinolândia e de $325,80 \pm 147,90$ em São Paulo. A diferença entre os dois grupos não foi significativa ($p = 0.102$, teste t de Student). A diferença entre o número de células caliciformes entre os dois grupos não foi significativa porque houve um “outlier” com 587 células em Divinolândia (Figura 3). Se esse “outlier” fosse excluído da análise a diferença entre os grupos se tornaria significativa ($p=0,029$, teste t de Student).

Figura 3: Número de células caliciformes em conjuntiva tarsal inferior, em exemplares de citologia de impressão, distribuídos por grupo, evidenciando o outlier no grupo Divinolândia. 2006

Exposição ao NO₂ e número de células caliciformes

A exposição ao NO₂ foi classificada em 4 categorias, com base nos quartis de níveis de NO₂: Q1 < 17 µg/m³, Q2: 18-21 µg/m³, Q3: 22-33 µg/m³, and Q4: > 33 µg/m³, independentemente da localidade. A média de células caliciformes distribuída por quartis foi: Q1= 186 células, Q2 = 253 células, Q3 = 312 células e Q4= 402 células. Houve um aumento de 216% no número de células caliciformes quando comparamos o primeiro e o quarto

quartis. O modelo de análise de variância foi utilizado para medir o efeito dos poluentes no número de células caliciformes, e houve uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,036$), e o teste post-hoc de Bonferroni indicou diferença significativa entre o número de células do primeiro e quarto quartis (Figura 4). O aumento do número de células caliciformes foi diretamente proporcional ao aumento dos níveis de exposição ao NO_2 , num claro padrão dose-resposta, apesar da variabilidade observada (Figura 5).

Figura 4: Número de células caliciformes em conjuntiva tarsal inferior, exemplares de citologia de impressão, distribuídos em função dos quartis de exposição ao NO_2 . 2006

Corroborando este achado, o índice de correlação de Spearman entre os níveis de NO_2 e o número de células caliciformes foi positivo ($R=0,566$) e significativo ($p=0,001$). Na figura 5 está representada a distribuição dos valores individuais de células caliciformes e os níveis individuais de NO_2 .

Figura 5: Contagem de células caliciformes por indivíduo, diferenciadas por localidade, distribuídas em função dos valores individuais de exposição ao NO_2 . 2006

Na figura 6 estão representadas fotomicrografias de exemplares de citologia de impressão de indivíduos expostos a diferentes níveis de NO_2 . Evidenciamos um aumento significativo no número de células caliciformes naqueles indivíduos expostos a níveis mais altos.

Figura 6: Fotomicrografias de exemplares representativos de citologias de impressão de indivíduos nos 4 quartis. Aumento de 400x, microscopia ótica. 2006

As setas indicam as células caliciformes.

As medidas correspondentes de número de células caliciformes e níveis de NO_2 , para cada exemplar são, respectivamente:

A: 194 células caliciformes x10 campos (400x)	NO_2 13.10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
B: 357 células caliciformes x 10campos (400x)	NO_2 18.04 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
C: 409 células caliciformes x 10campos (400x)	NO_2 26.89 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
D: 575 células caliciformes x 10campos (400x)	NO_2 45.31 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Esses dados indicam que o número de células caliciformes se correlaciona melhor com as medidas individuais de exposição aos poluentes do que com a média de cada cidade.

Etapa 2

Na Etapa 2 foram avaliados os parâmetros subjetivos (OSDI e sintomas), clínicos, e a exposição individual ao NO₂ de 55 voluntários que viviam na cidade de São Paulo. Na tabela 2 está apresentada a análise descritiva dos parâmetros NO₂, idade, Schirmer I, TRFL, e OSDI. Não houve diferença significativa entre a idade médias dos indivíduos desta etapa (média=36,2, dp= ± 9,9 anos) e os analisados na etapa I.

Tabela 2: Estatística descritiva dos parâmetros analisados na Etapa 2 – médias gerais e limites dos quartis. São Paulo. 2007

Variáveis	N	Média	Desvio Padrão	IC 95%	
NO ₂ (µg/m ³)	55	27,9	10,5	25,1	30,7
Schirmer I (mm)	55	22,9	12,4	19,5	26,3
TRFL (s)	55	6,9	4,5	5,7	8,1
OSDI	48	23,1	16,6	18,3	28,0

Caracterização dos níveis de NO₂

Observamos que existe uma grande variabilidade na amplitude da exposição ao NO₂ em indivíduos que vivem na mesma cidade e trabalham no mesmo local, o que está graficamente representado na figura 7. Isso possivelmente ocorre porque a exposição ao poluente depende de hábitos pessoais, local de residência, tempo passado ao ar livre, o tempo passado no trânsito e o modo de transporte do indivíduo.

Figura 7: Distribuição dos valores individuais de NO₂. São Paulo. 2007

Sintomas Oculares

Entre os sintomas investigados, observamos uma correlação significativa entre os quartis de exposição ao NO₂ e irritação ocular ($X^2 = 9.2$, $p \leq 0.05$). Não houve nenhuma associação estatisticamente significativa entre sensação de peso e cansaço nos olhos, prurido, olho seco e os níveis de NO₂. (Tabela 3). Entretanto, podemos observar na tabela 4 que, de modo geral, houve uma

tendência a um crescimento da frequência dos sintomas com o aumento interquartil de NO₂, apesar de não haver significância estatística. Para o sintoma olho seco houve uma significância marginal ($p < 0,10$).

Tabela 3: Frequência de sintomas oculares distribuída por quartis de NO₂. São Paulo. 2007

Sintoma	Frequência	NO ₂ (quartis de exposição)				P
		1	2	3	4	
Olho Seco	Sim n (%)	3 (23.1)	4 (64.3)	8 (71.4)	8 (61.5)	0,05
	Não n (%)	10 (76.9)	5 (35.7)	4 (28.6)	5 (38.5)	
Irritação	Sim n (%)	5 (38.5)	9 (64.3)	10 (71.4)	13 (92.9)	0,02
	Não n (%)	8 (61.5)	5 (35.7)	4 (28.6)	1 (7.1)	
Cansaço	Sim n (%)	7 (53.8)	4 (28.6)	8 (57.1)	9 (64.3)	0,43
	Não n (%)	6 (46.2)	10 (71.4)	6 (42.9)	5 (35.7)	
Coceira	Sim n (%)	8 (61.5)	8 (57.1)	9 (64.3)	11 (78.6)	0,32
	Não n (%)	5 (38.5)	6 (42.9)	5 (35.7)	3 (21.4)	

Quando indagados se haveria algum fator de piora dos sintomas referidos na avaliação subjetiva, observamos que a poluição é apontada como o fator de piora mais frequente para qualquer um dos sintomas investigados (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência de fatores de piora baseado na avaliação subjetiva dos indivíduos para os sintomas oculares. São Paulo. 2007

Sintomas	Ar-condicionado		Poluição do Ar		Frio		Cigarro		Computador		Outros	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Olhos secos	14	26	18	34	3	6	9	17	6	11	3	6
Irritação	11	19	20	34	3	5	9	16	7	12	8	14
Cansaço	2	7	7	24	0	0	4	14	12	41	4	14
Coceira	7	14	21	41	4	8	9	18	5	10	5	10

Índice de Doença de Superfície Ocular - OSDI

Houve uma associação estatisticamente significativa entre os escores do OSDI e os níveis de NO_2 , evidenciada por meio da análise de regressão linear bivariada ($R^2=0,26$; $p<0,001$) (Figura 8), ou seja, 26% da variabilidade do sinal poder ser atribuída ao NO_2 .

Figura 8: Variação nos escores do *Ocular Surface Disease Index* em relação aos níveis individuais de NO_2 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). São Paulo. 2007

Quandos os escores do OSDI foram distribuídos de acordo com os quartis dos níveis de NO_2 observamos um padrão dose-resposta, e uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,01$) (Figura 9). A diferença entre o primeiro e o último quartil foi significativa ($p<0,01$). Existe uma variabilidade grande nos escores, o que seria de se esperar para uma medida subjetiva, entretanto o $R^2=0,26$ indica que cerca de um quarto da variabilidade está associada à exposição ao NO_2 , e que esta associação é estatisticamente significativa, sugerindo que existe espaço para explicar que exposição à poluição pode ser um fator importante na causa de sintomas de sintomas oculares.

Figura 9: Distribuição dos escores do *Ocular Surface Disease Index* em função das categorias de NO_2 . São Paulo. 2007

Biomicroscopia e Testes Clínicos

Biomicroscopia

Houve uma frequência significativa de meibomite nesta amostra, e quando distribuímos as ocorrências positivas pelos diferentes quartis de exposição ao NO₂ detectamos um aumento significativo na frequência de meibomite nos sujeitos expostos a níveis mais altos do poluente ($p < 0,05$).

Considerou-se como “meibomite” a presença de sinais de estase da secreção de glândulas de Meibomius, graus variáveis de dilatação do óstio das glândulas e/ou espessamento da secreção (dificuldade de expressão), obstrução/ queratinização dos óstios das glândulas, presença de vascularização e telangiectasias na borda palpebral, associados ou não a irregularidades de contorno⁷⁰.

Teste de Schirmer

Não houve alterações significativas nos valores do teste de Schirmer I na amostra analisada (média: $22,9 \pm 12,4$ mm).

Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TRFL)

A maior parte dos indivíduos apresentou um TRFL menor que 10s (média= $6,9 \pm 4,5$ s). Houve uma correlação negativa estatisticamente significativa entre o TRFL e a exposição ao NO₂ ($p = 0,019$, $R = -0,316$, correlação de Spearman) (Figura 10).

Figura 10: Valores médios do TRFL em função da variação nos níveis individuais de exposição ao NO₂. São Paulo. 2007.

Coloração Vital – Rosa Bengala e Fluoresceína

Não houve alterações significativas nas colorações córnea e conjuntiva com fluoresceína e rosa bengala.

Não houve correlação significativa entre os níveis de NO₂, os valores do teste de Schirmer I e as pontuações de rosa bengala e fluoresceína.

5 Discussão

Na primeira etapa do estudo foi detectado um aumento significativo de células caliciformes da mucosa conjuntival em indivíduos expostos cronicamente a poluentes atmosféricos urbanos. Houve uma correlação direta entre hiperplasia de células caliciformes e os níveis de exposição individual ao NO₂. Essa foi a primeira pesquisa a documentar um aumento de células caliciformes em olhos de indivíduos expostos cronicamente à poluição urbana⁶² – APÊNDICE 1. Em 2008, Berra et al. encontraram uma correlação direta entre o aumento de células caliciformes, avaliadas por citologia de impressão, com o aumento de emissões veiculares registradas pelo sistema de monitoramento ambiental da cidade em uma série de mais de 8.000 indivíduos avaliados entre 2000 e 2006 na cidade de Buenos Aires⁷¹. A análise da superfície ocular de camundongos expostos cronicamente a níveis ambientais de poluição também revelou um aumento de células caliciformes e muco⁷². A hiperplasia de células caliciformes é resposta estereotipada das mucosas expostas cronicamente à poluição do ar, como demonstrado no pulmão e epitélio nasal de roedores^{73, 74} e em humanos⁷⁵. A hiperplasia de células caliciformes em conjuntiva tarsal inferior de indivíduos expostos a níveis mais elevados de NO₂ encontrada neste estudo indica que a mucosa ocular é um alvo para a agressão ambiental crônica e que pode ser usada como biomarcador dos efeitos adversos da poluição sobre a saúde.

Esses achados implicam na investigação do papel do muco como mecanismo de defesa frente à agressão crônica à mucosa conjuntival e conseqüentemente do papel das mucinas produzidas pelo epitélio conjuntival, que são componentes essenciais do filme lacrimal⁷⁶.

A hiperplasia mucosa também pode ser detectada em processos inflamatórios crônicos da superfície ocular como as ceratoconjuntivites atópica, vernal e papilar gigante⁴⁴. A relevância da hiperplasia de células caliciformes patogênese de doenças da superfície ocular é impossível de determinar com os dados do presente estudo, mas sabe-se que a regulação da produção de mucinas pelas células epiteliais da superfície ocular é fator preponderante para a homeostase da superfície ocular e que a disfunção deste controle, que cause produção excessiva ou à deficiência de mucinas, contribui para a patogênese de doenças da superfície ocular⁴³. Podemos especular que doenças em que há alteração da secreção de mucinas, como a Síndrome de Sjögren ou ceratoconjuntivites cicatriciais, tornem a superfície ocular mais vulnerável à ação dos poluentes, pois há uma quebra da barreira protetora formada pelas mucinas, e também uma redução da capacidade de remoção de debris da superfície ocular; sendo assim, poderia haver um maior risco de agravamento da afecção ocular em pessoas expostos a níveis mais altos de poluição.

Consideramos que a variabilidade de exposição em São Paulo seria suficientemente ampla para testar a hipótese clínica em somente uma localidade.

Na análise das alterações oculares evidenciada pela associação de achados subjetivos (sintomas e questionário OSDI), do exame oftalmológico e de testes clínicos com os níveis de exposição individual, encontramos uma relação entre maiores níveis de exposição ao NO₂, uma maior instabilidade do filme lacrimal e mais sintomas de irritação ocular e escores mais elevados do OSDI⁷⁷ – APÊNDICE 2.

A associação da avaliação de sintomas a outras medidas clínicas no diagnóstico de alterações da superfície ocular, como olho seco, é importante para o diagnóstico, monitoramento e classificação dessas alterações^{67, 78}. Os dados da tabela 4 indicam que para esta população irritação ocular foi o sintoma de desconforto ocular mais freqüente e exibiu a melhor correlação com os níveis de exposição ao NO₂. A poluição foi apontada como fator mais freqüente de piora para todos os sintomas investigados (tabela 5), o que reforça o conceito que os efeitos de curto prazo da exposição à poluição, tanto “indoors” como “outdoors”, podem refletir em sintomas oculares^{79, 80} e que, por isso, são percebidos como associados a este fator.

Optamos por associar ao inquérito de sintomas de desconforto ocular um questionário, o OSDI, que havia sido previamente desenvolvido e validado⁶⁶, e utilizado em diversos estudos de olho seco⁸¹⁻⁸⁴, porém não em uma situação e população semelhantes às do presente estudo – para detectar alterações de superfície ocular relacionadas à exposição à poluição atmosférica. Como detectamos uma associação significativa entre os escores do OSDI e os níveis de NO₂, bem como uma relação entre a freqüência de irritação ocular e os níveis de poluição, consideramos que

estas medidas são úteis na avaliação dos efeitos da poluição ambiental sobre a superfície ocular.

O aumento da frequência de meibomite no grupo exposto a níveis mais altos de NO_2 ($>35 \mu\text{g}/\text{m}^3$) sugere que a exposição a níveis mais altos de poluição pode contribuir para a inflamação da borda palpebral. A presença de meibomite pode contribuir para a instabilidade do filme lacrimal^{70, 85} e a presença de sintomas de irritação ocular também, e é uma importante causa de olho seco evaporativo^{67, 70, 86, 87}.

Estes achados indicam que a exposição a níveis mais altos de poluentes pode interferir na homeostase da superfície ocular e tem uma repercussão clínica, tanto em termos de sintomas, que podem ser a primeira indicação de um processo irritativo e inflamatório da superfície ocular⁷³, quanto em termos clínicos, com a evidência objetiva da redução do TRFL nestes indivíduos.

Realizamos a medida somente de um poluente, o NO_2 , que é um estimador de emissões automotivas, que são a principal fonte de poluição à qual os sujeitos foram expostos. Existe uma miríade de poluentes primários, como orgânicos e enxofre, que poderiam ser medidos e seriam igualmente válidos. Entretanto, por uma questão de exequibilidade e conforto para os participantes optamos por selecionar somente um, neste caso, o NO_2 . O sistema passivo de monitoramento de NO_2 foi escolhido por ser simples, eficiente e não interferir nas atividades diárias dos participantes do estudo, o que seguramente contribuiu para o alto grau de adesão ao estudo.

Existe uma associação entre os níveis dos diferentes poluentes primários, por exemplo, entre NO_2 e dióxido de enxofre (SO_2), benzeno e tolueno⁸⁸. As medidas realizadas pela CETESB, em São Paulo, também mostram um alto grau de correlação entre os diferentes poluentes primários. Por exemplo, a correlação anual entre CO e PM_{10} em São Paulo é 0,85⁸⁹, e a correlação entre CO, NO_2 e PM_{10} é 0,90. Este fato permite, para fins de análise dos achados do presente estudo, inferir que os sujeitos estavam não só mais expostos ao NO_2 , mas também a outras poluentes, como material particulado (PM) e CO, além dos poluentes secundários, que dispersos no ar atmosférico também estão em contato direto com a superfície ocular.

Considerando as duas etapas, podemos inferir que talvez a hiperplasia de células caliciformes leve a um desequilíbrio da produção de mucinas e da quantidade e qualidade das mucinas presentes na lágrima, e que isso se reflita contribua para uma maior instabilidade do filme lacrimal. A presença de maior quantidade de poluentes também pode ter um efeito direto na estabilidade do filme lacrimal, interferindo na tensão superficial da lágrima⁵⁸. Os sintomas referidos seriam a manifestação inicial deste desequilíbrio da superfície ocular.

6 Conclusões

1. Houve uma associação positiva e significativa entre exposição à poluição ambiental e hiperplasia de células caliciformes em conjuntiva tarsal inferior, o que indica que a exposição crônica à poluição ambiental constitui um estímulo irritativo que gera uma resposta adaptativa da superfície ocular.

2. Os sujeitos expostos a níveis mais elevados de poluição atmosférica apresentavam mais sintomas de irritação ocular.

3. Os sujeitos expostos a níveis mais elevados de poluição atmosférica apresentavam diminuição do TRFL.

Portanto, observou-se, nas condições deste estudo, uma repercussão tanto clínica quanto histológica da exposição a níveis mais elevados de poluição ambiental.

Anexo 1: Cópia da aprovação do protocolo de pesquisa na CAPPesq HCFMUSP

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A 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, em sessão de 23.11.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 1154/06, intitulado: "Estudo dos efeitos dos diferentes níveis de poluição atmosférica na superfície ocular: avaliação de sintomas, qualidade de vida, testes clínicos e laboratoriais" apresentado pelo Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX, 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável : Prof. Dr. Newton Kara José
Pesquisador (a) Executante : Priscila Novaes

CAPPesq, 23 de novembro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pres de Campos, 225, 3º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3061-4000 - Fax: (11) 3061-4007 - e-mail: cappel@hcfmusp.br / secretariacappel@hcfmusp.br

ANEXO 2 – Questionário *Ocular Surface Disease Index* – OSDI

OSDI

Data: __/__/____

Nome: _____

Nós gostaríamos que o senhor (a) respondesse este questionário, preenchendo com um X a alternativa mais apropriada para o que o senhor sentiu na semana passada (nos últimos sete dias).

Na **SEMANA PASSADA** você sentiu alguma dessas sensações?

		O tempo todo	A maior parte do tempo	A metade do tempo	A menor parte do tempo	Nunca
1	Olhos sensíveis à luz?					
2	Sensação de areia nos olhos?					
3	Dor ou ardor nos olhos?					
4	Vista embaçada?					
5	Vista fraca?					

Na **SEMANA PASSADA** os problemas com seus olhos atrapalharam a realização de alguma das seguintes atividades?

		O tempo todo	A maior parte do tempo	A metade do tempo	A menor parte do tempo	Nunca	Não fiz esta atividade na semana passada.
6	Ler?						
7	Dirigir à noite?						
8	Trabalhar com o computador ou usar o caixa eletrônico?						
9	Ver televisão?						

Na **SEMANA PASSADA** você sentiu problemas em seus olhos quando estava em algum desses lugares?

		O tempo todo	A maior parte do tempo	A metade do tempo	A menor parte do tempo	Nunca	Não estive em lugar assim na semana passada
10	Lugar com vento?						
11	Lugar muito seco?						
12	Lugar com ar-condicionado?						

8 Referências

1. Schwartz J, Bellinger D, Glass T. Exploring potential sources of differential vulnerability and susceptibility in risk from environmental hazards to expand the scope of risk assessment. *Am J Public Health*. Dec 2011;101 Suppl 1:S94-101.
2. Gouveia N, Fletcher T. Time series analysis of air pollution and mortality: effects by cause, age and socioeconomic status. *J Epidemiol Community Health*. 2000;54(10):750-755.
3. Saldiva P, Lichtenfels A, Paiva P, et al. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environ Res*. 1994;65(2):218-225.
4. Saldiva P, Pope Cr, Schwartz J, et al. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch Environ Health*. 1995;50(2):159-163.
5. Santos UP, Terra-Filho M, Lin CA, et al. Cardiac arrhythmia emergency room visits and environmental air pollution in Sao Paulo, Brazil. *Journal of Epidemiology & Community Health*. 2008;62(3):267-272.
6. Brunekreef B, Beelen R, Hoek G, et al. Effects of long-term exposure to traffic-related air pollution on respiratory and cardiovascular mortality in the Netherlands: the NLCS-AIR study. *Res Rep Health Eff Inst*. Mar 2009(139):5-71; discussion 73-89.
7. Gouveia N, Bremner SA, Novaes HM. Association between ambient air pollution and birth weight in Sao Paulo, Brazil.[see comment]. *Journal of Epidemiology & Community Health*. 2004;58(1):11-17.
8. Lin C, Amador Pereira L, de Souza Conceição G, et al. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. *Environ Res*. 2003;92(1):57-63.
9. Martins L, Pereira L, Lin C, et al. The effects of air pollution on cardiovascular diseases: lag structures. *Rev Saude Publica*. 2006;40(4):677-683.
10. Lin C, Martins M, Farhat S, et al. Air pollution and respiratory illness of children in São Paulo, Brazil. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 1999;13(4):475-488.

11. Martins L, Latorre MR, Saldiva P, et al. Air pollution and emergency room visits due to chronic lower respiratory diseases in the elderly: an ecological time-series study in São Paulo, Brazil. *J Occup Environ Med*. 2002;44(7):622-627.
12. Gouveia N, Maisonet M. Health Effects of Air Pollution: An Overview. *Air Quality Guidelines - Global Update 2005*. Geneve: WHO - World Health Organization; 2006:87-109.
13. Chen B, Kan H, Chen R, et al. Air pollution and health studies in China--policy implications. *J Air Waste Manag Assoc*. Nov 2011;61(11):1292-1299.
14. WHO. Introduction to Air Quality Guidelines Update. *Air Quality Guidelines Global Update 2005*. Geneva: World Health Organization; 2006:1-9.
15. Lacasana-Navarro M, Aguilar-Garduno C, Romieu I. [Evolution of air pollution and impact on control programs in 3 megacities in Latin America]. *Salud Publica Mex*. May-Jun 1999;41(3):203-215.
16. Molina MJ, Molina LT. Megacities and atmospheric pollution. *J Air Waste Manag Assoc*. Jun 2004;54(6):644-680.
17. nossasãopaulo.org. Município de São Paulo - Transporte/ Mobilidade Urbana: Observatório Cidadão Nossa São Paulo; 2011.
18. WHO. *Guidelines for Air Quality*. Geneva: The World Health Organization; 2000.
19. Sivertsen B. Global ambient air pollution concentration and trends. In: WHO, ed. *Air Quality Guidelines Global Update 2005*. Geneva: World Health Organization; 2006:31-59.
20. Janssen N, Mehta S. Human Exposure to Air Pollution. *Air Quality Guidelines Update 2005*. Vol 1. Geneva: World Health Organization; 2006:61-85.
21. Botter D, Jørgensen B, Peres A. A longitudinal study of mortality and air pollution for São Paulo, Brazil. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2002;12(5):335-343.
22. Martins M, Fatigati F, Véspoli T, et al. Influence of socioeconomic conditions on air pollution adverse health effects in elderly people: an analysis of six regions in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health*. 2004;58(1):41-46.
23. Pope Cr, Dockery D, Spengler J, et al. Respiratory health and PM10 pollution. A daily time series analysis. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144(3 Pt 1):668-674.

24. Pope CA, 3rd, Dockery DW. Acute health effects of PM₁₀ pollution on symptomatic and asymptomatic children. *American Review of Respiratory Disease*. 1992;145(5):1123-1128.
25. Dockery DW, Speizer FE, Stram DO, et al. Effects of inhalable particles on respiratory health of children. *American Review of Respiratory Disease*. 1989;139(3):587-594.
26. Dockery DW, Brunekreef B. Longitudinal studies of air pollution effects on lung function. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*. 1996;154(6 Pt 2):S250-256.
27. Raizenne ME, Burnett RT, Stern B, et al. Acute lung function responses to ambient acid aerosol exposures in children. *Environmental Health Perspectives*. 1989;79:179-185.
28. Boezen HM, van der Zee SC, Postma DS, et al. Effects of ambient air pollution on upper and lower respiratory symptoms and peak expiratory flow in children.[comment]. *Lancet*. 1999;353(9156):874-878.
29. Samet JM, Lambert WE, Skipper BJ, et al. A study of respiratory illnesses in infants and nitrogen dioxide exposure. *Archives of Environmental Health*. 1992;47(1):57-63.
30. Schmitzberger R, Rhomberg K, Buchele H, et al. Effects of air pollution on the respiratory tract of children. *Pediatric Pulmonology*. 1993;15(2):68-74.
31. Harkema JR, Keeler G, Wagner J, et al. Effects of concentrated ambient particles on normal and hypersecretory airways in rats. *Res Rep Health Eff Inst*. Aug 2004(120):1-68; discussion 69-79.
32. Ritz SA. Air pollution as a potential contributor to the 'epidemic' of autoimmune disease. *Med Hypotheses*. Jan 2010;74(1):110-117.
33. Bernatsky S, Fournier M, Pineau CA, et al. Associations between ambient fine particulate levels and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Environ Health Perspect*. Jan 2011;119(1):45-49.
34. Hart JE, Laden F, Puett RC, et al. Exposure to traffic pollution and increased risk of rheumatoid arthritis. *Environ Health Perspect*. Jul 2009;117(7):1065-1069.
35. Wanner HU. Effects of atmospheric pollution on human health. *Experientia*. Sep 15 1993;49(9):754-758.
36. Riediker M, Monn C, Koller T, et al. Air pollutants enhance rhinoconjunctivitis symptoms in pollen-allergic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol*. Oct 2001;87(4):311-318.

37. Viegi G, Maio S, Pistelli F, et al. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: health effects of air pollution. *Respirology*. Sep 2006;11(5):523-532.
38. Versura P, Profazio V, Cellini M, et al. Eye discomfort and air pollution. *Ophthalmologica*. 1999;213(2):103-109.
39. Saxena R, Srivastava S, Trivedi D, et al. Impact of environmental pollution on the eye. *Acta Ophthalmol Scand*. Oct 2003;81(5):491-494.
40. Aucamp PJ. Questions and answers about the effects of the depletion of the ozone layer on humans and the environment. *Photochem Photobiol Sci*. Mar 2007;6(3):319-330.
41. Feretis E, Theodorakopoulos P, Varotsos C, et al. On the plausible association between environmental conditions and human eye damage. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2002;9(3):163-165.
42. Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res*. Mar 2004;78(3):379-388.
43. Dartt DA. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res*. Feb 2004;78(2):173-185.
44. McDermott AM, Perez V, Huang AJ, et al. Pathways of corneal and ocular surface inflammation: a perspective from the cullen symposium. *Ocul Surf*. Oct 2005;3(4 Suppl):S131-138.
45. Wolkoff P, Skov P, Franck C, et al. Eye irritation and environmental factors in the office environment--hypotheses, causes and a physiological model. *Scand J Work Environ Health*. Dec 2003;29(6):411-430.
46. Gupta SK, Gupta V, Joshi S, et al. Subclinically dry eyes in urban Delhi: an impact of air pollution? *Ophthalmologica*. Sep-Oct 2002;216(5):368-371.
47. Hempel-Jorgensen A, Kjaergaard SK, Molhave L. Cytological changes and conjunctival hyperemia in relation to sensory eye irritation. *Int Arch Occup Environ Health*. Jun 1998;71(4):225-235.
48. Basu PK. Air pollution and the eye. *Surv Ophthalmol*. Sep-Oct 1972;17(2):78-93.
49. Walker JC, Kendal-Reed M, Utell MJ, et al. Human breathing and eye blink rate responses to airborne chemicals. *Environ Health Perspect*. Aug 2001;109 Suppl 4:507-512.
50. Koren HS, Graham DE, Devlin RB. Exposure of humans to a volatile organic mixture. III. Inflammatory response. *Arch Environ Health*. Jan-Feb 1992;47(1):39-44.

51. Nordstrom K, Norback D, Akseleson R. Influence of indoor air quality and personal factors on the sick building syndrome (SBS) in Swedish geriatric hospitals. *Occup Environ Med.* Mar 1995;52(3):170-176.
52. Wieslander G, Norback D, Nordstrom K, et al. Nasal and ocular symptoms, tear film stability and biomarkers in nasal lavage, in relation to building-dampness and building design in hospitals. *Int Arch Occup Environ Health.* Oct 1999;72(7):451-461.
53. Franck C, Bach E, Skov P. Prevalence of objective eye manifestations in people working in office buildings with different prevalences of the sick building syndrome compared with the general population. *Int Arch Occup Environ Health.* 1993;65(1):65-69.
54. Wolkoff P, Wilkins CK, Clausen PA, et al. Organic compounds in office environments - sensory irritation, odor, measurements and the role of reactive chemistry. *Indoor Air.* Feb 2006;16(1):7-19.
55. Wolkoff P, Nojgaard JK, Franck C, et al. The modern office environment desiccates the eyes? *Indoor Air.* Aug 2006;16(4):258-265.
56. Norn M. Pollution keratoconjunctivitis. A review. *Acta Ophthalmol (Copenh).* Apr 1992;70(2):269-273.
57. Asonye CC, Bello ER. The blight of pollution keratoconjunctivitis among children in oil-producing industrial areas of Delta State, Nigeria. *Ecotoxicol Environ Saf.* Oct 2004;59(2):244-248.
58. Zhao J, Wollmer P. Air pollutants and tear film stability--a method for experimental evaluation. *Clin Physiol.* May 2001;21(3):282-286.
59. Norn MS. Semiquantitative interference study of fatty layer of precorneal film. *Acta Ophthalmol (Copenh).* Oct 1979;57(5):766-774.
60. IBGE. Censo 2010: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010.
61. Lodge J. Analysis of Atmospheric Nitrogen Dioxide (24H- Average). . In: Committee I, ed. *Methods of air sampling and analysis.* . 3rd ed: MI: Lewis Publishers; 1989:399-402.
62. 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.
63. Nelson JD. Impression cytology. *Cornea.* 1988;7(1):71-81.
64. Singh R, Joseph A, Umapathy T, et al. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol.* Dec 2005;89(12):1655-1659.

65. Gonzalez-Garcia MJ, Gonzalez-Saiz A, de la Fuente B, et al. Exposure to a controlled adverse environment impairs the ocular surface of subjects with minimally symptomatic dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Sep 2007;48(9):4026-4032.
66. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, et al. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol*. May 2000;118(5):615-621.
67. DEWS. 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.
68. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol*. Jul 1969;82(1):10-14.
69. Toda I, Fujishima H, Tsubota K. Ocular fatigue is the major symptom of dry eye. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. Jun 1993;71(3):347-352.
70. Nelson JD, Shimazaki J, Benitez-del-Castillo JM, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the definition and classification subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Mar 2011;52(4):1930-1937.
71. Berra I, Dawidowski L, Novaes P, et al. Correlation Between the Levels of Air Pollution With the Hyperplasia of Goblet Cells in Human Conjunctiva During the Last 7 Years in the Metropolitan Area of Buenos Aires, Argentina *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(e-abstract 2374).
72. Santo R, Kara-Jose N, Novaes P, et al. Effects of São Paulo Air Pollution on the Mice Conjunctiva *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48 (e-abstract 393).
73. Saldiva PH, King M, Delmonte VL, et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ Res*. Feb 1992;57(1):19-33.
74. Camargo Pires-Neto R, Julia Lichtenfels A, Regina Soares S, et al. Effects of Sao Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res*. Jul 2006;101(3):356-361.
75. Souza MB, Saldiva PH, Pope CA, 3rd, et al. 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.
76. Argueso P, Gipson IK. Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function. *Exp Eye Res*. Sep 2001;73(3):281-289.

-
77. 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;110(4):372-374.
 78. Nichols KK, Mitchell GL, Zadnik K. The repeatability of clinical measurements of dry eye. *Cornea.* Apr 2004;23(3):272-285.
 79. Higgins BG, Francis HC, Yates CJ, et al. Effects of air pollution on symptoms and peak expiratory flow measurements in subjects with obstructive airways disease. *Thorax.* Feb 1995;50(2):149-155.
 80. Wolkoff P. Ocular discomfort by environmental and personal risk factors altering the precorneal tear film. *Toxicol Lett.* Dec 15 2010;199(3):203-212.
 81. Valente C, Iester M, Corsi E, et al. Symptoms and signs of tear film dysfunction in glaucomatous patients. *J Ocul Pharmacol Ther.* Jun 2011;27(3):281-285.
 82. Pult H, Purslow C, Murphy PJ. The relationship between clinical signs and dry eye symptoms. *Eye (Lond).* Apr 2011;25(4):502-510.
 83. Sullivan BD, Whitmer D, Nichols KK, et al. An objective approach to dry eye disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Dec 2010;51(12):6125-6130.
 84. Barboza MN, Barboza GN, de Melo GM, et al. [Correlation between signals and symptoms of dry eye in Sjogren's syndrome patients]. *Arq Bras Oftalmol.* Jul-Aug 2008;71(4):547-552.
 85. Borchman D, Foulks GN, Yappert MC, et al. Human meibum lipid conformation and thermodynamic changes with meibomian-gland dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* May 2011;52(6):3805-3817.
 86. Foulks GN. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. *Surv Ophthalmol.* Jul-Aug 2007;52(4):369-374.
 87. Baudouin C. [A new approach for better comprehension of diseases of the ocular surface]. *J Fr Ophtalmol.* Mar 2007;30(3):239-246.
 88. Wheeler AJ, Smith-Doiron M, Xu X, et al. Intra-urban variability of air pollution in Windsor, Ontario--measurement and modeling for human exposure assessment. *Environ Res.* Jan 2008;106(1):7-16.
 89. CETESB. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo 2006. São Paulo. 2007.

Apêndice

APÊNDICE 1 - Artigo – “Ambient Levels of Air Pollution Induce Goblet-Cell Hyperplasia in Human Conjunctival Epithelium.” *Environmental Health Perspectives*. 2007.

Ambient Levels of Air Pollution Induce Goblet-Cell Hyperplasia in Human Conjunctival Epithelium

Priscila Novaes,¹ Paulo Hilário do Nascimento Saldiva,² Newton Kara-José,¹ Mariângela Macchione,² Monique Matsuda,^{1,2} Lourdes Racca,³ and Alejandro Berra^{1,3}

¹Laboratório de Investigação em Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ²Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ³Laboratorio de Investigaciones Oculares, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

BACKGROUND: Ocular mucosa is exposed constantly to the external environment, and chronic exposure to air pollution may affect the ocular surface.

OBJECTIVE: We assessed the effect of air pollution on the ocular surface by combining determinations of individual exposure and conjunctival impression cytology.

METHODS: A panel study was conducted with 29 volunteers recruited in two locations with different pollution levels: São Paulo ($n = 13$) and Divinolândia ($n = 16$). We assessed mean individual levels of nitrogen dioxide (NO₂) exposure for 7 days, using a passive sampler. Impression cytology samples were obtained from inferior tarsal conjunctiva. Comparisons between the two groups in terms of NO₂ exposure and goblet-cell counts were performed using the Student *t*-test. Correlations between goblet-cells counts and corresponding individual NO₂ exposure levels were determined using Spearman's correlation.

RESULTS: Individuals living in São Paulo received a significantly ($p = 0.005$) higher dose of NO₂ (mean 32.47; SD 9.83) than those living in Divinolândia (mean 19.33; SD 5.24). There was a steady increase in goblet-cell counts, proportional to NO₂ exposure (Spearman's correlation = 0.566, $p = 0.001$), with a dose-response pattern.

CONCLUSIONS: A positive and significant association between exposure to air pollution and goblet-cell hyperplasia in human conjunctiva was detected. The combination of simple measurements of exposure and impression cytology was an effective and noninvasive approach for characterizing human response to ambient levels of air pollution.

KEY WORDS: air pollutants, conjunctiva, environmental, goblet-cell, impression cytology, nitrogen dioxide. *Environ Health Perspect* 115:1753–1756 (2007). doi:10.1289/ehp.10363 available via <http://dx.doi.org/> [Online 14 September 2007]

Acute adverse health effects of ambient levels of air pollution have been demonstrated in humans, mostly in terms of respiratory and cardiovascular events (Barnett et al. 2006; Ito et al. 2005; Medina-Ramón et al. 2006; Pope et al. 2002; Samoli et al. 2003; Souza et al. 1998).

Ocular mucosa is exposed constantly to the external environment. Indeed individuals living in areas with high concentrations of pollutants frequently report ocular symptoms (Saxena et al. 2003; Versura et al. 1999), and previous studies have detected tear film abnormalities and subclinical changes of the ocular surface in individuals who lived in cities with high levels of air pollution (Gupta et al. 2002; Saxena et al. 2003). In such scenario, changes in ocular mucosa may indicate potential damage to the eyes and represent a convenient biomarker of the adverse health effects induced by air pollution if objective estimators of ocular surface changes in individuals living in urban areas are proportional to the degree of exposure. In the present study we explored this concept by conducting a panel study combining determinations of individual exposure to air pollution, expressed in terms of nitrogen dioxide (NO₂) and measuring ocular surface changes by impression cytology.

Materials and Methods

Study population. The study involved 29 volunteers, who were recruited in two locations, with different pollution levels: São Paulo ($n = 13$) and Divinolândia ($n = 16$). São Paulo is the largest city in Latin America, with high levels of air pollution, mainly as a result of traffic emissions. Divinolândia is a small city in the countryside of the state of São Paulo, where half the population lives in rural settings and where there is no significant industrial activity. The volunteers were recruited among the employees of two public hospitals: at the General Clinics Hospital of the University of São Paulo Medical School and the Regional Hospital in Divinolândia. The hospital in São Paulo is located downtown at an intersection of broad avenues with heavy traffic, whereas in Divinolândia the hospital is located in a relatively isolated spot surrounded by farms. The research protocol was approved by the ethics committees of both institutions, and all subjects gave their informed consent before enrollment in the study. The following inclusion criteria were adopted: *a*) to be part of the fixed staff of the hospitals, *b*) to have been living in the study area for at least 5 years, and *c*) to accept participating in the study after reading and signing an informed consent form. The following parameters were adopted to exclude

volunteers: *a*) smoking, *b*) possibility of traveling to other areas during the monitoring period (7 days), *c*) contact with chemical solutions such as organic solvents, sodium hypochloride, and formalin, and *d*) individuals with history of use of contact lenses, ophthalmic surgery, and preexisting ophthalmic conditions. All volunteers used gas cooking and no houses had home heating.

Exposure assessment. NO₂ was used as an indicator of exposure to air pollution. We employed a passive sampler that included a cellulose filter (Energetica, Rio de Janeiro, Brazil) impregnated with an absorbant solution—triethanolamine 2%, 0.05% *o*-methoxyphenol, and 0.025% sodium metabisulfite (Lodge 1989), which was enclosed within 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 (ANSA) 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 State Sanitation Agency of São Paulo (CETESB 2007). Our method has an accuracy of 98.6% and a precision of 80%. The lower detection limit is an accumulated exposure of 100 µg/m³, and no evidence of saturation was observed up to 450 µg/m³ of accumulated exposure (defined as the average concentration of 24 hr of NO₂ exposure per number of days). The accumulated NO₂ concentration obtained by the two methods was compared across a time window ranging from 3 to 10 days. A good agreement between the two methods was observed, as depicted in Figure 1.

Address correspondence to P. Novaes, R. Manoel da Nóbrega, 1240 Apt. 61-A, Cep: 04001-004, São Paulo, Brazil. Telephone: (5511) 3061-7688, (5511) 3891-2131. Fax: (5511) 3068-0072. E-mail: pris_novaes@yahoo.com.br

We especially thank M.C. Machado and E. Giantomassi for their support and help in selecting the subjects and allowing us the use of the facilities at Divinolândia General Hospital (CONDERG), Divinolândia, Brazil.

The authors declare they have no competing financial interests.

Received 14 April 2007; accepted 13 September 2007.

Passive samplers were fixed in the pocket of the studied individuals, who were instructed to keep them at all times during their daily activities and by the bedside during the night for 7 days.

We used a cumulative measure of 1 week of NO₂ exposure and divided such measure by 7, which gave us a mean individual level of exposure that was compared with goblet-cell counts.

Impression cytology of conjunctival mucosa. Impression cytology was used to obtain samples from the superficial epithelial cell layers of inferior tarsal conjunctiva. Impression cytology samples were collected after the 7-day monitoring of NO₂. All samples were collected in the morning (0900–1100 hours).

Semicircular filters approximately 15 mm diameter in size (cellulose ester filter 22- μ m pore; Millipore Corp., Bedford, MA, USA) were applied to the inferior tarsal conjunctiva after instillation of one drop of topical anesthetic (tetracaine) in each eye, and the excess fluid was wiped away. The paper fragments were applied for approximately 10 sec, and after gentle pressure with the blunt end of the forceps, the fragments were peeled off and immediately immersed in tubes containing absolute ethanol. After fixation, specimens were rehydrated in 70% ethyl alcohol, then

placed successively in periodic acid–Schiff reagent, sodium metabisulfite, Gill's hematoxylin and Scott's tap water. Specimens were then rinsed with 95% alcohol and absolute alcohol. Xylene was used to make the filter paper transparent. Before mounting, the filter paper was placed with epithelial cells facing up. Slides were examined by light microscopy and goblet cells were counted in 10 high-power fields (HPF) with a 400 $\times$ magnification (Singh et al. 2005). The same investigator (A.B.) performed the goblet-cell counts and was blinded to the place of origin of the samples.

Statistical analysis. Comparisons of NO₂ exposure and goblet-cell counts between the two groups (São Paulo and Divinolândia) were performed using the Student *t*-test, with corrections for inequality of variances. Correlations between goblet-cell counts and corresponding individual NO₂ exposure level were determined using Spearman's correlation. The effect of air pollutants on goblet-cell counts was also measured by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post hoc test. The level of significance was set at 5%. Goblet-cell counts were performed in Argentina, and NO₂ data were simultaneously computed in São Paulo. The two data sets were combined only after the analysis of the samples was concluded.

Results

There were no significant differences among the groups in São Paulo (SP) and Divinolândia (D) regarding age (SP: mean 37.15, SD 8.2;

D: mean 32.13, SD 9.2; $p = 0.136$); sex (SP: female, 85%, male, 15%; D: female, 94%, male, 6%); and passive smoking (SP, 37.5%; D, 38.5%).

Individuals living in São Paulo received a significantly ($p = 0.005$) higher dose of NO₂ (mean 32.47, SD 9.83) than those in Divinolândia (mean 19.33, SD 5.24), as expected based on the characteristics of each city (Figure 2).

Mean (and corresponding SD) number of goblet cells per 10 HPF was 243.37 ± 132.67 in Divinolândia and 325.80 ± 147.90 in São Paulo. The difference between the two groups was not significant ($p = 0.102$, Student *t*-test). The difference between goblet-cell counts was not statistically significant in our sample because of the presence in the Divinolândia group of an outlier with a goblet-cell count of about 600 cells in 10 HPF. If this outlier were excluded, individual differences would be significant ($p = 0.029$, Student *t*-test).

We classified subjects' exposures to NO₂ into four categories on the basis of quartiles of NO₂ levels: Q1, < 17 μ g/m³; Q2, 18–21 μ g/m³; Q3, 22–33 μ g/m³; and Q4, > 33 μ g/m³, regardless of the city of residence. The mean counts of goblet cells, distributed by quartiles of NO₂ were Q1, 186 cells; Q2, 253 cells; Q3, 312 cells; and Q4, 402 cells. There was a 216% increase in the number of goblet cells from the first to the fourth quartile. Figure 3 shows the microscopic aspect of impression cytology samples, and a marked increase in goblet-cell hyperplasia can be

Figure 1. Graphic representation of simultaneous determinations of accumulated ambient concentrations of NO₂, measured by the passive sampler and corresponding values determined by the Sanitation Agency of the São Paulo (CETESB 2007).

Figure 2. Individual NO₂ exposure levels in each group.

Figure 3. Impression cytology photographs of representative samples. The arrows indicate goblet cells. Corresponding goblet-cell counts and NO₂ exposure levels are: (A) 194 cells $\times$ 10HPF NO₂ 13.10 μ g/m³; (B) 357 goblet cells $\times$ 10HPF NO₂ 18.04 μ g/m³; (C) 409 goblet cells $\times$ 10HPF NO₂ 26.89 μ g/m³; (D) 575 goblet cells $\times$ 10HPF NO₂ 45.31 μ g/m³. Scale bar = 100 μ m.

observed in subjects exposed to higher levels of NO₂.

Goblet-cell counts increased proportionately to NO₂ exposure in a dose-response pattern despite the variability observed (Figure 4). Indeed, Spearman's correlation between NO₂ and goblet cells per 10 HPF was positive (0.566) and significant ($p = 0.001$). Using ANOVA to measure the effect of air pollutants on goblet-cell counts, we detected a significant difference among groups ($p = 0.036$). The Bonferroni post hoc test indicated that goblet-cell counts of the first and fourth quartiles of NO₂ exposure were significantly different.

Discussion

Goblet-cell hyperplasia is a stereotyped response of mucosal surfaces when chronically exposed to air pollution, as demonstrated in rodents (Pires-Neto et al. 2006; Saldiva et al. 1992) and humans (Souza et al. 1998). In this present study, we report that conjunctival mucosa follows this same path. In addition, we demonstrated a positive and significant correlation between gradients of exposure and intensity of goblet-cell hyperplasia.

Conjunctival goblet cells are slow cycling cells that may proliferate in response to chronic inflammatory stimuli (Dartt 2004; Pellegrini et al. 1999; Wei et al. 1995). Goblet-cell hyperplasia is detected in chronic allergic eye disease such as vernal keratoconjunctivitis, atopic keratoconjunctivitis, and giant papillary conjunctivitis (Mc Dermott et al. 2005). Studies have shown that chronic exposure to ambient air pollution is associated with subclinical changes of the ocular surface and the tear film (Gupta et al. 2002; Saxena et al. 2003), but goblet-cell hyperplasia related to NO₂ has not been documented previously. There is no accurate characterization of goblet-cell turnover in conjunctival mucosa; however, there is substantial information on mucous hyperplasia of the airways

resulting from exposure to sulfur dioxide (SO₂) and ozone across a wide range of exposure protocols (Fanucchi et al. 2006; Harkema et al. 1999; Saldiva et al. 1992; Seltzer et al. 1984; White et al. 1986). Generally, mucous hyperplasia occurs in the respiratory epithelium after weeks or months and is considered a marker of airway remodeling induced by persistent injurious stimuli. The observed mucous hyperplasia probably reflects exposure to air pollution that occurred within a much larger time window than the 1-week assessment that was conducted.

We considered NO₂ a proxy estimator of exposure to air pollution, not the single causative agent. The passive sampler we employed for the determination of NO₂ exposure was simple, did not restrict daily activities and exhibited a good correlation with the state monitoring system (Figure 1). In addition, previous studies our group conducted in the last decade observed consistent and significant correlations between NO₂ and other primary pollutants such as PM₁₀ (particulate matter with an aerodynamic diameter $\leq 10 \mu\text{m}$), carbon monoxide, and SO₂ (Braga et al. 2001; Conceição et al. 2001; de Paula Santos et al. 2005; Farhat et al. 2005; Lin et al. 2003, 1999; Martins et al. 2002; Pereira et al. 1998; Saldiva et al. 1995). Thus, NO₂ should be considered, within the context of the current study, a marker of combustion-derived pollutants produced by vehicular emissions and other sources such as biomass burning.

In the present study the cumulative measure of 1 week of NO₂ exposure was considered a representative measure of chronic exposure, and the study was conducted simultaneously in both cities to minimize climatic influence.

The range of exposure to NO₂ experienced by our study population was between 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (24-hr mean of 1-week exposure). Such levels are within those observed in several locations throughout the world, indicating that the individuals evaluated in this study were not exposed to extremely high levels of air pollution. Figure 4 suggests that the relationship between NO₂ and goblet-cell hyperplasia is linear and without a threshold or plateau. Although our sample was small, it is tempting to speculate that exposure to low levels of air pollution may induce subclinical damage, which ultimately leads to an adaptive response of the conjunctival epithelium. Our findings reinforce the concept that populations exposed to ambient levels of air pollution are subjected to possible chronic injury, which includes, as discussed in the present study, the ocular surface.

Figure 4 shows a substantial degree of variability in the responses to similar levels of air pollution. This finding suggests that some individuals have greater susceptibility to airborne toxic agents. Our study was not

designed to explore this point, but it would be interesting to explore in further studies whether ocular mucosa may be a convenient scenario to study the determinants—genetic or epigenetic—of the susceptibility of mucosal surfaces to air pollution.

In the present study we observed a positive and significant association between exposure to air pollution and goblet-cell hyperplasia in human conjunctiva. 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.

REFERENCES

- Barnett AG, Williams GM, Schwartz J, Best TL, Neller AH, Petroeschovsky AL, et al. 2006. The effects of air pollution on hospitalizations for cardiovascular disease in elderly people in Australian and New Zealand cities. *Environ Health Perspect* 114:1018–1023; doi:10.1289/ehp.8674 [Online 13 March 2006].
- Braga AL, Saldiva PH, Pereira LA, Menezes JJ, Conceicao GM, Lin CA, et al. 2001. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Pulmonol* 31(2):106–113; doi:10.1002/1099-0496(200102)31:2<106::AID-PPUL1017>3.0.CO;2-M [Online 22 January 2001].
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 2007. Relatório da Qualidade do Ar no Estado de São Paulo 2006. São Paulo. Available: http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/ar_geral.asp [accessed 6 July 2007].
- Conceição GM, Miraglia SG, Kishi HS, Saldiva PH, Singer JM. 2001. Air pollution and child mortality: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect* 109(suppl 3):347–350.
- Dartt DA. 2004. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res* 78(2):173–185; doi:10.1016/j.exer.2003.10.005 [Online 27 November 2003].
- de Paula Santos U, Braga AL, Giorgi DM, Pereira LA, Grupi CJ, Lin CA, et al. 2005. Effects of air pollution on blood pressure and heart rate variability: a panel study of vehicular traffic controllers in the city of Sao Paulo, Brazil. *Eur Heart J* 26(2):193–200; doi:10.1093/eurheartj/ehi035 [Online 3 December 2004].
- Fanucchi MV, Plopper CG, Evans MJ, Hyde DM, Van Winkle LS, Gershwin LJ, Schelegle ES. 2006. Cyclic exposure to ozone alters distal airway development in infant rhesus monkeys. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(4):L644–L650; doi:10.1152/ajplung.00027.2006.
- Farhat SC, Paulo RL, Shimoda TM, Conceicao GM, Lin CA, Braga AL, et al. 2005. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. *Braz J Med Biol Res* 38(2):227–235; doi:10.1590/S0100-879X2005000200011.
- Gupta SK, Gupta V, Joshi S, Tandon R. 2002. Subclinically dry eyes in urban Delhi: an impact of air pollution? *Ophthalmologica* 216(5):368–371; doi:10.1159/000066183.
- Harkema JR, Hotchkiss JA, Barr EB, Bennett CB, Gallup M, Lee JK, Basbaum C. 1999. Long-lasting effects of chronic exposure on rat nasal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(3):517–529.
- Ito K, De Leon SF, Lippmann M. 2005. Associations between ozone and daily mortality: analysis and meta-analysis. *Epidemiology* 16(4):446–457.
- Lin CA, Amador Pereira LA, de Souza Conceição GM, Kishi HS, Milani R Jr, Ferreira Braga AL, Nascimento Saldiva PH. 2003. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. *Environ Res* 92(1):57–63; doi:10.1016/S0013-9351(02)00054-3 [Online 23 March 2003].
- Lin CA, Martins MA, Farhat SC, Pope CA 3rd, Conceicao GM, Anastacio VM, et al. 1999. Air pollution and respiratory illness of children in Sao Paulo, Brazil. *Paediatr Perinat Epidemiol* 13(4):475–488; doi:10.1046/j.1365-3016.1999.00210.x [Online 04 January 2002].
- Lodge JP. 1989. Methods of air sampling and analysis. In: *Analysis of Atmospheric Nitrogen Dioxide (24H-Average)*. 3rd ed. Intersociety Committee. Chelsea, MI: Lewis Publishers, 399–402.

Figure 4. Individual cell counts plotted as a function of NO₂ exposure levels, indicated by study location.

- Martins LC, Latorre Mdo R, Saldiva PH, Braga AL. 2002. Air pollution and emergency room visits due to chronic lower respiratory diseases in the elderly: an ecological time-series study in Sao Paulo, Brazil. *J Occup Environ Med* 44(7):622–627.
- McDermott AM, Perez V, Huang AJW, Pflugfelder SC, Stern ME, Baudouin C et al. 2005. Pathways of corneal and ocular surface inflammation: a perspective from the Cullen Symposium. *Ocular Surf* 3(4):S131–S138.
- Medina-Ramón M, Zanobetti A, Schwartz J. 2006. The effect of ozone and PM10 on hospital admissions for pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease: a national multicity study. *Am J Epidemiol* 163(6):579–588; doi:10.1093/aje/kwj078 [Online 27 January 2006].
- Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, et al. 1999. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 145(4):769–782.
- Pereira LA, Loomis D, Conceicao GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, et al. 1998. Association between air pollution and intrauterine mortality in Sao Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect* 106:325–329.
- Pires-Neto RC, Lichtenfels AJFC, Soares RS, Macchione M, Saldiva PHN, Dolnikoff M. 2006. Effects of São Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res* 101(3):356–361; doi:10.1016/j.envres.2005.12.018 [Online 7 February 2006].
- Pope CA III, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287(9):1132–1141.
- Saldiva PHN, King M, Delmonte VLC, Macchione M, Parada MAC, Daliberto ML, et al. 1992. Respiratory alterations due to urban air pollution an experimental study in rats. *Environ Res* 57:19–33.
- Saldiva PH, Pope CA III, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, et al. 1995. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch Environ Health* 50(2):159–163.
- Samoli E, Touloumi G, Zanobetti A, Le Tertre A, Schindler C, Atkinson R, et al. 2003. Investigating the dose-response relation between air pollution and total mortality in the APHEA-2 multicity project. *Occup Environ Med* 60:977–982; doi:10.1136/oem.60.12.977.
- Saxena R, Srivastava S, Trivedi D, Anand E, Joshi S, Gupta SK. 2003. Impact of environmental pollution on the eye. *Acta Ophthalmol Scand* 81(5):491–494; doi:10.1034/j.1600-0420.2003.00119.x [Online 26 September 2003].
- Seltzer J, Scanlon PD, Drazen JM, Ingram RHJr, Reid L. 1984. Morphologic correlation of physiologic changes caused by SO₂ in dogs. The role of inflammation. *Am Rev Respir Dis* 129(5):790–797.
- Singh R, Joseph A, Umapathy T, Tint NL, Dua HS. 2005. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol* 89:1655–1659; doi:10.1136/bjo.2005.073916.
- Souza MB, Saldiva PH, Pope CA 3rd, Capelozzi VL. 1998. Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. *Chest* 113(5):1312–1318.
- Versura P, Profazio V, Cellini M, Torreggiani A, Caramazza R. 1999. Eye discomfort and air pollution. *Ophthalmologica* 213(2):103–109; doi:10.1159/000027401.
- Wei ZG, Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. 1995. Label-retaining cells are preferentially located in fornical epithelium: implications on conjunctival epithelial homeostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(1):236–246.
- White R, Zoppi AL, Haroz RK, Broillet A. 1986. Sulfur dioxide induced bronchitis in rats. *Arch Toxicol Suppl* 9:431–435.

APÊNDICE 2: Artigo – “The Effects of Chronic exposure to traffic derived air pollution on the ocular surface.” *Environmental Research*. 2010.

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envres

Short Communication

The effects of chronic exposure to traffic derived air pollution on the ocular surface[☆]

Priscila Novaes^{a,*}, Paulo Hilário do Nascimento Saldiva^b, Monique Matsuda^{a,b}, Mariângela Macchione^b, Maristela Peres Rangel^a, Newton Kara-José^a, Alejandro Berra^{a,c}

^a Laboratório de Investigação em Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 455, 5th Floor, 01246-903 São Paulo, Brazil

^b Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 455, 1st Floor, 01246-903 São Paulo, Brazil

^c Laboratorio de Investigaciones Oculares, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2009

Received in revised form

1 March 2010

Accepted 4 March 2010

Available online 24 March 2010

Keywords:

Traffic air pollutants

Eye disease

Air pollution/adverse effects

Nitrogen dioxide

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this study was to explore the clinical relevance of chronic exposure to ambient levels of traffic derived air pollution on the ocular surface.

Methods: A panel study involving 55 volunteers was carried out in São Paulo, Brazil. We measured the mean individual levels of nitrogen dioxide (NO₂) exposure for 7 days. All subjects answered the Ocular Symptom Disease Index (OSDI) and a symptoms inventory. Subsequently, subjects underwent Schirmer I test, biomicroscopy, vital staining and tear breakup time (TBUT) assessment. Subject's mean daily exposure to NO₂ was categorized in quartiles. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, Tukey HSD and Chi-Square tests.

Results: A dose–response pattern was detected between OSDI scores and NO₂ quartiles ($p < 0.05$). There was a significant association between NO₂ quartiles and reported ocular irritation ($X^2 = 9.2$, $p < 0.05$) and a significant negative association between TBUT and NO₂ exposure ($p < 0.05$, $R = -0.316$, Spearman's correlation). There was a significant increase in the frequency of meibomitis in subjects exposed to higher levels of NO₂ ($p < 0.05$).

Conclusions: Subjects exposed to higher levels of traffic derived air pollution reported more ocular discomfort symptoms and presented greater tear film instability, suggesting that the ocular discomfort symptoms and tear breakup time could be used as convenient bioindicators of the adverse health effects of traffic derived air pollution exposure.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Our group has demonstrated in a previous study that there is an association between goblet cell hyperplasia and individual exposure to NO₂, used, in that case, as a proxy estimate of the overall exposure to combustion-derived air pollution (Novaes et al., 2007).

This finding supports the concept that chronic exposure to ambient levels of air pollution may induce alteration of

conjunctival mucosa, as a response to chronic environmental aggression of the ocular surface.

Individuals living in areas with high concentrations of air pollutants frequently report ocular symptoms. Clinical and histological changes of the ocular surface in the face of exposure to ambient levels of air pollution have been reported (Franck and Palmvang, 1993; Gupta et al., 2002; Klopfer, 1989; Saxena et al., 2003; Versura et al., 1999). In the city of São Paulo, where we conducted this study, the complex mixture of primary pollutants to which the subjects are routinely exposed is mainly emitted by traffic sources. Because of the easy access to the ocular surface by clinical exams and cell sampling, in comparison with the airways, it is possible that these changes may represent a convenient bioindicator of the adverse health effects induced by air pollution.

The purpose of this study was to evaluate the effects of exposure to air pollution produced mainly by traffic sources on the ocular surface, by comparing subjective ocular complaints 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 the effects of air pollution.

[☆] Funding Information: This work was supported by CNPq Grant (55223/2006-0); FAPESP Grant (03/10772-9); by the Laboratories of Medical Investigation of the School of Medicine, University of São Paulo; by the Discipline of Ophthalmology, School of Medicine of the University of São Paulo and by the Laboratory of Ocular Research of the Department of Pathology, School of Medicine, University of Buenos Aires. We would also like to thank Ophthalmos[®], for supplying the materials used in the clinical tests.

* Corresponding author. R. Manoel da Nóbrega, 1240 Ap. 61-A, 04001-004 São Paulo, Brazil. Fax: +55 11 3068 0072.

E-mail address: pris_novaes@yahoo.com.br (P. Novaes).

2. Patients and methods

2.1. Study population

The study involved 55 healthy volunteers, aged 20–52 years, recruited among the staff of the General Clinics Hospital of the University of São Paulo Medical School, in the city of São Paulo, Brazil. Inclusion criteria were: to be part of the fixed staff of the Hospital, to have been living in the study area for at least 5 years and to accept participating in the study after reading and signing an informed consent form. The exclusion criteria were: chronic illnesses, smoking, possibility of traveling to other areas during the monitoring period (7 days) and contact with chemical solutions, such as organic solvents, sodium hypochlorite and formalin, as well as individuals with history of use of contact lenses, ophthalmic surgery, pre-existing ophthalmic conditions such as perennial allergic conjunctivitis, vernal keratoconjunctivitis, non-Sjögren and Sjögren dry eye. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the institution and all subjects gave their informed consent before being enrolled in the study.

2.2. Exposure assessment

NO₂ was used as a proxy indicator of exposure to the air pollution (Wheeler et al., 2008). We elected the NO₂ passive monitoring system because it is simple, efficient and does not interfere with daily activities, allowing good compliance of the study sample. To reinforce the concept of high colinearity between the pollutants present in this setting we measured PM₁₀ concentrations, using a Beta monitor, and NO₂ levels, using our passive tube system, for 3 weeks. Cumulative measurements ranged from 12 h to 7 days and Pearson's correlation between PM₁₀ and NO₂ levels was 0.95.

The studied individuals were instructed to keep the passive samplers at all times during their daily activities and by the bedside during the night, for 7 days. A cumulative measure of 1 week of NO₂ exposure was performed and we divided the result by 7, obtaining a mean individual level of daily NO₂ exposure, which was categorized 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) and compared to the other outcome measures.

2.3. Ocular Surface Disease Index (OSDI)

The OSDI questionnaire (Schiffman et al., 2000), translated into Portuguese, was applied to all subjects by one of two trained examiners before ophthalmologic examination and clinical tests.

2.4. Symptoms inventory

All subjects also answered a symptoms inventory composed of 4 questions, which assessed the presence or absence of ocular dryness, irritation, heaviness/fatigue and itching. They were asked if they had experienced these symptoms in the last 7 days.

2.5. Clinical tests

All clinical tests were performed in the same facility, at the same conditions of temperature and humidity, in the morning period, by the same examiner.

2.5.1. Schirmer I test

Subjects were submitted to the Schirmer I test without topical anesthesia. Results of 5 mm or less were considered abnormal (van Bijsterveld, 1969; DEWS, 2007).

2.5.2. Biomicroscopy

The ocular surface was assessed by means of biomicroscopy performed under the slit lamp, 30 min after the Schirmer I test was performed. Aspects of eyelids, cornea, conjunctiva and tear film were assessed and recorded in a chart.

2.5.3. Tear breakup time

Tear breakup time (TBUT) was measured by fluorescein strips (Ophthalmos[®], São Paulo, Brazil) wetted with 0.9% sodium chloride and gently applied to the inferior fornix. Values of 10 s or below were considered abnormal (Vitali et al., 1994).

2.6. Corneal and conjunctival vital staining

Vital staining with fluorescein and rose bengal was performed using impregnated strips (Ophthalmos[®], São Paulo, Brazil) wetted with 0.9% sodium chloride and gently applied to the inferior fornix. Initially, fluorescein was applied,

the corneal staining pattern was graded, followed by rose bengal staining and grading of the conjunctival pattern (van Bijsterveld, 1969).

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and the Tukey HSD test. The Chi-Square test was performed for qualitative variables.

3. Results

There is a wide range of exposure to NO₂ among subjects living in the same city and working in the same location. Exposure varies, probably depending on personal habits, place of living, time spent outdoors, time spent in the traffic and mode of transportation.

When the OSDI scores were computed across quartiles of NO₂ exposure, a clear dose–response pattern was detected, with a statistically significant difference among groups ($p=0.01$). Fig. 1a shows the box plot of OSDI scores as a function of categories of NO₂ exposure, categorized into quartiles.

Among the investigated symptoms, a significant correlation between NO₂ quartiles and ocular irritation was observed ($X^2=9.2$, $p\leq 0.05$). No statistically significant associations between heaviness/fatigue, itching, dry eye and NO₂ levels were observed. (Table 1).

There was a significant increase in the frequency of meibomitis, diagnosed by slit-lamp biomicroscopy, in subjects exposed to higher levels of NO₂ ($p < 0.05$).

Most subjects had average TBUT values below 10 s (mean 6.8 ± 4.6 s). There was a weak but statistically significant negative association between TBUT and exposure to NO₂ ($p=0.019$, $R=-0.316$, Spearman's correlation; Fig. 1b). There were no significant correlations between NO₂ levels and Schirmer I values (mean 22.4 ± 13.7 mm), rose bengal and fluorescein scores.

4. Discussion

Ocular mucosa is constantly exposed to the external environment and may thus be a bioindicator of exposure to air pollution. Our data indicate that people exposed to higher levels of traffic derived air pollution present a greater frequency of ocular irritation and tear film instability. Even though there were previous reports of the ocular effects of air pollution exposure (Bayer-Oglesby et al., 2005; Gupta et al., 2002; Sanchez-Carrillo et al., 2003; Saxena et al., 2003; Setiani, 1996; Yang et al., 1997), to our knowledge, this is the first study that has associated subjective measures of ocular symptoms and disease specific quality of life and clinical assessment to individual measures of exposure to ambient air pollution. We recognize that several agents in the indoor environment, such as bioaerosols, formaldehyde and other compounds, cause eye irritation and ocular surface alterations (Franck and Palmvang, 1993; Wolkoff et al., 2003; Chao et al., 2003). However, since the major source of pollution in the city of São Paulo is traffic, we postulate that ambient levels of traffic derived air pollution also play a role in ocular surface changes, even though the present study presents several limitations, mainly the determination of a single pollutant (NO₂) as indicative of overall exposure and the small sample size (55 volunteers).

Previously we demonstrated that exposure to air pollution, at ambient levels, induces goblet cell hyperplasia in inferior tarsal conjunctiva (Novaes et al., 2007). Indeed mucous cell hyperplasia represents a stereotyped response of mucosa to chronic injurious stimuli (Dartt, 2004; Pellegrini et al., 1999; Wei et al., 1995). In this case, it is possible that individuals living in urban areas may

Fig. 1. (a) OSDI scores as a function of categories of NO₂ exposure levels categorized into quartiles. There was a statistically significant correlation, $p < 0.05$. (b) Average TBUT values across NO₂ exposure levels. There was a negative association between TBUT and exposure to NO₂ ($p=0.019$, $R=-0.316$, Spearman's correlation).

Table 1
Frequency of symptoms across quartiles of NO₂.

Symptoms		Quartiles of exposure to NO ₂ (n (%))			
		1	2	3	4
Dry eyes	Yes	3 (23.1)	4 (64.3)	8 (71.4)	8 (61.5)
	No	10 (76.9)	5 (35.7)	4 (28.6)	5 (38.5)
Irritation	Yes	5 (38.5)	9 (64.3)	10 (71.4)	13 (92.9)
	No	8 (61.5)	5 (35.7)	4 (28.6)	1 (7.1)
Heaviness	Yes	7 (53.8)	4 (28.6)	8 (57.1)	9 (64.3)
	No	6 (46.2)	10 (71.4)	6 (42.9)	5 (35.7)
Itching	Yes	8 (61.5)	8 (57.1)	9 (64.3)	11 (78.6)
	No	5 (38.5)	6 (42.9)	5 (35.7)	3 (21.4)

present increased inflammatory response of the ocular surface in the face of increased levels of air pollutants that is clinically detected eventually.

Considering our findings, it is possible that ocular surface changes could be used as bioindicators of air pollution exposure in the urban scenario.

References

- Bayer-Oglesby, L., et al., 2005. Decline of ambient air pollution levels and improved respiratory health in Swiss children. *Environ. Health Perspect.* 113, 1632–1637.
- Chao, H.J., Schwartz, J., Milton, D.K., Burge, H.A., 2003. The work environment and workers' health in four large office buildings. *Environ. Health Perspect.* 111, 1242–1248.
- Dartt, D.A., 2004. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 78, 173–185.
- DEWS, 2007. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop. *Ocul. Surf.* 5, 75–92.

- Franck, C., Palmvang, I.B., 1993. Break-up time and lissamine green epithelial damage in 'office eye syndrome'. Six-month and one-year follow-up investigations. *Acta Ophthalmol. (Copenhagen)* 71, 62–64.
- Gupta, S.K., et al., 2002. Subclinically dry eyes in urban Delhi: an impact of air pollution? *Ophthalmologica* 216 368–371.
- Klopper, J., 1989. Effects of environmental air pollution on the eye. *J. Am. Optom. Assoc.* 60, 773–778.
- Novaes, P., et al., 2007. Ambient levels of air pollution induce goblet-cell hyperplasia in human conjunctival epithelium. *Environ. Health Perspect.* 115, 1753–1756.
- Pellegrini, G., et al., 1999. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J. Cell Biol.* 145, 769–782.
- Sanchez-Carrillo, C.I., et al., 2003. Surveillance of acute health effects of air pollution in Mexico City. *Epidemiology* 14, 536–544.
- Saxena, R., et al., 2003. Impact of environmental pollution on the eye. *Acta Ophthalmol. Scand.* 81, 491–494.
- Schiffman, R.M., et al., 2000. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch. Ophthalmol.* 118, 615–621.
- Setiani, O., 1996. Trend of air pollution and its effect on human health in Hiroshima Prefecture—a retrospective study in the cities of Otake, Kure, Mihara, Takehara, Fukuyama and Kaita Town, 1977–1992. *Hiroshima J. Med. Sci.* 45, 43–50.
- van Bijsterveld, O.P., 1969. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 82, 10–14.
- Vitali, C., et al., 1994. The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 53, 637–647.
- Versura, P., et al., 1999. Eye discomfort and air pollution. *Ophthalmologica* 213, 103–109.
- Wei, Z.G., et al., 1995. Label-retaining cells are preferentially located in fornical epithelium: implications on conjunctival epithelial homeostasis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 236–246.
- Wheeler, A.J., et al., 2008. Intra-urban variability of air pollution in Windsor, Ontario—measurement and modeling for human exposure assessment. *Environ. Res.* 106, 7–16.
- Wolkoff, P., Skov, P., Franck, C., Pedersen, L.N., 2003. Eye irritation and environmental factors in the office environment. Hypotheses, causes, and a physiological model. *Scand. J. Work Environ. Health* 29, 411–430.
- Yang, C.Y., et al., 1997. Respiratory and irritant health effects of a population living in a petrochemical-polluted area in Taiwan. *Environ. Res.* 74, 145–149.